



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

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Pós Graduação em Odontologia - Mestrado

Implantodontia

Thiago Machado

Efeito do substituto ósseo particulado associado ou não ao MTA na citotoxicidade,
resposta tecidual e reparo ósseo em defeitos críticos em calvária de ratos

ARAÇATUBA - SP

2019

Thiago Machado

Efeito do substituto ósseo particulado associado ou não ao MTA na citotoxicidade, resposta tecidual e reparo ósseo em defeitos críticos em calvária de ratos

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, para obtenção do Título de MESTRE EM ODONTOLOGIA (Área de concentração em Implantodontia).

Orientador: Prof. Adj. Wirley Gonçalves Assunção

ARAÇATUBA - SP

2019

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia, Araçatuba
Orientador: Prof. Wirley Gonçalves Assunção

Black D7
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedicatória

Dedico esse trabalho, inicialmente à humanidade, que, por meio de sua capacidade produtiva, mulheres e homens inovadores através do trabalho constantemente criaram e subverteram limites, sonharam e realizaram para que pudéssemos criar novas tecnologias e armazenar conhecimento nas mais diversas áreas, desta forma dedico essa dissertação àqueles que me antecederam e também aos que sucederão em detrimento ao interminável ciclo da vida e do conhecimento.

À minha mãe **Regina Célia Machado** que desde o princípio incentivou cada passo e cada escolha por mim feita, permitindo que eu pudesse trilhar meu destino de forma serena pois a certeza de seu esteio me fez pisar mais firme a cada passo, sem medo de quedas, sempre a me sentir seguro e com a clareza de não estar jamais sozinho e perseverar.

À minha avó **Profa. Dra. Maria Regina Rodrigues Machado** (*in Memoriam) que dedicou sua vida a formar e cuidar de pessoas, não apenas como professora e cirurgiã-dentista, mas também como mãe e avó. Transmitindo conhecimento, valores morais e éticos, alegria, vontade de viver e sempre em busca de seus sonhos sem esmorecer jamais! Marcou a vida de um sem número de pessoas por onde andou, e fez surgir em mim desde pequeno o amor pela odontologia, profissão que sigo como sacerdócio em dedicação ao bem comum. A perseverança de seus sonhos me guiou e me guiará até meu último suspiro.

Dedico, também, esta obra à minha irmã **Patrícia Machado** e meu irmão **Emiliano Machado**, que me acompanham desde o princípio de minha jornada neste mundo, dando carinho amor e atenção que apenas as pessoas que sabem o significado do verdadeiro amor fraternal podem transmitir. Minha irmã uma artista por natureza contagia a todos com sua alegria sempre será um grande exemplo como pessoa. Meu irmão, assim como eu também é cirurgião-dentista, a quem me espelho com o trato

com os pacientes e a capacidade como profissional, espero poder um dia ser 1% do profissional que você é meu irmão.

Às minhas tias **Maria Emília Machado Nunes Adão, Lúcia Helena Machado** e ao meu tio **José Machado Filho** (*in Memoriam) por terem auxiliado em minha trajetória, ensinando e educando, além de ser um porto seguro a cada aperto.

Às minhas primas **Beatriz, Débora, Eliza, Karina, Yasmin** e ao pequeno **Levi**, por todo o carinho que temos uns com os outros e por cada minuto de companheirismo que sempre tivemos.

À minha cunhada **Andréa** e minha sobrinha **Ana Carolina** por toda a dedicação e carinho.

Aos demais familiares, todos os agradecimentos.

Agradecimentos

Inicialmente gostaria de agradecer ao meu Orientador **Prof. Assoc. Wirley Gonçalves Assunção**, que me acolheu como orientado no ano de 2012 e desde então vem guiando meus passos dentro da ciência odontológica, encorajando a colocar ideias em prática e ajudando a manter os pés no chão, muito obrigado por cada palavra, bronca, puxão de orelha, por toda a paciência e por mostrar que sempre podemos mais.

Agradeço também ao **Prof. Assoc. Eder Ricardo Biasoli** por compartilhar seu conhecimento e paixão pela odontologia e pela Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, sob sua tutela tive inestimável aprendizado que me permitiu uma escolha segura pela especialidade onde seus ensinamentos premeiam minha prática clínica em busca de uma excelência cirúrgica.

Ao **Prof. Dr. Elias Nahin Kassis** por me ensinar a arte da Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e também por ser um conselheiro e um grande incentivador pessoal e profissional, um grande exemplo de pessoa, com uma história de vida impressionante e reputação que o precede.

Ao **Prof. Dr. Igor Mariotto Benetti** por sempre me incentivar e por toda a dedicação ao ensinar os caminhos da CTBMF com tanta propriedade e capacidade.

Ao **Prof. Dr. André Luís da Silva Fabris** pela amizade e por todo o incentivo dentro da CTBMF e da Implantodontia. Um grande contador de “causos”, um grande amigo e um excelente preceptor. Um dia espero poder ter um pouco da sua capacidade.

Ao **Prof. Dr. Francisley Ávila Souza** que por tantas vezes compartilhou momentos e guiou plantões com maestria, também um grande contador de histórias, fez com que vários momentos se tornassem mais leves e menos estressantes.

Aos demais professores das disciplinas de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Implantodontia, **Idelmo, Osvaldo, Alessandra, Ana Paula, Daniela, Leonardo** agradeço pela dedicação com os alunos e por mostrarem os caminhos da docência superior.

Ao **Prof. Dr Gustavo Sivieri Araújo** um grande amigo e incentivador, grande companheiro de jornada que mostra desprendimento e preocupação verdadeira com seus amigos e de uma forma peculiar compartilha experiências e aconselha. Um muito obrigado por tudo!

À **Profa. Titular Sandra Helena Penha de Oliveira**, por me orientar tanto na vida como na academia, uma pessoa irreverente e zelosa, que aos poucos conquista a todos. Uma professora exemplar e uma pesquisadora de impressionante capacidade! Seu coração enorme me permitiu desenvolver grande parte deste trabalho em seu laboratório, fornecendo todo o suporte necessário para que tudo corresse bem e o objetivo final fosse alcançado. Suas aulas de farmacologia, que me botavam medo, na graduação hoje fazem uma diferença enorme dentro da minha prática clínica tanto ambulatorial como hospitalar. Não tenho palavras para agradecer!

À **Profa. Assoc. Mariza Akemi Matsumoto**, por compartilhar seu conhecimento e auxiliar no desenvolvimento deste trabalho. Sua ajuda foi fundamental para a realização desta pesquisa.

Ao **Prof. Titular João Eduardo Gomes-Filho**, que nos momentos onde a ideia desta pesquisa ainda era apenas uma possibilidade, ajudou a formatar e apontou caminhos e colocou toda a estrutura de pesquisa do departamento de Odontologia Restauradora da FOA-Unesp à disposição, atitudes estas que foram fundamentais para a realização do trabalho.

À **Profa. Dra. Índia Olinta de Azevedo Queiróz** uma pessoa diferente de tantas outras e que compartilhou comigo muitos momentos, alguém com quem muito aprendi sobre tantas coisas que não haveria páginas suficientes para agradecer e descrever estes momentos. Uma incentivadora das mais importantes, sempre viu além daquilo que eu quis mostrar e me impulsionou para bem além do que eu poderia imaginar alcançar dentro da pós-graduação. Qualquer coisa que eu venha a dizer seria pouco para descrever como você é importante para mim, obrigado por ter acreditado neste trabalho e ter participado de forma ativa do desenvolvimento de todo esse processo. Obrigado por tudo!

Às colegas e amigas da Pós-graduação **Marina e Ana Maria** e à aluna de iniciação científica **Camila**, que tanto me ajudaram em um período conturbado do mestrado, obrigado por cuidarem dos animais nos momentos em que precisei me ausentar, obrigado por terem desprendido tempo e esforço para que este trabalho pudesse ser concluído.

Ao amigo **André Hergesel de Oliva**, um amigo que a graduação me trouxe e que sabe o verdadeiro valor da amizade, uma pessoa que me ensinou muito nesses anos e que tenho enorme dívida de gratidão, obrigado por tudo!

Ao amigo **Gustavo Antonio Correa Momesso**, outro amigo que a graduação me proporcionou conhecer e que durante nosso início de caminhada dividíamos estágios e treinamentos para iniciação científica. Um grande amigo que sempre me acompanha, muito obrigado!

Aos demais amigos que conheci com a graduação e que tem um espaço especial na minha história, **Anelise, Úrsula, Ronaldo, Sílvio, Gabriela, Tatiane, Gustavo Fabri, Marcelo, Marcelo Montanare, Paulo Gallo, Nairobi, Igor, Felipe Gatto, Nathalia.**

Aos amigos de pós-graduação **Jadison** e **Francisco** também orientados pelo Prof. Wirley que muito contribuíram para que este trabalho acontecesse. Muito obrigado pelo apoio e por toda ajuda que tive de vocês.

Ao amigo da pós-graduação **Ciro Borges Duailibe de Deus** que tantos momentos tivemos de diversão e de trabalho, um grande profissional e muito bom amigo que fez a ponte para que eu pudesse receber o material utilizado na pesquisa, um enorme obrigado!

Aos demais amigos da pós-graduação **Bruna, Laís, Luiza, Caio, Leonardo, Paulo, Cássio, William, Luara, Lara, Guilherme** obrigado por compartilharem momentos e experiências comigo e por todos os momentos que tivemos.

Aos meus amigos de uma vida **Leandro, Diego, Paulo, Paulo Ricardo, Ricardo, Jackson, Nicolas, Felipe Djun, Jefferson, Jeniffer, Marcela, Leandro Teixeira, Amanda, Ana Carolina, Thierry, Larissa, Talita, Flávio, Juliana, Michelle, Angélica, Isabela Dias** e tantos outros por nutrimos uma amizade imprescindível para o que hoje me tornei.

Aos professores **Christiane, Cláudio, Maria Lúcia, Luíz Fernando** que de maneiras e em momentos diferentes impactaram minha trajetória e me mostraram que sonhar é possível. Exercer a docência com tamanha maestria é para poucos e sempre me espelharei em vocês para que eu possa não apenas um dia ensinar, mas formar cidadãos conscientes de seu papel para com a sociedade.

Aos funcionários e amigos do laboratório do prédio 5, os secretários **Renato de Oliveira** e **Fausto Canuto**, agradeço por todo apoio e ao **Marco Ianner** e **Paulo Gratão**, sou muito grato por vocês terem me ensinado sobre os processamento laboratoriais.

Ao **João Correa e Camilo Venâncio** por cuidarem tão bem dos animais dos experimentos, ajudando durante todo o processo, organização do biotério, cirurgias e eutanásia.

À todos os funcionários da **Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Hospital Santa Casa de Misericórdia de Araçatuba, Santa Casa de Misericórdia de Birigui, UNIMED – Araçatuba.**

Aos **pacientes** atendidos por confiarem suas vidas e permitirem novos aprendizados para que pudéssemos cada vez mais implementar técnicas que trouxessem benefício ao maior número de pessoas possível.

Aos **animais** que serviram ao propósito como modelo de estudo e permitem que novas tecnologias sejam aplicadas em prol do desenvolvimento da ciência e da sociedade.

À **Einco Biomaterial** por fornecer o substituto ósseo utilizado neste trabalho.

