

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 24/05/2024.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**HIDROXIAPATITA SINTÉTICA POROSA (HSP) E  
XENOENXERTO BOVINO NO REPARO ÓSSEO DO DEFEITO  
CRÍTICO EM CALOTA CRANIANA DE *Rattus norvegicus*  
(*wistar*)**

**Marcella Dall Agnol Leite**

**Médica Veterinária**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**HIDROXIAPATITA SINTÉTICA POROSA (HSP) E  
XENOENXERTO BOVINO NO REPARO ÓSSEO DO DEFEITO  
CRÍTICO EM CALOTA CRANIANA DE *Rattus norvegicus*  
(*wistar*)**

**Discente: Marcella Dall Agnol Leite**

**Orientadora: Profa. Dra. Paola Castro Moraes**

**Dissertação apresentada à  
Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias – Unesp, Campus de  
Jaboticabal, como parte das  
exigências para a obtenção do título  
de Mestre em Cirurgia Veterinária.**

**2022**

L533h     Leite, Marcella Dall Agnol

Hidroxiapatita sintética porosa (HSP) e xenoenxerto bovino no reparo ósseo do defeito crítico em calota craniana de *Rattus norvegicus* (wistar) / Marcella Dall Agnol Leite. -- Jaboticabal, 2022

50 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Paola Castro Moraes

Coorientador: João Paulo Mardegan Issa

1. Medicina veterinária. 2. Cirurgia experimental. 3. Biomateriais. 4.

Substitutos ósseos. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: HIDROXIAPATITA SINTÉTICA POROSA (HSP) E XENOENXERTO NO REPARO ÓSSEO DO DEFEITO CRÍTICO EM CALOTA CRANIANA DE *Rattus norvegicus* (wistar)

**AUTORA: MARCELLA DALL AGNOL LEITE**  
**ORIENTADORA: PAOLA CASTRO MORAES**  
**COORDINADOR: JOÃO PAULO MARDEGAN ISSA**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

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

Dr. JOSÉ GERALDO MEIRELLES PALMA ISOLA (Participação Virtual)  
Médico Veterinário Autônomo - Capesvet / Ribeirão Preto/SP

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

Jaboticabal, 24 de maio de 2022

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**MARCELLA DALL AGNOL LEITE** – Nascida em 24 de dezembro de 1991, na cidade de Jacareí em São Paulo, filha de Inês Dall Agnol Leite e Flávio Leite. Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Uberlândia – UFU (2015). Concluiu Residência em Clínica Cirúrgica em Animais de Companhia no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia – UFU em 2020. Atualmente aluna regular do programa de pós graduação Strictu Sensu em Cirurgia Veterinária, nível Mestrado, na Universidade Estadual Paulista – FCAV – UNESP de Jaboticabal, sob orientação da Profa. Dra. Paola Castro Moraes com ênfase em biomateriais.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Flávio Leite e Inês Dall Agnol Leite por todo o carinho e amor que recebi durante minha criação, pelo apoio fornecido durante minha formação acadêmica e pessoal, por estarem sempre presentes mesmo a distância no meu dia a dia e serem meu porto seguro sempre que precisei, me proporcionando todo suporte para conquistar as vitórias que até hoje conquistei.

À minha orientadora Professora Paola Castro Moraes, que me aceitou como sua orientada, proporcionando uma experiência ímpar, de muito trabalho e enriquecimento acadêmico e pessoal, mesmo em tempos tão sombrios como os da pandemia. Obrigada por ter sido tão compreensiva e acolhedora por todas as vezes que precisei, especialmente quando havia dúvida sobre qual caminho seguir. A senhora é um exemplo de mulher na academia a ser seguido.

Aos amigos irmãos Marcelo Carrijo e Gustavo Fernandes, meus mais sinceros agradecimentos, por toda a convivência, apoio e ensinamentos, seja nos cafés da tarde compartilhados, às sextas a noite, nas tardes de piscina ou nas manhãs de treino. Foram muitos desabafos, planos e esperanças construídas. É um dividir pra conquistar que nem sabemos se um dia será, mas que eu realmente espero que seja. Ter esses meses de convivência foi extremamente importante pra mim.