Epígrafe

'É preciso sonhar, mas com a condição de crer em nosso sonho. De observar com atenção a vida real, de confrontar a observação com nosso sonho, de realizar escrupulosamente nossas fantasias. Sonhos, acredite neles'

Vladimir Nianou

Machado, T. Efeito do substituto ósseo particulado associado ou não ao MTA na citotoxicidade, resposta tecidual e reparo ósseo em defeitos críticos em calvária de ratos

RESUMO

A utilização de biomateriais que visam devolver o volume ósseo perdido após a perda dentária tem se expandido. O osso é um tecido conjuntivo altamente especializado, possuindo dinâmica aposicional onde o equilíbrio entre neoformação e reabsorção envolve a interação de fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos. Diversas associações de materiais diversos e substitutos ósseos têm sido estudadas, porém, o MTA (Agregado Trióxido Mineral) ainda carece de informações acerca da sua utilização como substituto ósseo ou em associação com demais substitutos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da presença do MTA Angelus Branco® nas proporções de 5%, 10% e 15% em associação com substituto ósseo de Hidroxiapatita e β - Tricálcio Fosfato na citotoxicidade, resposta tecidual e reparo ósseo, em defeito crítico em calvária de ratos. Para tanto, utilizou-se cultura celular da SAOS-2 para avaliação citológica e ensaio MTT do contato direto e eluentes. Também foram utilizados 112 ratos machos Wistar distribuídos em 7 grupos e avaliados em 2 tempos (7 e 28 dias). Após eutanasiados foram submetidos à microtomografia e por coloração de hematoxilina e eosina para análise histológica e histomorfométrica. A análise da homocedasticidade foi realizada pelo teste Shapiro-Wilk, para distinção dos dados paramétricos e não paramétricos. Para análise dos dados paramétricos, foi realizada análise de variância One-Way (ANOVA One-Way) e realizado o pós-teste de Tukey para os parâmetros microtomográficos e para a citotoxicidade foi aplicado o teste de correção de Bonferroni. Para os dados não paramétricos utilizou-se o Kruskal-Wallis e Mann Whitney. Adotou-se o nível de significância de $p < 0,05$. Os parâmetros volume ósseo (BV), porcentagem de volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th) e número de trabéculas (Tb.N) não apresentaram diferenças estatísticas. Sendo o grupo Osteosynt® +15% MTA o grupo com maiores valores médios para os parâmetros BV, BV/TV, Tb.Th e Tb.N. A análise histomorfométrica para neoformação óssea e reabsorção dos biomateriais não apresentaram diferenças estatísticas. De acordo com os resultados, pode-se concluir que, estatisticamente, a adição de MTA nas 3 proporções testadas não demonstrou efetividade quando comparada ao uso isolado dos substitutos ósseos Bio-Oss® e Osteosynt® e coágulo. No entanto, foi evidenciada tendências à superioridade numérica quanto ao volume ósseo neoformado da associação Osteosynt® + 15% MTA aos 7 dias e Osteosynt® + 5% MTA e Osteosynt® + 10% MTA nas análises aos 28 dias.

Palavras chave: 1. Substitutos ósseos 2. Regeneração óssea 3. Sobrevivência celular 4. Ratos

Machado, T. Effect of particulate bone substitute associated or not to MTA on cytotoxicity, tissue response and bone repair in critical defects in rats calvaria

The use of biomaterials that aim to return lost bone volume after tooth loss has expanded. Bone is a highly specialized connective tissue with appositional dynamics where the balance between neoformation and resorption involves the interaction of endocrine, paracrine and autocrine factors. Several associations of different materials and bone substitutes have been studied. However, the MTA (Mineral Trioxide Aggregate) still lacks information about its use as bone substitute or in association with other substitutes. Thus, the aim of this study was to evaluate the influence of presence of MTA Angelus Branco® in the 5%, 10% and 15% proportions in association with Hydroxyapatite and β -Tricalcium Phosphate bone substitute in cytotoxicity, tissue response and bone repair in critical defect in rat calvaria. For this, SAOS-2 cell culture was used for cytological evaluation and MTT assay of direct contact and eluents. We also used 112 male Wistar rats distributed into 7 groups and evaluated at 2 distinct times (7 and 28 days). After euthanasia, the specimens were submitted to microtomography and hematoxylin and eosin staining for histological and histomorphometric analysis. The analysis of homoscedasticity was performed by the Shapiro-Wilk test for distinction of parametric and non-parametric data. For analysis of parametric data, one-way analysis of variance (One-Way ANOVA) was performed and Tukey's post-test was performed for the microtomographic parameters and for the cytotoxicity the Bonferroni correction test was applied. For non-parametric data we used the Kruskal-Wallis and Mann Whitney. The significance level of $p < 0.05$ was adopted. The parameters bone volume (BV), bone volume percentage (BV / TV), bone trabecular thickness (Tb.Th) and number of trabeculae (Tb.N) showed no statistical differences. The Osteosynt® + 15% MTA group was the group with the highest mean values for the parameters BV, BV / TV, Tb.Th and Tb.N. Histomorphometric analysis for bone neoformation and biomaterial resorption showed no statistical differences. According to the results, it can be concluded that, statistically, the addition of MTA in the 3 tested proportions did not show effectiveness when compared to the isolated use of the Bio-Oss® and Osteosynt® bone substitutes and clot. However, trends in numerical superiority regarding the newly formed bone volume of the association Osteosynt® + 15% MTA at 7 days and Osteosynt® + 5% MTA and Osteosynt® + 10% MTA in the analyzes at 28 days were evidenced.

Keywords: 1. Bone graft substitutes 2. Bone regeneration 3. Cell survival 4. Rats

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática dos grupos	29
Figura 2 – Representação esquemática do defeito crítico	31
Figura 3 – Procedimento cirúrgico	32
Figura 4 – Confluência celular	36
Figura 5 – Grupo controle 24h	37
Figura 6 – Grupo controle 48h	37
Figura 7 – Grupo Bio-Oss® 24h	38
Figura 8 – Grupo Bio-Oss® 48h	38
Figura 9 – Grupo Osteosynt® 24h	39
Figura 10 – Grupo Osteosynt® 48h	39
Figura 11- Grupo MTA 24h	40
Figura 12- Grupo MTA 48h	40
Figura 13- Grupo Osteosynt® + 5%MTA 24h	41
Figura 14- Grupo Osteosynt® + 5%MTA 48h	41
Figura 15- Grupo Osteosynt® + 10%MTA 24h	42
Figura 16- Grupo Osteosynt® + 10%MTA 48h	42
Figura 17 - Grupo Osteosynt® + 15%MTA 24h	42
Figura 18- Grupo Osteosynt® + 15%MTA 48h	43
Figura 19- Gráfico para Contato direto	44
Figura 20- Gráfico para Eluentes	45
Figura 21- Microtomografia Grupo Coágulo 7 dias	47
Figura 22- Microtomografia Grupo Coágulo 28 dias	47

Figura 23- Microtomografia Grupo Bio-Oss® 7 dias	48
Figura 24- Microtomografia Grupo Bio-Oss® 28 dias	48
Figura 25- Microtomografia Grupo Osteosynt® 7 dias	50
Figura 26 - Microtomografia Grupo Osteosynt® 28 dias	50
Figura 27- Microtomografia Grupo MTA 7 dias	52
Figura 28- Microtomografia Grupo MTA 28 dias	52
Figura 29- Microtomografia Grupo Osteosynt® + 5%MTA 7 dias	54
Figura 30- Microtomografia Grupo Osteosynt® + 5%MTA 28 dias	54
Figura 31- Microtomografia Grupo Osteosynt® + 10%MTA 7 dias	55
Figura 32- Microtomografia Grupo Osteosynt® + 10%MTA 28 dias	55
Figura 33- Microtomografia Grupo Osteosynt® + 15%MTA 7 dias	57
Figura 34- Microtomografia Grupo Osteosynt® + 15%MTA 28 dias	57
Figura 35- Gráfico Volume ósseo	59
Figura 36- Gráfico Porcentagem do Volume Ósseo	60
Figura 37- Gráfico Espessura do Trabeculado Ósseo	61
Figura 38- Gráfico Separação de Trabéculas	62
Figura 39- Gráfico Número de Trabéculas	63
Figura 40- HE Grupo Coágulo 10x	64
Figura 41- HE Grupo Coágulo 40x 7 dias	65
Figura 42- HE Grupo Coágulo 40x 28 dias	65
Figura 43- HE Grupo Bio-Oss® 10x	66
Figura 44- HE Grupo Bio-Oss® 40x 7 dias	67
Figura 45- HE Grupo Bio-Oss® 40x 28 dias	67
Figura 46- HE Grupo Osteosynt® 10x	68

Figura 47- HE Grupo Osteosynt® 40x 7 dias	69
Figura 48- HE Grupo Osteosynt® 40x 28 dias	69
Figura 49- HE Grupo MTA 10x	70
Figura 50- HE Grupo MTA 40x 7 dias	71
Figura 51- HE Grupo MTA 40x 28 dias	71
Figura 52- HE Grupo Osteosynt® + 5%MTA10x	72
Figura 53- HE Grupo Osteosynt® + 5%MTA 40x 7 dias	73
Figura 54- HE Grupo Osteosynt® + 5%MTA 40x 28 dias	73
Figura 55- HE Grupo Osteosynt® + 10%MTA10x	74
Figura 56- HE Grupo Osteosynt® + 10%MTA 40x 7 dias	75
Figura 57- HE Grupo Osteosynt® + 10%MTA 40x 28 dias	75
Figura 58- HE Grupo Osteosynt® + 15%MTA10x	76
Figura 59- HE Grupo Osteosynt® + 15%MTA 40x 7 dias	77
Figura 60- HE Grupo Osteosynt® + 15%MTA 40x 28 dias	77
Figura 61- Gráfico Neoformação óssea	80
Figura 62- Gráfico Biomateriais	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Escores do infiltrado inflamatório	79
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

β-TCP- Beta-tricálcio-fosfato	14
HA- Hidroxiapatita	14
MTA- Agregado Trióxido Mineral	14
ROI- Região de interesse	34
BV- Volume ósseo	15
BV/TV- Porcentagem de volume ósseo	14
Tb.Th- Espessura do trabeculado ósseo	14
Tb.Sp- Separação de trabéculas	33
Tb.N- Número de trabéculas	14
EDTA- Ácido etileno tetra-acético	34
HE- Hematoxilina e eosina	34

SUMÁRIO

1	Introdução	23
2	Objetivo	26
3	Materiais e Métodos	26
3.1	Ética em estudo animal	26
3.2	Materiais Experimentais	
3.3	Ensaio in vitro	27
3.3.1	Cultura de Células	27
3.3.1.1	Avaliação da morfologia celular por meio do contato direto	27
3.3.1.2	Eluentes	28
3.4	Ensaio in vivo	29
3.4.1	Desenho experimental	29
3.4.2	Procedimento cirúrgico	30
3.4.3	Análise Microtomográfica	32
3.4.4	Histometria	34
3.4.4.1	Análise histomorfométrica	34
3.5	Planejamento Estatístico	35
4	Resultados	37
4.1	Análise in vitro	36
4.1.1	Análise da morfologia celular	36
4.1.2	Ensaio de viabilidade celular (MTT)	44
4.2	Análise in vivo	46
4.2.1	Análise Microtomográfica	46

4.2.2 <i>Análise estatística</i>	59
4.3 <i>Análise histológica</i>	64
4.3.1 <i>Análise descritiva</i>	64
4.3.2 <i>Análise do infiltrado inflamatório</i>	78
4.3.3 <i>Histometria</i>	80
5 <i>Discussão</i>	82
6 <i>Conclusão</i>	88
7 <i>Referências</i>	89
8 <i>Anexo A</i>	93
9 <i>Anexo B</i>	94

1. Introdução

Os estudos sobre o processo de reparo ósseo, bem como acerca da utilização de substitutos ósseos para ganho de volume e altura óssea perdida pela reabsorção fisiológica após perdas dentárias tem representado um desafio constante para pesquisadores em todo o mundo. Avaliar as diferentes possibilidades existentes e fornecer meios de modular o reparo ósseo acelerando o processo de neoformação óssea tem sido uma forte temática dentro da pesquisa odontológica, em reconstruções maxilofaciais. Apesar de o enxerto autógeno ser colocado como “padrão ouro” para tais reabilitações o uso de materiais homólogos, xenólogos e aloplásticos acaba visando diminuir não apenas o tempo de tratamento, mas também o número de procedimentos e evitar acessos cirúrgicos múltiplos para coleta de enxertos e enxertia, permitindo inferior prevalência de convalescência[1, 2], para que assim os pacientes possam receber suas reabilitações implantossuportadas mantendo o alto índice de sucesso alcançado pelos implantes dentários após a descoberta da osseointegração por P I Branemark[3].

A utilização destes biomateriais visa devolver o volume ósseo perdido após a perda dentária tem se expandido e diversas técnicas para tal intento tem sido desenvolvidas. Contudo, o processo de incorporação do biomaterial, onde no momento da implantação, devido ao atraso no reparo ósseo, as condições necessárias para a correta execução da técnica cirúrgica não estejam todas presentes, levando assim a complicações como baixos valores de torque e/ou estabilidade primária deficiente, soltura do material enxertado, baixo índice de contato entre osso viável e implante[4, 5].

O osso é um tecido conjuntivo altamente especializado, possuindo dinâmica aposicional onde o equilíbrio entre neoformação e reabsorção envolvendo a interação de fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos. Os osteoblastos e sua diferenciação possuem papel fundamental neste processo, tendo sua regulação por meio de hormônios, citocinas e diversos fatores de transcrição[6-8].

Diversas associações de materiais têm sido estudadas, contudo o MTA (Agregado Trióxido Mineral) ainda carece de informações acerca da sua utilização como substituto ósseo ou em associação com demais substitutos. O MTA branco em particular é um material odontológico largamente utilizado, com destaque na endodontia como cimento reparador. O MTA teve seu uso em odontologia iniciado na década de 1990 como

cimento reparador para selamento de perfurações patológicas ou iatrogênicas entre o elemento dentário e o meio que o cerca, contudo, suas propriedades favoráveis quanto ao reparo o colocaram como material a ser usado em pulpotomias, capeamentos pulpare diretos apicificações entre outros usos. [9-11].

Estudos prévios demonstram o MTA como sendo um material biocompatível que possui atividade antimicrobiana e induz a formação de tecidos mineralizados[11-15]. Podendo ser encontrado nas cores cinza ou branca, onde a principal diferença pode estar nas concentrações de Al_2O_3 , MgO e FeO , onde as concentrações desses óxidos são consideravelmente menores no MTA branco em comparação com o cinza[16].

Zdrilic e Azevedo (2017) avaliaram as propriedades do MTA enquanto material indutor de regeneração em células do ligamento periodontal e osso alveolar. Para tanto utilizaram um modelo animal transgênico em uma abordagem de mapeamento de destino Cre-LoxP indutível para examinar os efeitos do MTA. Essa abordagem possibilitou avaliar a capacidade reparadora e regenerativa do MTA permitiu identificar pela análise histológica melhor reparo em dentes tratados com MTA, como demonstrado pela maior expansão de células progenitoras e osteoblastos em comparação com dentes do grupo controle[17].

Gandolfi et al. (2017) avaliaram a capacidade osteoindutiva de diferentes cimentos a base de silicato de cálcio (ProRoot MTA, MTA Plus), em tibia de coelhos verificando a resposta tecidual dos materiais quando em contato com a porção medular do osso. Tanto o ProRoot MTA quando o MTA Plus apresentaram capacidade de adesão óssea, sendo que o ProRoot MTA apresentou capacidade de indução da neoformação óssea[18].

Um dos mais difundidos substitutos ósseos é o osso bovino particulado, utilizado para manutenções de rebordos pós-extrações, levantamentos de seio maxilar, aumentos ósseos horizontais e verticais, são técnicas dentro da rotina clínica que comumente são utilizadas pelo clínico. Contudo, o tempo de neoformação óssea ainda denota um longo período para formação e maturação até que o mesmo esteja apto para implantação se subsequente recebimento e dispersão fisiológica de cargas[1].

Schmitt et al. (2015) observaram que após períodos de 5 anos tanto o osso autógeno, osso autógeno associado ao bovino particulado e o osso bovino particulado apresentavam características semelhantes morfolologicamente[19].

Chaves et al. (2012) por sua vez utilizaram o osso bovino particulado em coelhos e demonstraram que a expressão de proteínas como Rank-L e osteocalcina, essenciais

para o reparo, ocorre de maneira satisfatória nesse modelo experimental, indicando um reparo normal mesmo em caso de enxertos inorgânicos, como o caso do osso bovino particulado[20]. Por sua vez Kim DM et al. (2017) avaliaram o efeito de duas diferentes marcas de substitutos ósseos em defeitos críticos em rebordos alveolares de cães, ambos os materiais apresentaram boa biocompatibilidade, e quanto ao volume ósseo formado em comparação com o controle sem enxertia os materiais apresentaram quase duas vezes mais osso neoformado quando em comparação com o grupo controle, além de apresentarem maior preservação de dimensões ósseas mesio-distais e vestibulo-linguais [21]

O material ideal para enxertia e utilização como substituto ósseo deve respeitar conceitos como a osseoindução, osteocondução e osteogênese.[22, 23] Atualmente no mercado não há disponibilidade de tal material, contudo o desenvolvimento de pesquisas que visam o desenvolvimento de um biomaterial ideal para enxertia óssea que se aproxime ao máximo do osso autógeno é uma constante, para tanto, a avaliação das propriedades biológicas de diversos materiais e a associação destes, onde as propriedades de cada material possam vir a trabalhar de forma conjunta para o aumento da capacidade curativa e reabilitadora do mesmo.

O osso particulado tem como finalidade principal permitir a formação de um arcabouço capaz de induzir a neoformação óssea e conduzir as células indiferenciadas da linhagem óssea a migrarem de forma mais rápida e eficaz para a área a ser reparada, permitindo que osso neoformado, vital e viável encontre-se disponível para o procedimento reabilitador [22, 23]. O MTA por sua vez possui propriedades interessantes quando se pensa em reparo ósseo, estimulando diferenciação celular, migração de células indiferenciadas e ação antibiótica[12-15], que ao atuarem de forma sinérgica com o enxerto particulado podem beneficiar o reparo ósseo promovendo um reparo otimizado e possibilitando uma prática clínica mais rápida e eficaz, impactando diretamente na qualidade de vida do paciente alvo das várias modalidades de tratamento onde os enxertos particulados podem vir a ser utilizados. Desta forma a associação do MTA com substitutos ósseos tem sugerido potencial para diminuição do tempo de reparo e maior qualidade óssea no leito enxertado, diminuindo assim o tempo de espera para o paciente em grandes reabilitações.

2. Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da presença do MTA Angelus Branco® (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, Brasil) na citotoxicidade, resposta tecidual e reparo ósseo quando associado a substituto ósseo particulado, utilizando como modelo experimental o defeito crítico de 5 mm em calvária de ratos, através de técnicas histológicas de forma quantitativa e qualitativa.

A hipótese nula apresentada neste estudo foi que a associação do MTA ao material particulado não teve diferenças ao uso isolado de material particulado.

3. Materiais e métodos

3.1 Ética em estudo animal

Previamente ao início do experimento, o projeto de pesquisa foi submetido à apreciação e aprovado pelo comitê de ética no uso do animal (CEUA), processo 175-2019.

3.2 Materiais Experimentais

Foram empregados o cimento reparador MTA Angelus Branco® (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, Brasil) e os substitutos ósseos Osteosynt® (Eincobio, Belo Horizonte, MG, Brasil), e Geistlich Bio-Oss® (Geistlich, Schlieren, Suíça). Os materiais foram manipulados de acordo com as instruções do fabricante e as diferentes proporções foram obtidas a partir de mensuração de massa em balança de precisão.

Desta forma serão proporcionadas da seguinte maneira:

Proporção 1: 0,95g (biomaterial particulado) + 0,05g (MTA)

Proporção 2: 0,90g (biomaterial particulado) + 0,10g (MTA)

Proporção 3: 0,85g (biomaterial particulado) + 0,15g (MTA)

Cimento Reparador MTA Angelus Branco®

MTA Angelus Branco® é um cimento composto de óxidos minerais na forma de finas partículas hidrofílicas. Apresenta na sua composição SiO₂, K₂O, Al₂O₃, Na₂O,

Fe₂O₃, SO₃, CaO, Bi₂O₃ e MgO. Além de resíduos insolúveis de sílica cristalina, óxido de cálcio e sulfatos de potássio e sódio[16].

Geistlich Bio-Oss®

Geistlich Bio-Oss® é um substituo ósseo usado em odontologia. As excelentes propriedades osteocondutivas de Geistlich Bio-Oss® conduzem a uma regeneração óssea previsível e eficiente. As partículas de Geistlich Bio-Oss® se tornam parte integral da estrutura óssea recém-formada e conservam seu volume a longo[24].

Osteosynt® (40:60)

Osteosint® com propriedades osteocondutivas permitindo aumento da quantidade de osso viável em áreas de reabilitações implantossuporadas, possuindo boa biocompatibilidade e previsibilidade. Suas partículas integram-se à matriz óssea permitindo a formação de osso vital[25].

3.3 Ensaio *in vitro*

3.3.1 Cultura de células

O estudo *in vitro* dos materiais avaliados (MTA, Osteosynt®, Bio-Oss® e as associações Osteosynt® + MTA em diferentes concentrações) foram realizadas utilizando células de linhagem Saos-2, amplamente utilizadas em estudos de diferenciação, proliferação e metabolismo ósseo[26-28].

Saos-2 foram cultivadas em meio de cultura in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (fbs) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), estreptomicina (50mg/mL) e 1% coquetel antibiótico/antifúngico (300 U/mL, 300 mg/mL estreptomicina, 5 mg/mL anfotericina B) (Gibco BRL) sob condições standardizadas para cultura celular (37°C, 100% umidade, 95% ar, 5% CO₂)[29].

3.3.1.1 Avaliação da morfologia celular por meio do contato direto

Para avaliar a reação das SAOS-2 quando em contato direto com MTA, Bio-Oss®, Osteosynt® e associações de Osteosynt® + MTA, foram semeadas a uma densidade inicial de 2×10^5 células / lamínula de vidro redonda de 13 mm de diâmetro (Deckgläser, laudakönigshofen, Gemany) até que a cultura atingisse a confluência necessária. Então, as lamínulas com a SAOS-2 foram removidas e incubadas com 1 ml de meio de cultura fresco nas placas com revestimento de MTA, Bio-Oss®, Osteosynt® e associações de

Osteosynt[®] + MTA por 24h e 48h, o grupo controle foi mantido sem o revestimento de material no assoalho dos poços da placa de cultura [30].

Foram utilizadas placas para cultura celular contendo 24 poços. Para o contato direto, a face da lamínula de vidro semeada com SAOS-2 foi colocada virada para o assoalho do poço revestido pelo material, onde a superfície do material manteve-se em contato direto com a SAOS-2.

O experimento foi conduzido em triplicata. Durante o período de incubação de 24h e 48h a morfologia celular foi examinada em cada período sob um microscópio de contraste de fase e fotografado para análise[30].

O 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) foi utilizado para determinar a viabilidade celular[31].

3.3.1.2 Eluentes

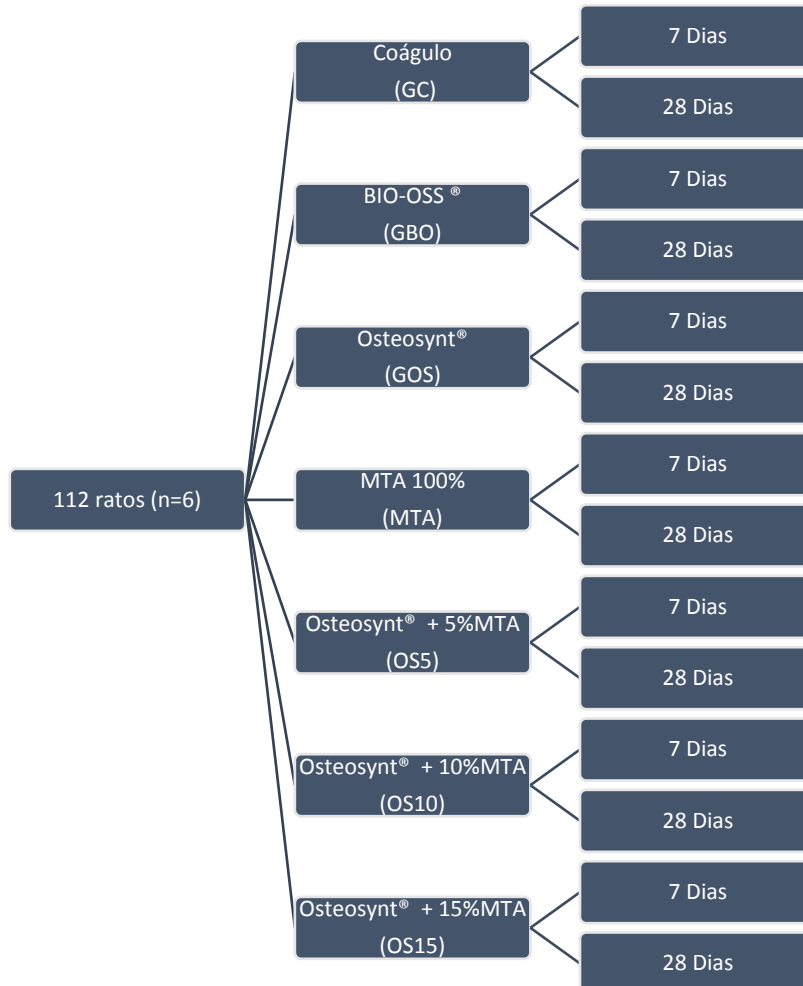
Os materiais em suas diferentes proporções foram manipulados de acordo com as especificações do fabricante, e seus respectivos extratos preparados acomodando os materiais no assoalho de poço em placa de cultura celular de 24 poços, acrescidos de 2mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e incubado em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 37° C por 24h horas. Então, o sobrenadante foi coletado e filtrado em filtro estéril de 0.22µm (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) e os materiais contidos no assoalho dos poços foram descartados, assim, o sobrenadante foi referido como extrato dos respectivos materiais. O extrato não diluído (1/1) e outras quatro diluições (1/2, 1/4, 1/8 e 1/16) foram utilizados[50].