Aos amigos Gabriel Carra, Guilherme Braz e Lucas Pimenta que me acolheram em momentos diferentes e muitas vezes por motivos diversos. Seja com uma comida que aquece o coração, uma história de podcast compartilhada que gerava horas de discussão ou uma cirurgia que requeria discussão e planejamento. Obrigada por terem tornado a experiência do mestrado mais fácil.

Aos meus amigos Gabriel Montanhim e Ariadne Rein, que me acolheram durante a pós-graduação, me proporcionaram excelentes momentos na vida científica, durante todos os momentos de experimento e desabafos. Agradeço pela convivência pessoal que foi excepcional e por todo o apoio.

Aos meus amigos de Chapecó-SC, que me acolheram entre qualificação e defesa do mestrado, mudança de cidade e muitas experiências novas tomando espaço no meu dia a dia. Confiando e me aceitando dentro das minhas qualidades e limitações. Meu muito obrigada.

Ao Otávio Monteiro, que me ajudou em diversos momentos, desde de desabafos de vida a dúvidas histológicas, pequenas conversas que viraram grandes ensinamentos. Obrigada por estar sempre presente nos mais variados momentos da minha vida, por me apoiar, me estimular a crescer e acima de tudo escolher estar ao meu lado durante essa caminhada, me lembrando que quase tudo são bençãos e que desistir não é uma opção.

Agradeço a todos os funcionários, residentes e pós-graduandos do Hospital Veterinário da UNESP de Jaboticabal que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e para minha evolução como profissional e pessoa.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela bolsa de estudos e auxílio financeiro que possibilitou a dedicação integral ao programa de pós-graduação e operacionalização do estudo.

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



**CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

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

**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Comparação da Hidroxiapatita Porosa Sintética com Bio-Oss® no reparo ósseo do defeito crítico em calota craniana de *Rattus norvegicus* (Wistar)**", protocolo nº 4362/20, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Paola Castro Moraes, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 17 de setembro de 2020.

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

Jaboticabal, 17 de setembro de 2020.

  
**Profa Drª Fabiana Pilarski**  
Coordenadora – CEUA

**COMPARAÇÃO ENTRE HIDROXIAPATITA SINTÉTICA POROSA (HSP) E  
XENOENXERTO BOVINO NO REPARO ÓSSEO DO DEFEITO CRÍTICO EM CALOTA  
CRANIANA DE *Rattus norvegicus* (wistar)**

RESUMO – Objetivou-se comparar o uso do biomaterial Hidroxiapatita Sintética Porosa (HSP), com xenoenxerto de origem bovina (LB) no reparo ósseo de falhas críticas em calvária de *Rattus norvegicus*, variação wistar. Foram selecionados 32 ratos adultos para a realização do estudo *in vivo*, distribuídos em quatro grupos: controle negativo (ausência de enxerto na falha/coágulo sanguíneo); controle positivo (autoenxerto); Lumina Bone (xenoenxerto presente no mercado) e Hidroxiapatita Sintética Porosa (substância teste). Todos os animais foram submetidos à cirurgia e acompanhados durante todo o pós-operatório e submetidos à eutanásia de maneira aleatória em dois tempos, 6 semanas (n=4 – sendo um animal de cada grupo) para realização de microtomografia e 12 semanas (n=28), sendo que 4 animais (um de cada grupo) foram escolhidos para realização de microtomografia, os demais foram submetidos à análises histopatológicas. Foi possível observar crescimento ósseo e porcentagem da distribuição de fibras colágenas nas lâminas coradas com Tricrômico de Masson e Picrosírius. Por meio das análises microtomográficas foi possível observar a razão entre volume e falha óssea. Dessa maneira foi possível concluir que a HSP é um bom biomaterial, que levou a formação de osso nas falhas, apesar de precisar de mais estudos com relação a sua reabsorção e substituição.