As SAOS- 2 foram semeadas em placa de 96 poços (densidade 10⁵/ poço) e incubadas por 24h em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37°C para permitir a confluência celular. Após confluência celular os extratos foram adicionados aos poços. Os controles foram cultivados sem a presença de nenhum extrato. Após 6, 24 e 48 horas após adição dos extratos a solução de MTT (Sigma-Aldrich) foi adicionada para determinação da viabilidade celular em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nm. O experimento foi feito em triplicata.

3.4 Ensaio *in vivo*

3.4.1 Desenho experimental

Figura 1: Representação esquemática dos grupos experimentais utilizados, que foram divididos igualmente (n=8) em dois tempos de eutanásia, 7 e 28 dias.



Animais

Foram utilizados 112 ratos machos (Wistar), divididos em 7 grupos (n=16) e subdivididos em dois tempos experimentais 7 e 28 dias (n=8), com idades aproximadas

de 30 dias, pesando aproximadamente 250g, sendo provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba UNESP. O conceito da aleatorização foi utilizado para a separação dos grupos.

Os animais foram mantidos em ambientes com temperatura entre 22°C e 24°C, com ciclo de Luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e em gaiolas coletivas, contendo seis ratos por gaiola.

No interior das gaiolas foi utilizado cama de serragem, trocada diariamente. Esses animais foram alimentados antes e durante todo o período experimental, com ração sólida triturada e água “*ad libitum*”, exceto para as 12 horas pré e pós-operatórias.

Anestésico

Após 12 horas de jejum os animais serão submetidos à sedação por meio da 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), 5mg/Kg[32].

3.4.2. Procedimento cirúrgico

Após indução anestésica, foi realizada tricotomia na região fronto-parietal posicionamento do animal em decúbito ventral horizontal, antissepsia da área com PVPI 10% tópico e aposição de campos estéreis. Em seguida foi realizado o acesso cirúrgico com incisão em formato de “V”. O retalho total foi rebatido e realizado o afastamento com os descoladores para exposição do osso parietal de ambos os lados. Com uma trefina cirúrgica de diâmetro interno de 4 mm e externo de 5 mm, e com auxílio de um motor de baixa rotação foi realizada a osteotomia na região mediana entre os parietais até a cortical interna. O osso parietal osteotomizado será removido e a dura-máter mantida intacta, deixando um defeito de tamanho crítico (DTC) de 5mm de diâmetro[32].

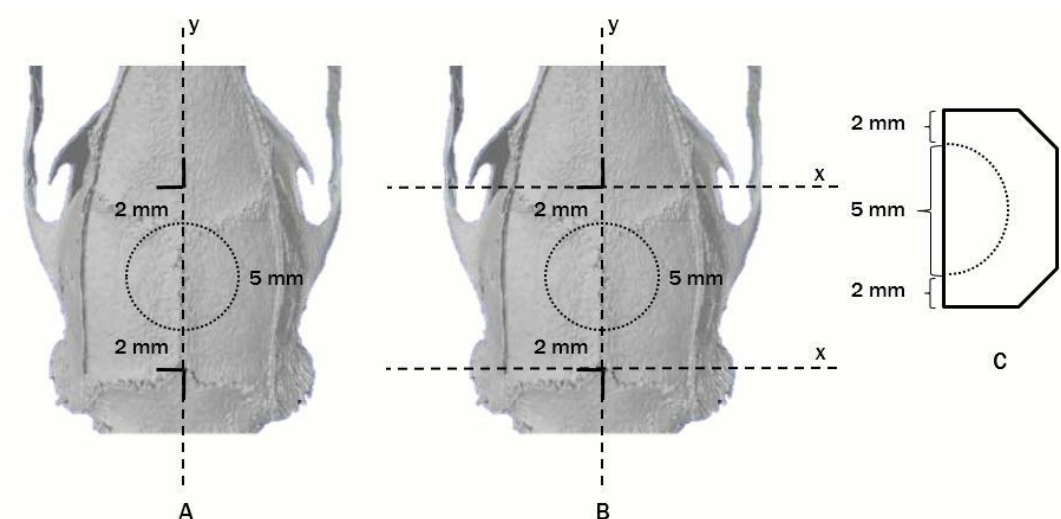


Figura 2: Representação esquemática das referências do defeito crítico.

O defeito ósseo foi realizado em 112 animais, divididos em 7 grupos, e preenchidos com coágulo sanguíneo, MTA, Bio-Oss®, Osteosynt® ou associação entre MTA e Osteosynt®, de acordo com o grupo que se enquadra. Finalizado o enxerto, o retalho total foi reposicionado, a sutura foi realizada com fio de Nylon 5-0 (ETHILON Nylon Suture®, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) por pontos simples interrompidos.

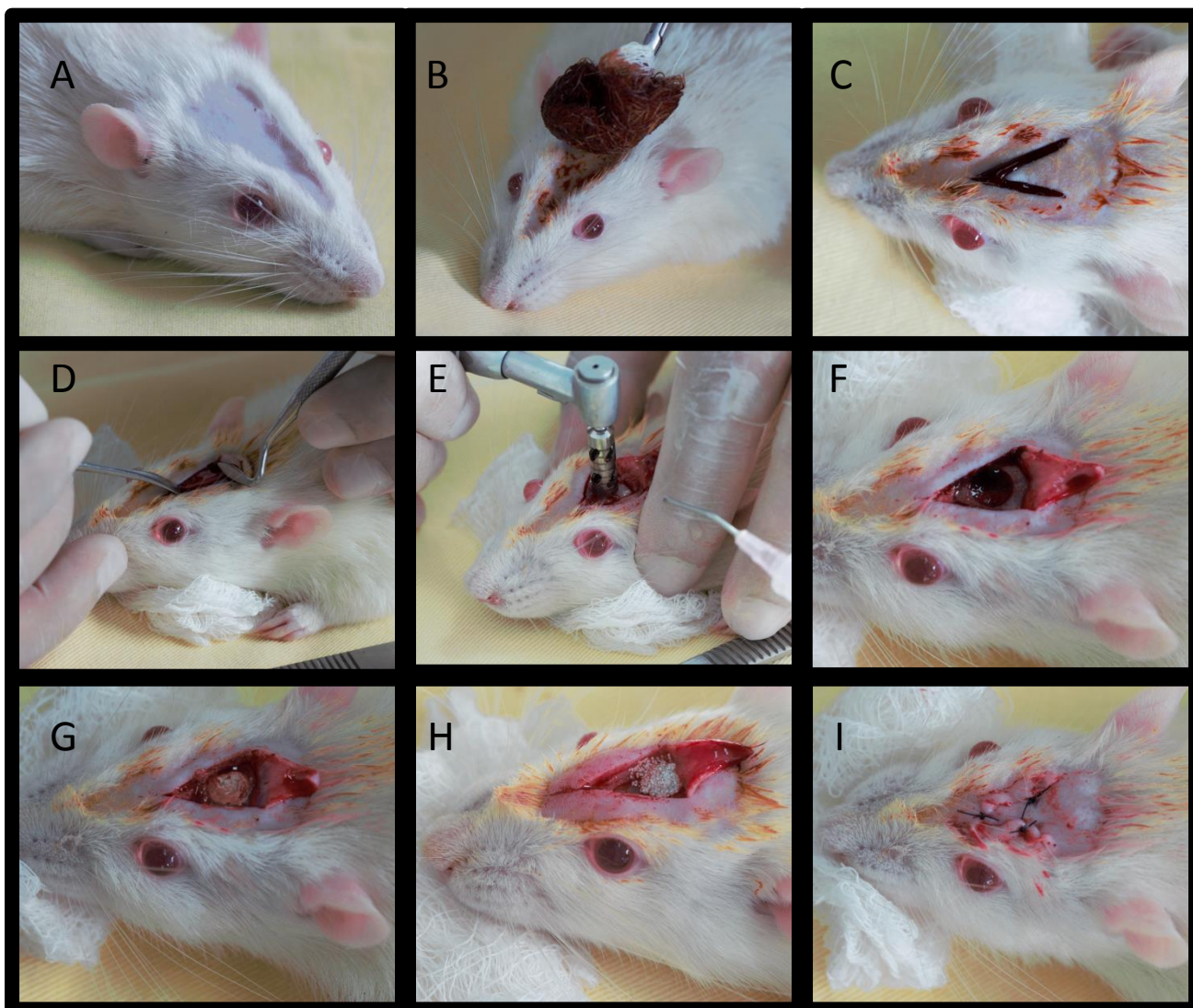


Figura 3: A- Tricotomia; B- Degermação com PVPI; C- Acesso cirúrgico em “V” em região fronto-parietal; D- Descolamento dos tecidos; E- Trefinamento com copiosa irrigação; F- Defeito ósseo criado ocupado pelo coágulo G- Defeito ósseo criado preenchido pelo MTA; H- Defeito ósseo criado ocupado por substituto ósseo particulado; I- Sutura por pontos simples interrompidos.

3.4.3. Análise Microtomográfica

Por meio do microtomógrafo Skyscan (SkyScan 1272 Bruker MicroCT, Aartselaar, Bélgica), 3 amostras escolhidas aleatoriamente em cada grupo foram escaneadas a fim de efetuar a análise. As peças foram microtomografadas utilizando cortes de 11µm de espessura, com a energia da fonte de radiação programada em 70 kV com corrente de

142 uA, fazendo uso de filtro de Al 0,5 + Cu 0,038, passo de rotação de 0.5mm e resolução de aquisição de imagem de 2016 X 1344 pixels, tendo sido captadas 2 imagens por passo de rotação. Totalizando com esta configuração um tempo de tomada de 58 minutos e 30 segundos. As imagens captadas foram armazenadas em formato (TIFF) em uma pasta identificada com o nome do respectivo grupo e posteriormente reconstruídas através do software NRecon (SkyScan 2011, Versão 1.6.6.0, Bruker, Bélgica), com a configuração de smoothing: 5, ring artefacts correction: 7, beam hardening correction: 30%, faixa de imagem dinâmica mínima de 0.0028 e máxima de 0.11, proporcionando imagens ideais para análise.

Com o auxílio do software Data Viewer (SkyScan, versão 1.4.4 64-bit, Bruker, Bélgica) os dados das imagens (DATA) foram emulados nos eixos X, Y e Z, e assim, foi possível observar as imagens nas orientações coronal X-Z, sagital Z-Y e transaxial X-Y. Em seguida, as imagens foram realinhadas em relação ao plano mediano e o novo DATASET reordenado foi salvo em uma pasta nomeada (DV – coronal) para análise da região de interesse (*Region of interest* - ROI). Posteriormente, fazendo uso do software CT Analyser (2003-11SkyScan, 2012 BrukerMicroCT versão 1.12.4.0, Bruker, Bélgica), as imagens das pastas DVs foram acessadas, para a determinação da área de interesse, utilizando ROI circular com raio de 3mm e posicionado superiormente ao defeito ósseo, selecionando 20 *slices* inferiormente posicionados para que fosse feita a interpolação dinâmica da área de interesse e posterior análise tridimensional (3-D).

A avaliação através do polígono interpolado foi realizada por meio da mensuração da porção mais central do acesso realizado com trefina de 5mm baseando-se pelo diâmetro perpendicular ao plano sagital mediano. O software CT Analyser analisa e mede a imagem de acordo com a escalas de cinza (threshold). O threshold utilizado na análise foi de 31-153 tons de cinza, que possibilitou obter os parâmetros microtomográficos ósseo na área.

Com finalidade didática, foi possível a reconstrução e manipulação em três dimensões de todas as amostras por meio do software CTvox (SkyScan, versão 2.7, Bruker, Bélgica).

Por fim, seguindo as guidelines da *Journal of Bone and Mineral Research* de Bouxsein et al. 2010, foram analisados os dados de volume ósseo (BV), porcentagem do volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th), separação de trabéculas (Tb.Sp) e número de trabéculas (Tb.N)[33].

3.4.4.Histometria

A área do defeito cirúrgico original e os tecidos circunjacentes foram removidos em bloco. Após descalcificação inicial por 8 semanas em solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10%, cada espécime foi dividido longitudinalmente em dois blocos, exatamente ao longo do centro do defeito cirúrgico original. Cortes transversais foram então realizados usando o menor eixo como referência, permitindo a identificação precisa das margens do defeito cirúrgico original durante os procedimentos de análises de imagens. Após um período de descalcificação adicional de 3 semanas, as peças foram processadas e incluídas em parafina. E, então, realizados cortes semi-seriados com 5 µm de espessura na direção longitudinal, corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) para análise histomorfométrica [34].

3.4.4.1. Análise histomorfométrica

Após a coloração das lâminas em HE (Merck & Co., Inc.) as mensurações foram realizadas utilizando uma lupa (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland) acoplado a uma câmera de captação de imagem (LeicaR DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um microcomputador com um software analisador de imagens digitalizadas ImageJ (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontario, Canadá). As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos JPEG para posterior análise. A análise quantitativa dos defeitos foi realizada em todos os cortes corados com HE. Foram capturados e registrados um campo em objetiva de 10x e cinco campos em objetiva de 40x abrangendo duas áreas periféricas e um central do defeito, a fim de se proceder a morfometria das células utilizando software ImageJ[35]. Na aba Plugins foi utilizada a ferramenta Grid para a confecção de um retículo contendo 130 cruces. Com a ferramenta Cell counter foram contabilizadas somente as estruturas que coincidiam com a intersecção das cruces, denominados de pontos. A soma dos 5 campos resultaram em uma média de tecido ósseo neoformado e de biomaterial presente em cada animal.

A análise qualitativa do processo inflamatório constitui na descrição dos fenômenos inflamatórios observados microscopicamente nos cortes teciduais representativos de cada grupo e tempos pós-operatórios.

A análise quantitativa foi realizada através da atribuição de escores, graduando a importância dos fenômenos microscópicos observados separadamente. Será realizada a determinação das condições microscópicas das estruturas examinadas, em itens distintos, e avaliadas sob a forma de escores de 0 a 3 0: nenhuma ou poucas células inflamatórias e nenhuma reação. 1: <25 células e reação leve; 2: Entre 25 e 125 células e reação moderada; 3: 125 ou mais células, para resposta inflamatória[36].

3.5 Planejamento estatístico

Para a análise estatística dos dados quantitativos foi utilizado o software GraphPad Prism® 7.04 (La Jolla, CA, USA). A análise da homocedasticidade foi realizado pelo teste de Shapiro-Wilk para distinção dos dados paramétricos e não paramétricos. Para análise dos dados paramétricos, foi realizada análise de variância One-Way (ANOVA One-Way) dos valores de micro-CT de volume ósseo (BV), porcentagem do volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th), separação e número de trabéculas (Tb.Sp e Tb.N) e então realizado o pós-teste de Tukey. Para o ensaio de MTT tanto para o contato direto como para os eluentes foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguido do teste de correção de Bonferroni. Para os dados não paramétricos (osso neoformado, biomateriais e infiltrado inflamatório) foram utilizados os testes Kruskal Wallis e Mann Whitney. Adotou-se o nível de significância de $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Análise *in vitro*

4.1.1 Análise da morfologia celular

A avaliação das alterações morfológicas sofridas pelas células da linhagem celular SAOS-2.

Tempo 0 (Confluência)

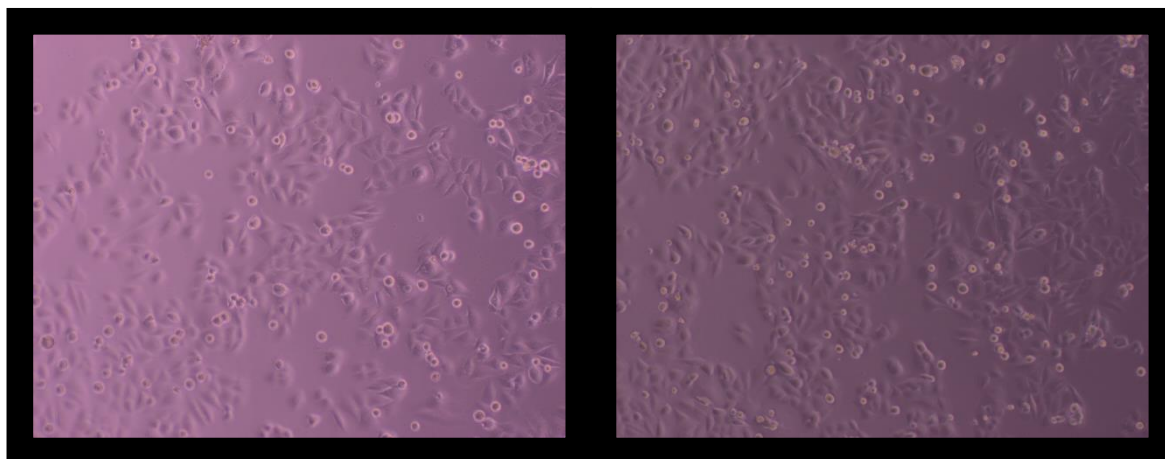


Figura 4: Células distribuídas de forma uniforme pela área observada, apresentando a conformação fusiforme (como fibroblastos), disposta em colônias, por toda a lamínula como tapete.

Grupo Controle

24h

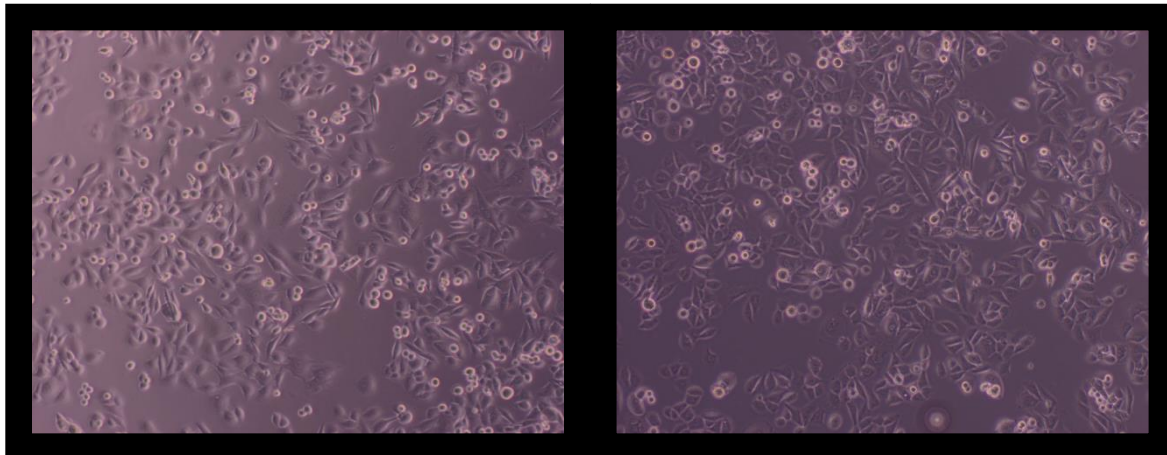


Figura 5: Manutenção da distribuição uniforme e conformação fusiforme em toda a área observada.

48h

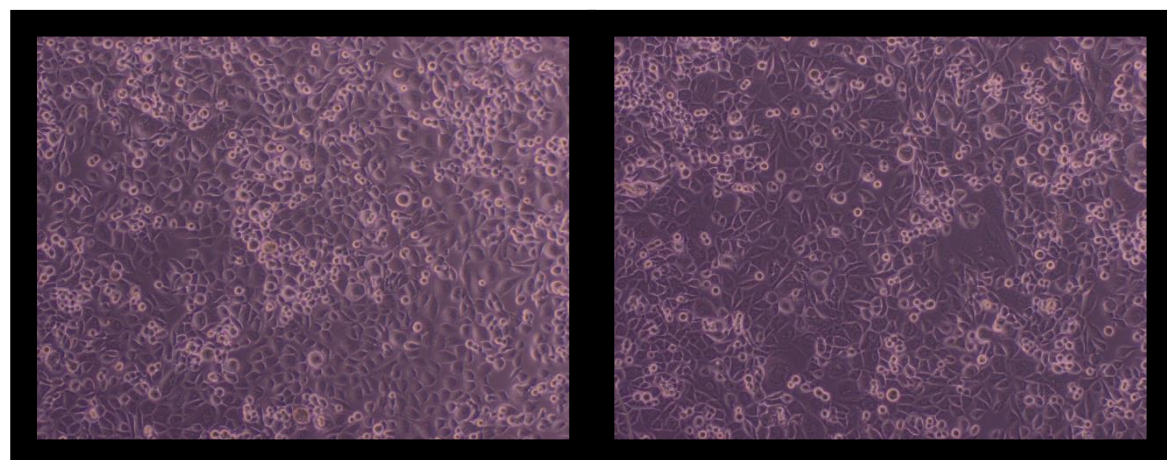


Figura 6: Aumento da quantidade de células, dispostas de forma uniforme por toda a superfície em camada única, células fusiformes em sua maioria.

24h

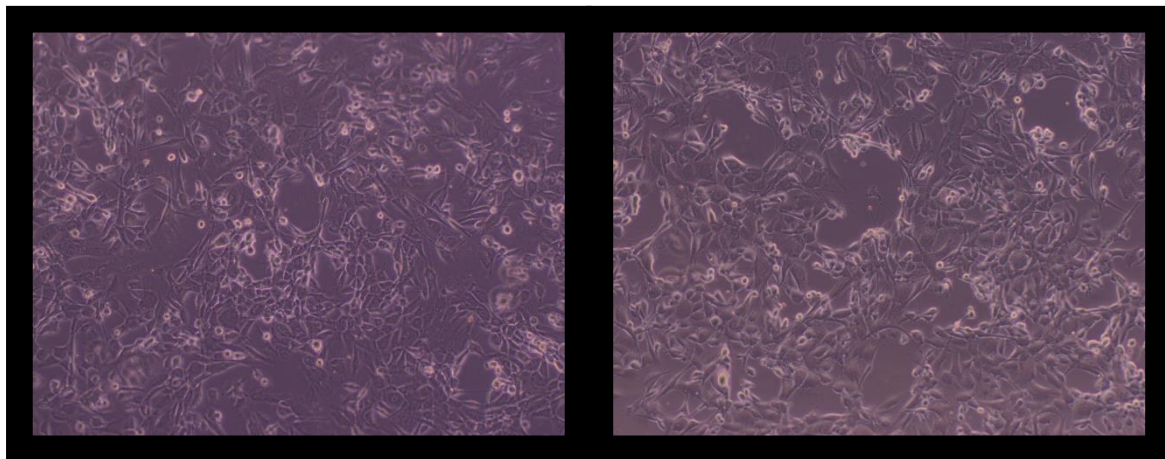


Figura 7: Apresenta início de alteração da conformação celular, núcleos com aparência normal, algumas figuras de mitose, formação de pseudópodes e organização justaposta aos espaços ocupados pelos grânulos do biomaterial.

48h

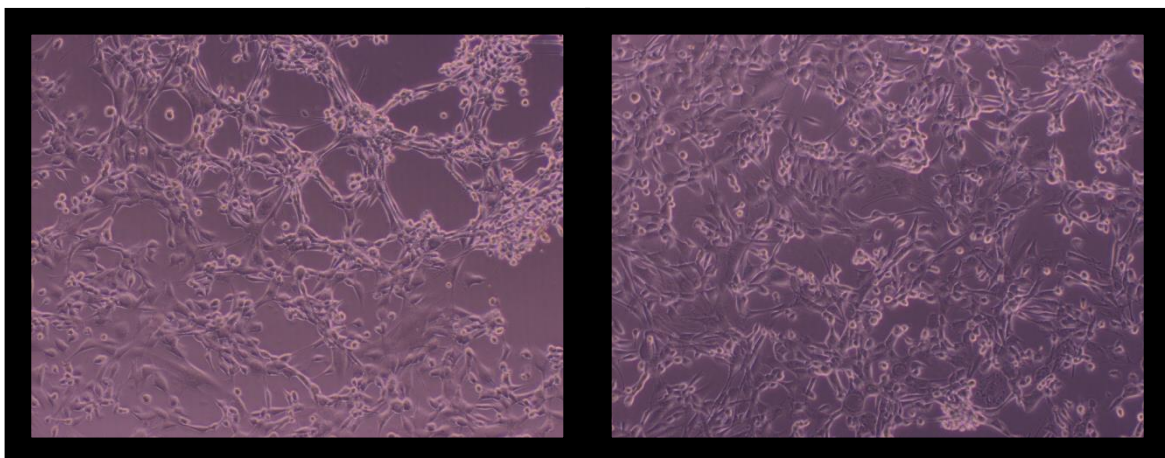


Figura 8: Células dispostas ao redor dos espaços ocupados pelos grânulos do material, núcleos com aparência normal, figuras de mitose, pseudópodes bem desenvolvidos e formação de intrincada rede ao redor dos espaços entre os grânulos.