**Palavras – chave:** Biomateriais Cerâmicos; Histopatologia; Microtomografia

**COMPARISON BETWEEN SYNTHETIC POROUS HYDROXYAPATITE (SPH) AND BOVINE XENOGRAFT IN BONE REGENERATION USING THE *Rattus norvegicus* (*Wistar*) CALVARIAL CRITICAL SIZE DEFECTS**

**ABSTRACT** – The objective of this study was to compare the biomaterial Synthetic Porous Hydroxyapatite (SPH) with bovine xenograft (LB) in the repair of critical size defects in *Rattus norvegicus* calvaria, *Wistar* variation. Thirty-two adult rats were selected for the *in vivo* study, divided into 4 groups: Negative control (blood clot); Positive control (autograft); Lumina Bone (graft available on the market, bovine xenograft) and Synthetic Porous Hydroxyapatite (substance tested), all animals were included in the surgery and monitored throughout the postoperative period. Then, euthanasia procedures were performed randomly in two occasions: 6 weeks (n=4 being one animal from each group) for microtomography evaluation and 12 weeks (n=28), where 4 animals (one from each group) were chosen to microtomography, the others were selected for histopathological analysis. It was possible to observe some new bone growth and collagen fibers with Masson Trichrome and Picrosirius stain. Through the microtomographic evaluation it was analyzed the ratio between the volume and bone failure. It was concluded that HSP is an effective and responsible material for bone formation in the defects, although it needs more study in terms of its reabsorption and replacement.

**Keywords:** Ceramic Biomaterials; Histopathology; Microtomography

## CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

### 1 Introdução

As fraturas e situações que apresentam grandes falhas ósseas, em decorrência de traumatismos de alta energia, tumores, infecções e más-formações congênitas constituem grande parte da casuística de atendimentos na clínica cirúrgica de pequenos animais (Ignácio et al., 2002; Patil et.al., 2008), muitas vezes sendo necessário recorrer ao uso de enxertos, implantes de biomateriais ou transporte ósseo (Ignácio et al., 2002). Estes auxiliam na consolidação óssea, oferecendo suporte mecânico e promovendo osteocondução, osteogênese e osteoindução, dependendo do tipo de enxerto ou implante (Martinez e Walker, 1999). Podem ser classificados como autoenxertos, aloenxertos ou xenoenxertos, podendo ser formados de osso esponjoso, cortical ou corticoesponjoso (Brinker et al., 1986; Denny e Butterworth, 2006; Johnson, 2007; Millis e Martinez, 2007).

Os autoenxertos são retirados do próprio paciente, levando-o a passar por mais de um procedimento cirúrgico, aumentando dessa forma a morbidade pós-operatória (Calasans – Maia, 2009); os aloenxertos são aqueles retirados da mesma espécie animal, porém de indivíduo diferente, os quais, apesar de serem bastante utilizados, nem sempre apresentam boa aceitação pelo organismo do receptor, podendo formar considerável quantidade de tecido fibroso entre o implante e o osso (Barckman et al., 2013); os xenoenxertos são aqueles retirados de espécie diferente, os provenientes de bovinos têm apresentado boa resposta, porém ainda apresentam desvantagens, como elevada resposta imune e falhas na consolidação (Laurcerin e Saadiq, 2008).

Os biomateriais são substâncias muito utilizadas para a reconstrução de extensas falhas ósseas, sendo compulsoriamente biocompatíveis e classificados quanto à sua atividade em bioinertes ou bioativos. Existem diversos tipos de biomateriais como metais, cerâmicas, polímeros (Suryavanshi et.al., 2019).

Objetivou-se com este trabalho a realização de testes *in vivo* comparando comportamento e o potencial de reparo ósseo da Hidroxiapatita Sintética Porosa (HSP) com o Lumina-Bone®, por meio de avaliações histopatológicas e microtomográficas, para reparação óssea de defeitos críticos em calvária de *Rattus norvegicus*, variação Wistar.

**Conclusão**

Foi possível concluir que após as 12 semanas o biomaterial testado apresentou boa osteocondução e osteoindução, levando à formação de osso nas falhas críticas, não apresentando reação de corpo estranho, apesar de novos estudos serem necessários para que haja avaliação a longo prazo, especialmente com relação a sua taxa de reabsorção e substituição.