Grupo Osteosynt®

24h

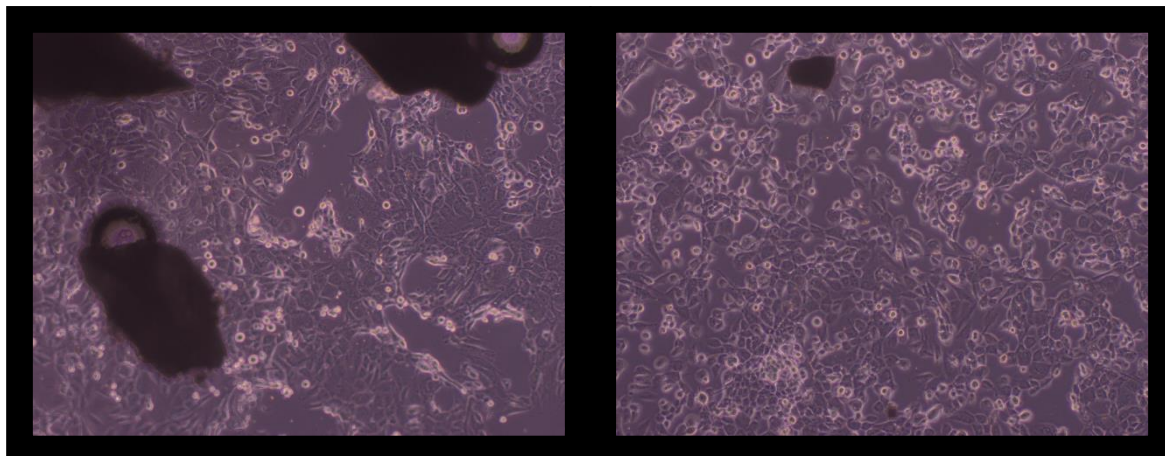


Figura 9: Imagem sugestiva de alteração da conformação celular devido ao contato com o material, núcleos com aparência normal, algumas figuras de mitose, apresentando pseudópodes e íntima organização ao redor dos espaços ocupados pelos grânulos do biomaterial.

48h

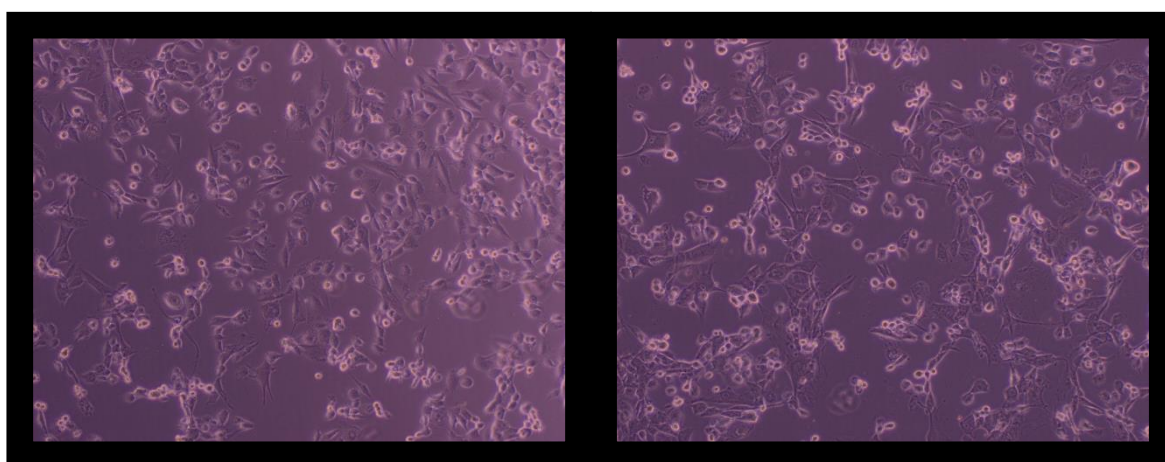


Figura 10: Células dispostas ao redor dos espaços ocupados pelos grânulos do material, núcleos normais, figuras de mitose, pseudópodes iniciando formação de rede, início de ocupação dos espaços intergranulares.

Grupo MTA

24h

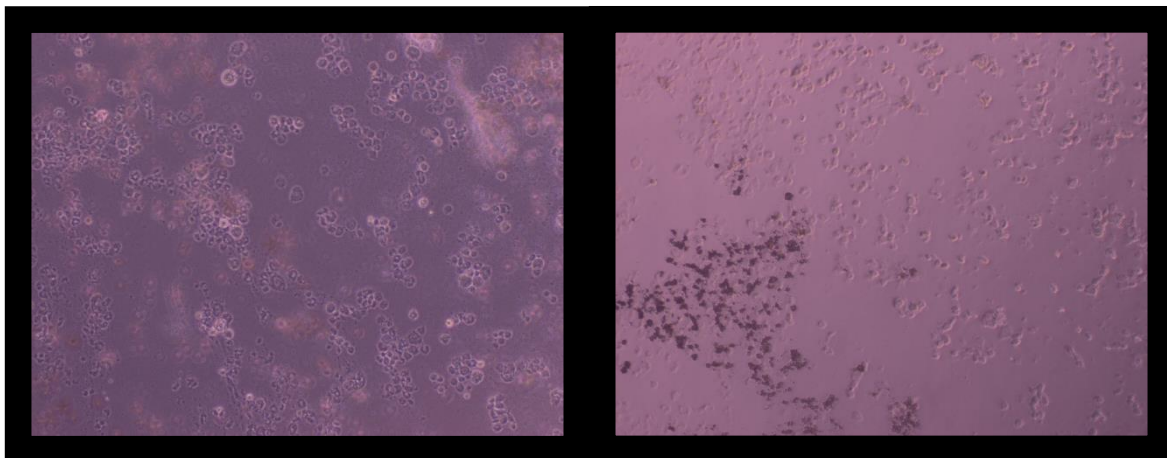


Figura 11: Presença de poucas células viáveis e sombras de restos celulares após apoptose.

48h

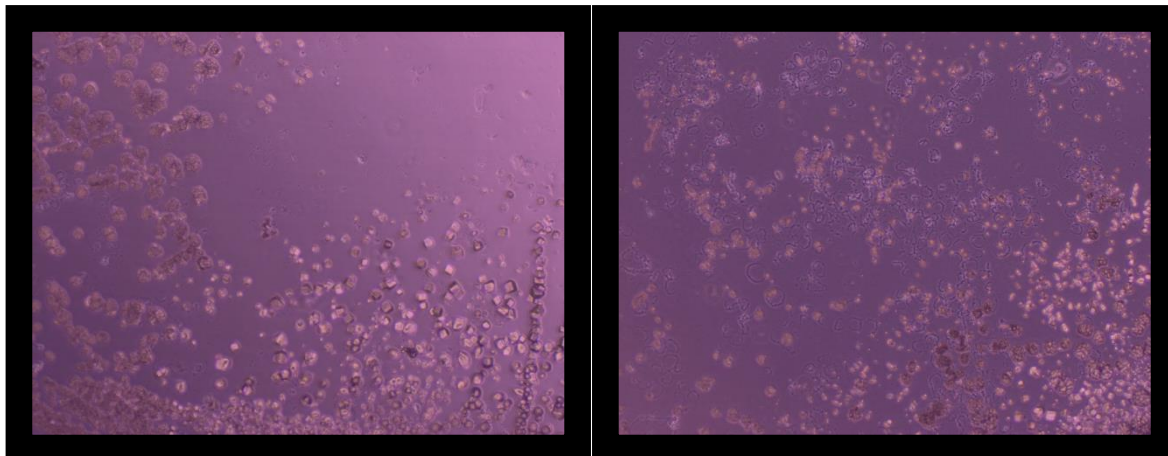


Figura 12: Ausência de células viáveis, apresentando apenas sombras formadas por restos celulares e adesão do material à lamínula.

Grupo Osteosynt[®] + 5% MTA

24h

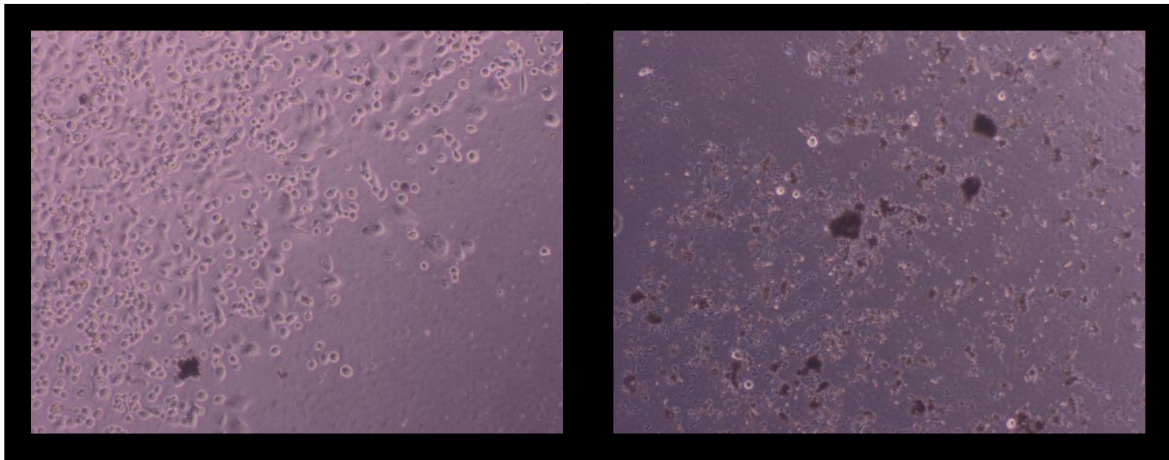


Figura 13: Imagem apresenta quantidade mediana de células viáveis, células com conformação fusiforme, poucas células apresentando início de alteração morfológica e pseudópodes, áreas com ausência de células viáveis apresentando sombras de restos celulares após apoptose.

48h

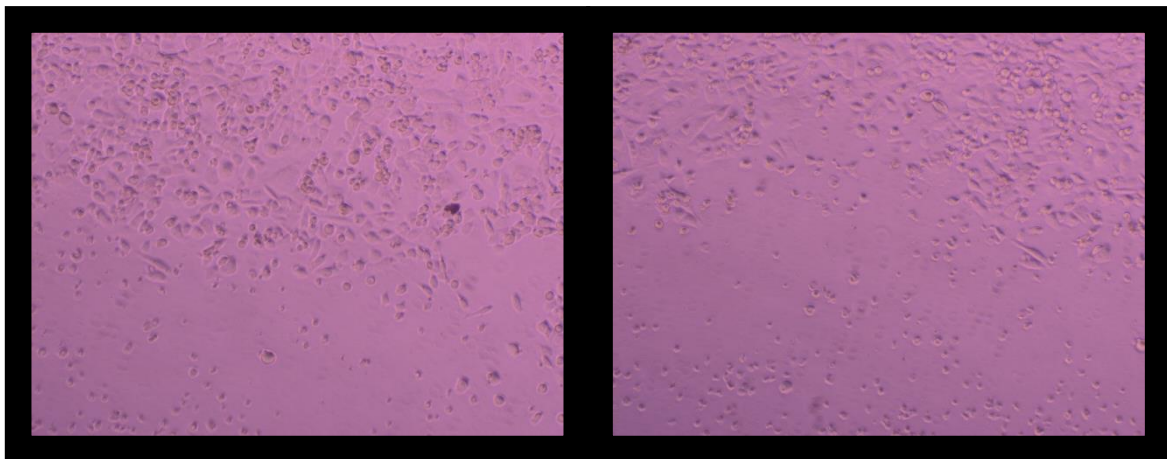


Figura 14: Células iniciando alteração morfológica, núcleos com aparência normal e raras figuras de mitose, pseudópodes em estágio inicial de formação, células dispersas e não organizadas ao redor do material.

Grupo Osteosynt® + 10% MTA

24h

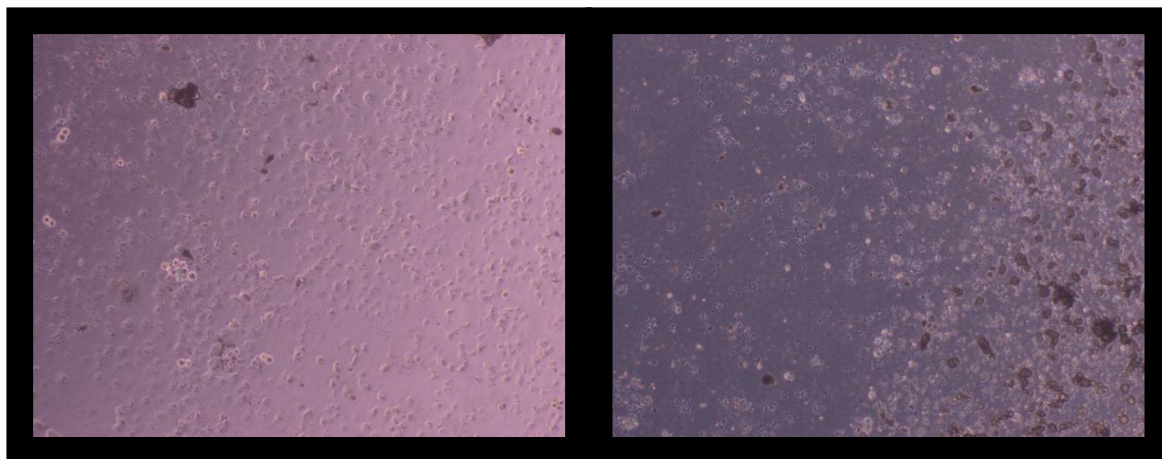


Figura 15: Imagem sugestiva de ausência parcial de células viáveis sem alteração morfológica, restos celulares após apoptose.