## Referências

- [1] T. Rolvien, F. Barvencik, T.O. Klatte, B. Busse, M. Hahn, J.M. Rueger, M. Rupprecht, *Knee* 24 (2017) 1138–1145.
- [2] S. Bose, S. Vahabzadeh, A. Bandyopadhyay, *Materials Today* 16 (2013) 496–504.
- [3] T. Rolvien, M. Barbeck, S. Wenisch, M. Amling, M. Krause, *International Journal of Molecular Sciences* 19 (2018).
- [4] A.C.F.M. Costa, M.G. Lima, L.H.M.A. Lima, V. Cordeiro, K.M.S. Viana, C.V. Souza, H.L. Lira Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações n.d.
- [5] S. V. Dorozhkin Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine. *Materials* 2009;2:399–498. <https://doi.org/10.3390/ma2020399>.
- [6] A.R. Amini, D.J. Adams, C.T. Laurencin, S.P. Nukavarapu, *Tissue Engineering - Part A* 18 (2012) 1376–1388. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0076>.
- [7] B.N. Brown, B.D. Ratner, S.B. Goodman, S. Amar, S.F. Badylak. Macrophage polarization: An opportunity for improved outcomes in biomaterials and regenerative medicine. **Biomaterials**. v. 33, (2012) p. 3792–3802.
- [8] P.P. Spicer, J.D. Kretlow, S. Young, J.A. Jansen, F.K. Kasper, A.G. Mikos, *Nature Protocols* 7 (2012) 1918–1929.
- [9] Z.S. Patel, S. Young, Y. Tabata, J.A. Jansen, M.E.K. Wong, A.G. Mikos, Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. **Bone**. v. 43 (2008) p. 931–940.
- [10] I. Kallai, O. Mizrahi, W. Tawackoli, Z. Gazit, G. Pelled, D. Gazit. Microcomputed tomography-based structural analysis of various bone tissue regeneration models. *Nat Protoc* 2011; 6 (1): 105–110.
- [11] J.P. Issa, M. Gonzaga, B.G. Kotake, C. De Lucia, E. Ervolino, M. Iyomasa. Bone repair of critical size defects treated with autogenic, allogenic, or xenogenic bone grafts alone or in combination with rh BMP-2. **Clinical Oral Implants Research**, 27(5), (2016) 558-566.
- [12] M.G. Gonzaga, B.G.S. Kotake, F.A.T. De Figueiredo, S. Feldman, E. Ervolino, M.C.G. Dos Santos, J.P.M. Issa. Effectiveness of rhBMP-2 association to autogenous, allogeneic, and heterologous bone grafts. **Microscopy Research and Technique**, 82(6), (2019) 689-695.
- [13] D.P. Cury, F.J. Dias, M.A. Miglino, I.S. Watanabe. Structural and ultrastructural characteristics of bone-tendon junction of the calcaneal tendon of adult and elderly Wistar rats. *PLoS One*, 2016, 11: e0153568
- [14] R. Larson, B. Farber. Testes não paramétricos, in: R. Larson, B. Farber. (6ed), *Estatística Aplicada*, Pearson Education do Brasil, 2016, Sala Virtual.
- [15] D. Bates, M. Maechler, B. Bolker, S. Walker. lme4: Linear Mixed-Effects Models using Eigen and S4. R package version 1.1-29. (2022) <https://github.com/lme4/lme4/>
- [16] R. Larson, B. Farber. Medidas de Posição, in: B R. Larson, B. Farber. (6ed), *Estatística Aplicada*, Pearson Education do Brasil, 2016, 36-123.
- [17] R. Larson, B. Farber. Teste qui-quadrado e a distribuição F, in: B R. Larson, B. Farber. (6ed), *Estatística Aplicada*, Pearson Education do Brasil, 2016, 488-537.
- [18] G. Zhu, T. Zhang, M. Chen, K. Yao, X. Huang, B. Zhang, Y. Li, J. Liu, Y. Wang, Z. Zhao, *Bioactive Materials* 6 (2021) 4110–4140.

- [19] J.M. Campos, A.C. Sousa, P.O. Pinto, J. Ribeiro, M.L. França, A.R. Caseiro, M.V. Branquinho, S.S. Pedrosa, C. Mendonça, A. Brandão, J.D. Santos, A. Afonso, L.M. Atayde, A.L. Luís, A.C. Maurício, *Biomaterials Research* 22 (2018).
- [20] C.R. Galia, L.F. Moreira, *The Biology of Bone Grafts*, n.d.
- [21] P.O. Pinto, M. v. Branquinho, A.R. Caseiro, A.C. Sousa, A. Brandão, S.S. Pedrosa, R.D. Alvites, J.M. Campos, F.L. Santos, J.D. Santos, C.M. Mendonça, I. Amorim, L.M. Atayde, A.C. Maurício, *Bone Reports* 14 (2021).
- [22] M.D. Calasans-Maia, R. Resende, G. Fernandes, J. Calasans-Maia, A.T. Alves, J.M. Granjeiro. A randomized controlled clinical trial to evaluate a new xenograft for alveolar socket preservation. *Clin. Oral Impl. Res.* 00, (2013), 1–6 doi: 10.1111/clr.12237.
- [23] M.D. Calasans-Maia, A.M. Rossi, E.P. Dias, S.R.A. Santos, F. Áscoli, J.M. Granjeiro. Stimulatory Effect on Osseous Repair of ZincSubstituted Hydroxyapatite: Histological Study in Rabbit's Tibia. *Key Eng Mater.* 361-363: 1269-1272, 2008
- [24] J. Werner, B. Linner-Kr\$ Cmar, W. Friess, P. Greil, *Mechanical Properties and in Vitro Cell Compatibility of Hydroxyapatite Ceramics with Graded Pore Structure*, 2002.
- [25] M. Alexandre Nunes da Silva, S. Cristina Sartoretto, D. Ferreira Barreto-Vieira, J. Mauro Granjeiro, M. Diuana Calasans-Maia, *CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE TRÊS XENOENXERTOS UTILIZADOS NA IMPLANTODONTIA* Physicochemical Characterization of Three Xenografts Used in Implant Dentistry, 2020.
- [26] T. Goto, T. Kojima, T. Iijima, S. Yokokura, H. Kawano, A. Yamamoto, K. Matsuda. Resorption of synthetic porous hydroxyapatite and replacement by newly formed bone. *J Orthop Sci* (2001) 6:444–447. doi: 10.1007/s007760170013. PMID: 11845356.
- [27] E.A. Munhoz, A. Bodanezi, T.M. Cestari, M.S.Z. Graeff, O. Ferreira, P.S.P. de Carvalho, R. Taga, *Implant Dentistry* 26 (2017) 875–881.
- [28] A. Macedo, S.G. Lamelo, E. Alencar, F. Caballero, E. Gimenes, C. Zubieta. Enxerto ósseo em crânio: princípios básicos para a integração óssea. *Rev. Bras. Cir. Plást.* 2010; 25(4): 617-23. <https://doi.org/10.1590/S1983-51752010000400009>
- [29] L. Lin, K.L. Chow, Y. Leng. Study of hydroxyapatite osteoinductivity with an osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A.* 2009 May;89(2):326-35. doi: 10.1002/jbm.a.31994. PMID: 18431794
- [30] P. Habibovic, H. Yuan, C.M. Van der Valk, G. Meijer, C.A. Van Blitterswijk, K. de Groot. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by bio-materials. *Biomaterials.* (2005) 26:3565–3575
- [31] C.M. López De Padilla, M.J. Coenen, A. Tovar, R.E. de la Vega, C.H. Evans, S.A. Müller, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 69 (2021) 633–643.
- [32] J. Liu, M. you Xu, J. Wu, H. Zhang, L. Yang, D. xing Lun, Y. cheng Hu, B. Liu, *Orthopaedic Surgery* 13 (2021) 701–707.
- [33] A. Dziedzic-Goclawska, M. Rozycka, J.C. Czyba, R. Moutier, S. Lenczowski, K. Ostrowski. Polarizing microscopy of Picrosirius stained bone sections as a method for analysis of spatial distribution of collagen fibers by optical diffractometry. *Basic Appl Histochem.* 1982;26(4):227-39. PMID: 6187326.S.

- [34] Allegrini, E. Rumpel, E. Kauschke, J. Fanghänel, B. König, *Annals of Anatomy* 188 (2006) 143–151.
- [35] L.C. Junqueira, J. Carneiro. Tecido ósseo. In: JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan. cap. 8, p. 131-148. 2013.
- [36] S. Gupta, R. Aggarwal, V. Gupta, R. Vij, N. Tyagi, A. Misra, *Journal of Histotechnology* 40 (2017) 46–53.
- [37] C.R. Galia, L.F. Moreira, *The Biology of Bone Grafts*, n.d.