48h

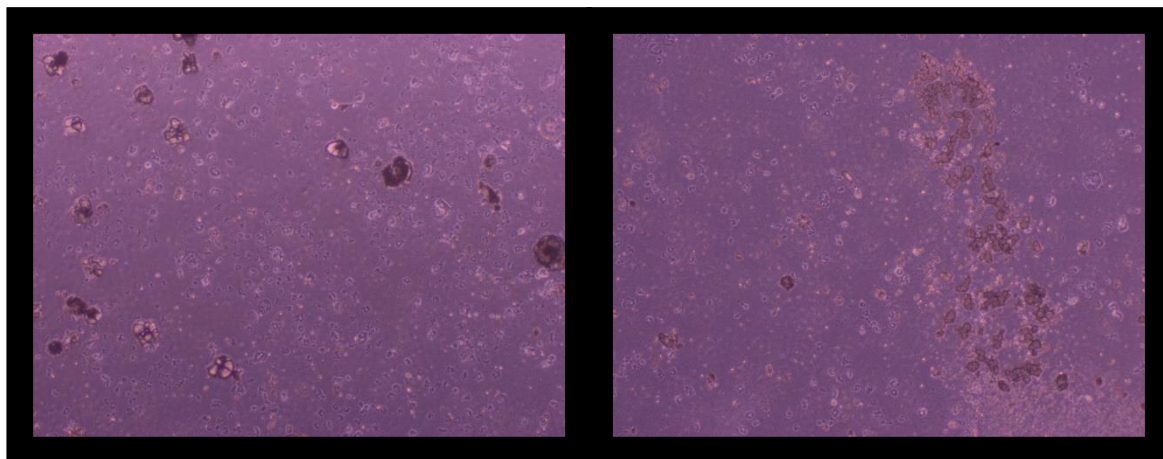


Figura 16: Ausência quase completa de células viáveis, as poucas células presentes, sombras de restos celulares.

Grupo Osteosynt[®] + 15% MTA

24h

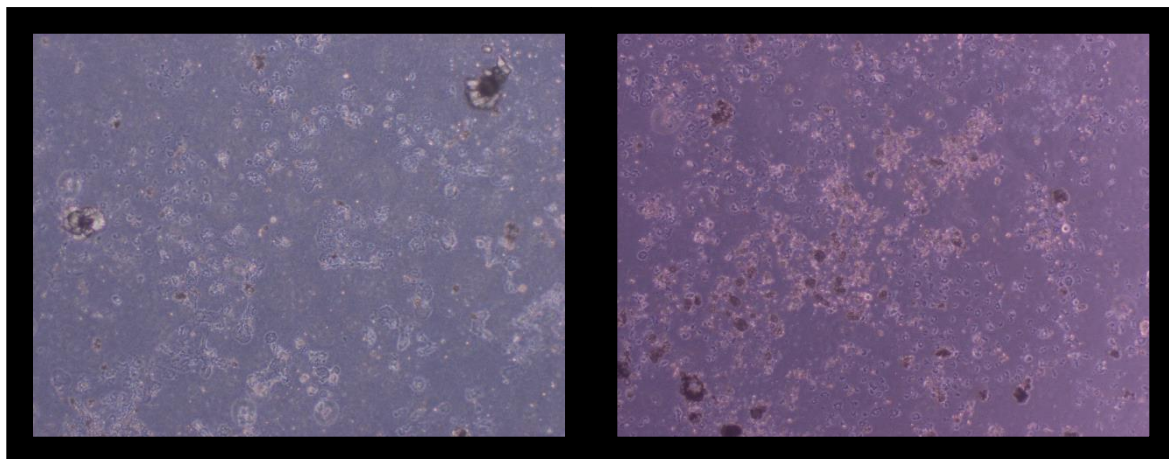


Figura 17: Apenas restos celulares após apoptose.

48h

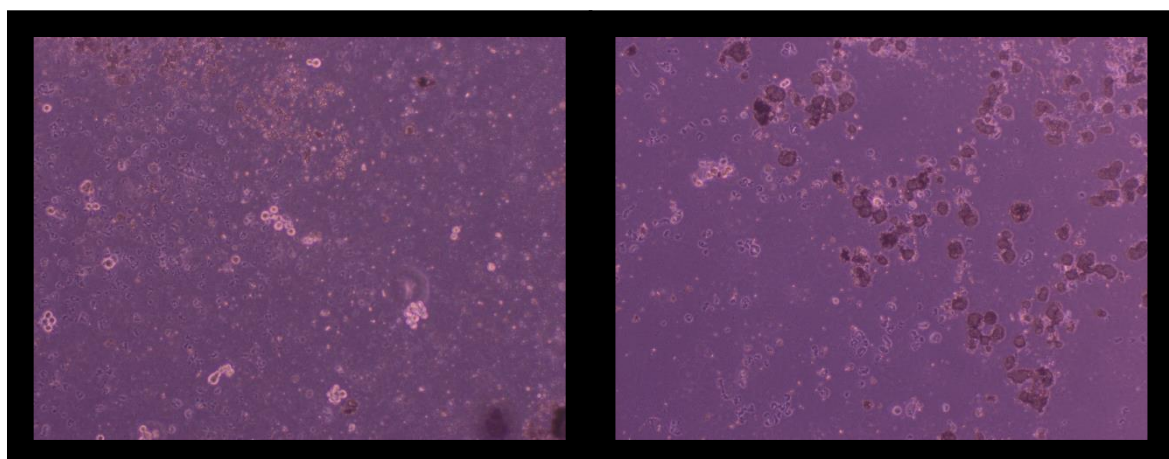


Figura 18: Poucas células presentes, sem aderência, sombras de restos celulares.

4.1.2- Ensaio de viabilidade celular (MTT)

Avaliação pelo Contato direto

A avaliação da viabilidade celular, por meio do ensaio MTT, apresentou para o contato direto entre a cultura celular (SAOS-2) e os materiais testados para o período de 24h os Grupos Controle, Bio-Oss® e Osteosynt não apresentaram diferenças estatísticas significantes, já os demais grupos apresentaram para o período de 24h acentuada diminuição da viabilidade celular em contato direto quando comparados ao grupo Controle. O grupo Osteosynt® + 5% MTA apresentou numericamente ao período de 24h maior viabilidade celular quando comparado aos demais grupos suplementados com MTA.

Para o tempo de 48h todos os grupos obtiveram valores significativamente menores, no tocante à viabilidade celular, quando comparados ao grupo controle.

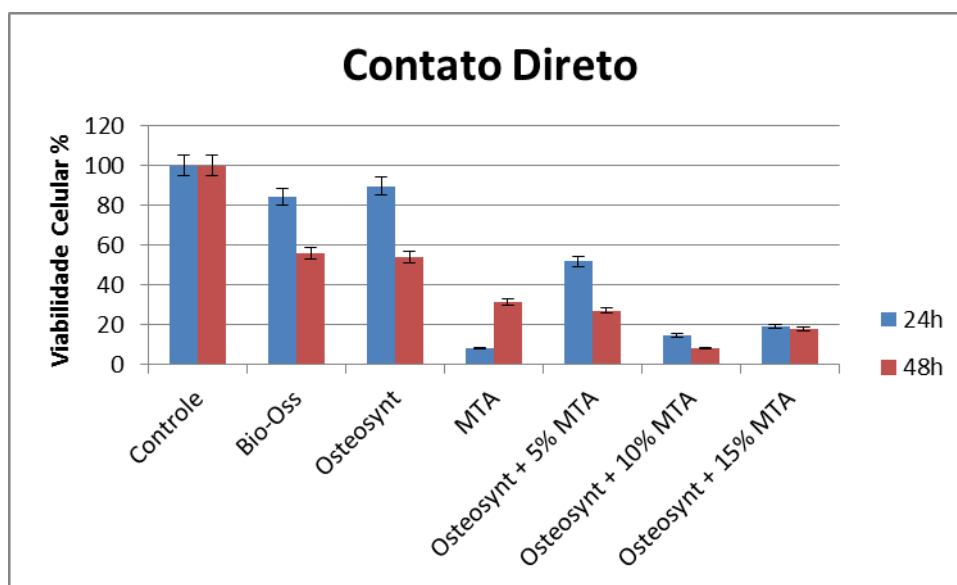


Figura 19: gráfico comparativo entre grupos e períodos para o contato direto célula-biomaterial.

Eluente

A avaliação da viabilidade celular referente aos eluentes liberados pelos biomateriais testados não apresentou valores estatisticamente diferentes, mantendo para todas as diluições valores semelhantes, tanto quando comparados os períodos de 6, 24 e 48h, bem como todos os grupos testados.

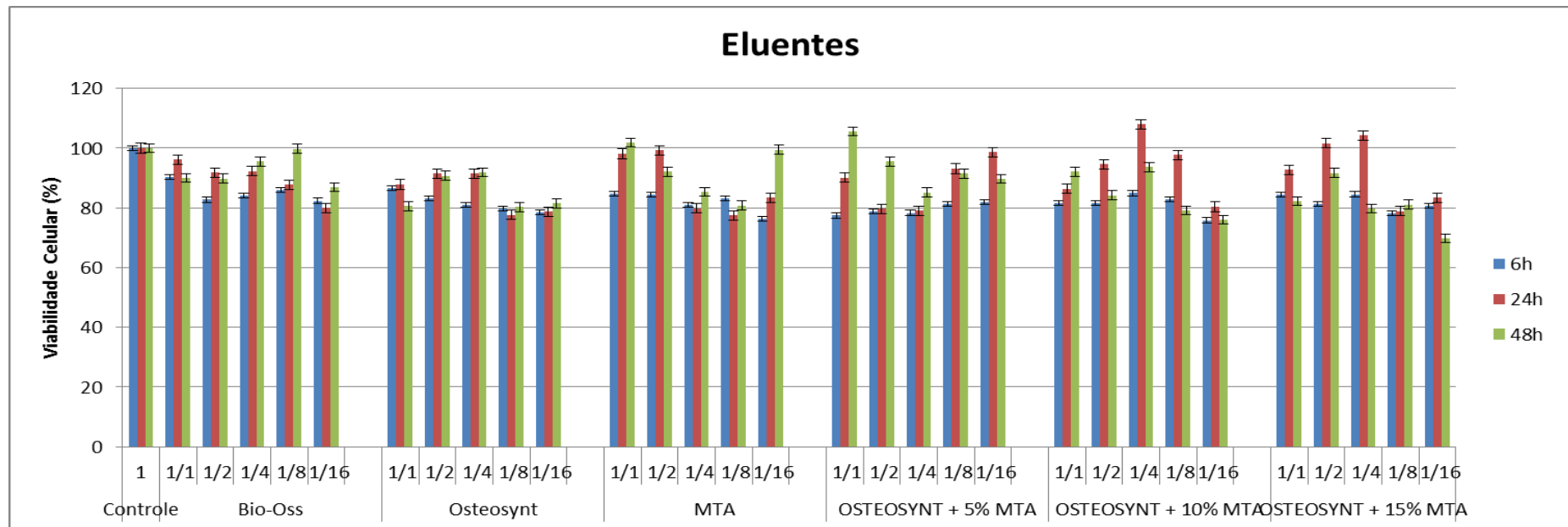


Figura 20: Gráfico comparativo entre grupos e períodos relativo aos eluentes liberados pelos materiais testados, presente nos extratos utilizados.

4.2. Análise *in vivo*

4.2.1. Análise Microtomográfica

Análise descritiva dos achados imaginológicos

Os achados tomográficos foram descritos a partir da imagem mais representativa de cada grupo em seus respectivos períodos de 7 e 28 dias. A descrição foi baseada em imagens renderizadas dos espécimes representativos com a utilização de filtros específicos, sugestivos de densidade do material e atividade biológica. Também foi descrita a característica de cortes axiais e coronais.

Grupo Coágulo

7 dias



Figura 21: **A-** filtro para tecido mineralizado apresentando a renderização da área de interesse na peça óssea, apresentando bordas regulares, sem sinais de neoformação óssea ; **B-** corte coronal da porção mediana do defeito ósseo, evidenciando a espessura da peça óssea, e ausência de corticalização das paredes do defeito crítico; **C-** corte axial da região do defeito crítico, indicando regularidade da área do defeito ósseo sem áreas de neoformação óssea.

28 dias



Figura 22: **A-** filtro para tecido mineralizado apresentando a renderização da área de interesse na peça óssea, apresentando bordas irregulares, com sinais de neoformação óssea ; **B-** corte coronal da porção mediana do defeito ósseo, evidenciando a espessura da peça óssea, e presença de corticalização das paredes do defeito crítico; **C-** corte axial da região do defeito crítico, indicando alterações nas bordas do defeito crítico e a presença de áreas de neoformação óssea.

Grupo Bio-Oss®

7 dias



Figura 23: **A-** filtro para tecido mineralizado apresentando a renderização da área de interesse na peça óssea, apresentando bordas regulares, sem sinais aparentes de neoformação óssea e disposição dos grânulos do biomaterial; **B-** corte coronal da porção mediana do defeito ósseo, evidenciando a espessura da peça óssea, e ausência de corticalização das paredes do defeito crítico, distribuição do biomaterial utilizado; **C-** corte axial da região do defeito crítico, indicando regularidade da área do defeito ósseo sem áreas indicativas de neoformação e presença de grânulos do biomaterial.

28 dias



Figura 24: **A-** filtro para tecido mineralizado apresentando a renderização da área de interesse na peça óssea, apresentando bordas irregulares, com sinais indicativos de neoformação óssea a partir da borda do defeito e ao redor dos grânulos do biomaterial ; **B-** corte coronal da porção mediana do defeito ósseo, evidenciando a espessura da peça óssea, corticalização das paredes do defeito crítico, distribuição do biomaterial

utilizado, sinais indicativos de neoformação óssea ao redor dos grânulos de biomaterial ;
C- corte axial da região do defeito crítico, indicando irregularidade da área do defeito ósseo com áreas indicativas de neoformação a partir da borda do defeito e dos grânulos do biomaterial.

Grupo Osteosynt®

7 dias



Figura 25: **A-** filtro para tecido mineralizado apresentando a renderização da área de interesse na peça óssea, apresentando bordas regulares, sem sinais aparentes de neoformação óssea e disposição dos grânulos do biomaterial ; **B-** corte coronal da porção mediana do defeito ósseo, evidenciando a espessura da peça óssea, e ausência de corticalização das paredes do defeito crítico, distribuição do biomaterial utilizado; **C-** corte axial da região do defeito crítico, indicando regularidade da área do defeito ósseo sem áreas indicativas de neoformação e presença de grânulos do biomaterial.

28 dias



Figura 26: **A-** filtro para tecido mineralizado apresentando a renderização da área de interesse na peça óssea, apresentando bordas irregulares, com sinais indicativos de neoformação óssea a partir da borda do defeito e ao redor dos grânulos do biomaterial ; **B-** corte coronal da porção mediana do defeito ósseo, evidenciando a espessura da peça óssea, corticalização das paredes do defeito crítico, distribuição do biomaterial

utilizado, sinais indicativos de neoformação óssea ao redor dos grânulos de biomaterial ;
C- corte axial da região do defeito crítico, indicando irregularidade da área do defeito ósseo com áreas indicativas de neoformação a partir da borda do defeito e dos grânulos do biomaterial.

Grupo MTA

7 dias



Figura 27: **A-** Ao filtro para tecido mineralizado é possível observar a distribuição do material testado, adesão às bordas do defeito crítico em calvária, em todo o perímetro do defeito ósseo a peça óssea apresenta-se enegrecida ao ser exposta ao filtro para evidênciação de tecidos mineralizados, porém apresenta manutenção de densidade e textura; **B-** Ao corte coronal é possível observar a distribuição do material de forma linear acompanhando o formato da peça óssea apresentando hiperdensidade na região ocupada pelo material. Também é possível avaliar a diminuição da espessura da placa óssea na região adjacente ao defeito ósseo, sugerindo reabsorção óssea; **C-** O corte axial apresenta imagem hiperdensa em toda a região da borda do defeito crítico.

28 dias



Figura 28: **A-** Ao filtro para tecido mineralizado é possível observar a distribuição do material testado, adesão às bordas do defeito crítico em calvária, quando comparado ao período de 7 dias a região enegrecida apresentou considerável diminuição, as áreas

enegrecidas apresentam manutenção de densidade e textura; **B-** Ao corte coronal é possível observar a distribuição do material de forma linear acompanhando o formato da peça óssea apresentando hiperdensidade na região ocupada pelo material. Também é possível avaliar a diminuição da espessura da placa óssea na região adjacente ao defeito ósseo, sugerindo reabsorção óssea e corticalização das paredes ósseas; **C-** O corte axial apresenta imagem hiperdensa em toda a região da borda do defeito crítico.

Grupo Osteosynt® + 5% MTA

7 dias



Figura 29: **A-** Ao filtro para tecido mineralizado é possível observar a distribuição do material testado, preservação das bordas e dimensões do defeito crítico em calvária; **B-** Ao corte coronal é possível verificar a manutenção do espaço medular da região frontoparietal e ausência de corticalização das paredes do defeito, distribuição do material de forma linear e respeitando a espessura da peça óssea; **C-** O corte axial apresenta imagem hipodensa em relação aos grânulos entremeando os espaços compreendidos entre os mesmos, compatível com neoformação óssea .

28 dias



Figura 30: **A-** Ao filtro para tecido mineralizado é possível observar a distribuição do material testado, alteração leve das bordas e dimensões do defeito crítico em calvária; **B-** Ao corte coronal é possível verificar a manutenção do espaço medular da região frontoparietal e ausência de corticalização das paredes do defeito, distribuição do material de forma linear e respeitando a espessura da peça óssea; **C-** corte axial da região do defeito crítico, indicando irregularidade da área do defeito ósseo com áreas indicativas de neoformação a partir da borda do defeito e dos grânulos do biomaterial.

Grupo Osteosynt® + 10% MTA

7 dias

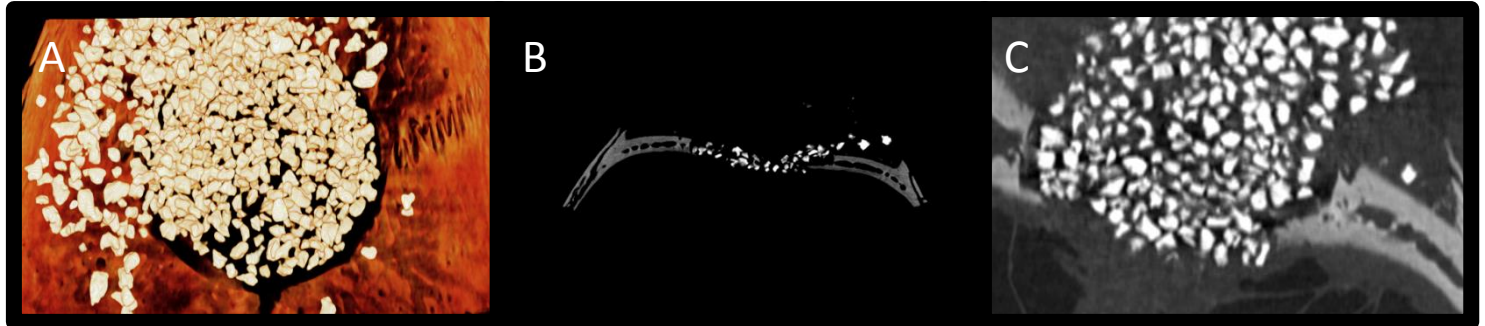


Figura 31: **A-** Ao filtro para tecido mineralizado é possível observar a distribuição do material testado, preservação das bordas e dimensões do defeito crítico em calvária; **B-** Ao corte coronal é possível verificar a manutenção do espaço medular da região frontoparietal e ausência de corticalização das paredes do defeito, distribuição do material de forma linear e respeitando a espessura da peça óssea; **C-** O corte axial apresenta imagem hipodensa em relação aos grânulos entremeando os espaços compreendidos entre os mesmos, compatível com neoformação óssea.

28 dias



Figura 32: **A-** Ao filtro para tecido mineralizado é possível observar a distribuição do material testado, alteração leve das bordas e dimensões do defeito crítico em calvária, pequenas áreas com maior densidade entremeando os grânulos sugerindo dinâmica aposicional e neoformação óssea; **B-** Ao corte coronal é possível verificar a manutenção do espaço medular da região frontoparietal e ausência de corticalização das paredes do

defeito, distribuição do material de forma linear e respeitando a espessura da peça óssea, regiões hipodensas em relação ao biomaterial, com densidade próxima à peça óssea, envolvendo grânulos sugerindo neoformação óssea; **C-** O corte axial apresenta imagem hipodensa em relação aos grânulos entremeando os espaços compreendidos entre os mesmos, compatível com neoformação óssea .

Grupo Osteosynt® + 15% MTA

7dias



Figura 33: **A-** Ao filtro para tecido mineralizado é possível observar a distribuição do material testado, preservação das bordas e dimensões do defeito crítico em calvária; **B-** Ao corte coronal é possível verificar a manutenção do espaço medular da região frontoparietal e ausência de corticalização das paredes do defeito, distribuição do material de forma linear e respeitando a espessura da peça óssea; **C-** O corte axial apresenta imagem hipodensa em relação aos grânulos entremeando os espaços compreendidos entre os mesmos, compatível com neoformação óssea.

28 dias

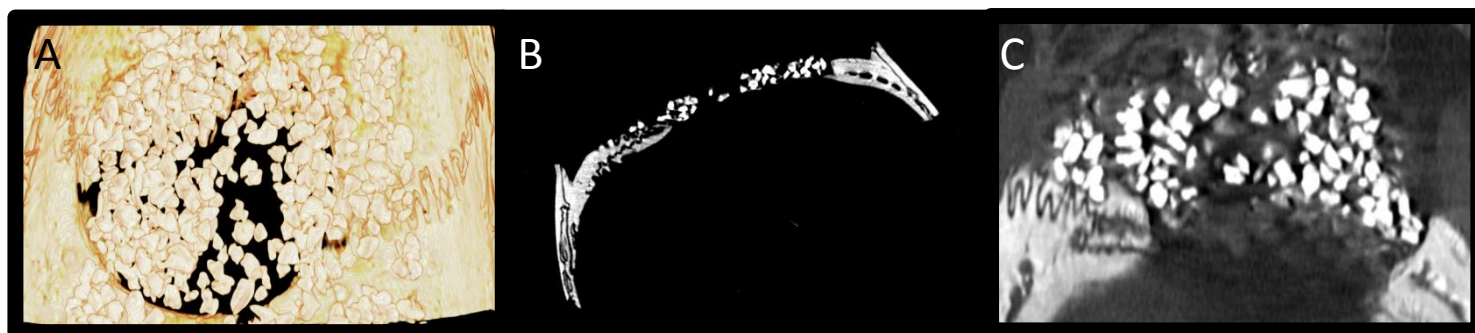


Figura 34: **A-** Ao filtro para tecido mineralizado é possível observar a distribuição do material testado, alteração das bordas e diminuição das dimensões do defeito crítico em calvária; **B-** Ao corte coronal é possível verificar a manutenção do espaço medular da região frontoparietal e ausência de corticalização das paredes do defeito, distribuição do material de forma linear respeitando a espessura da peça óssea, regiões hipodensas

em relação ao biomaterial envolvendo grânulos sugerindo neoformação óssea; **C-** O corte axial apresenta imagem hipodensa em relação aos grânulos entremeando os espaços compreendidos entre os mesmos, compatível com neoformação óssea.

4.2.2. Análise estatística

Dentre os parâmetros analisados, volume ósseo (BV), porcentagem do volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th), separação de trabéculas (Tb.Sp) e número de trabéculas (Tb.N), os parâmetros BV, BV/TV, Tb.Sp e Tb.N não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos, contudo apresentam forte tendência numérica para os grupos Osteosynt® + 10% MTA e Osteosynt® + 15% MTA ao período de 28 dias para uma neoformação óssea quantitativamente superior aos demais grupos.

Volume Ósseo (BV)

Quantitativamente é possível avaliar a diferença entre os grupos e os períodos, aos 7 dias o parâmetro BV apresentou-se numericamente superior nos grupos Bio-Oss® e Osteosynt® + 15% MTA e Coágulo apresentando médias de 11,572 mm³ e 11,545 mm³ e 11,521 mm³, respectivamente. Aos 28 dias os grupos Osteosynt® +15% MTA e Bio-Oss® apresentam respectivamente 10,565 mm³ e 10,378 mm³.

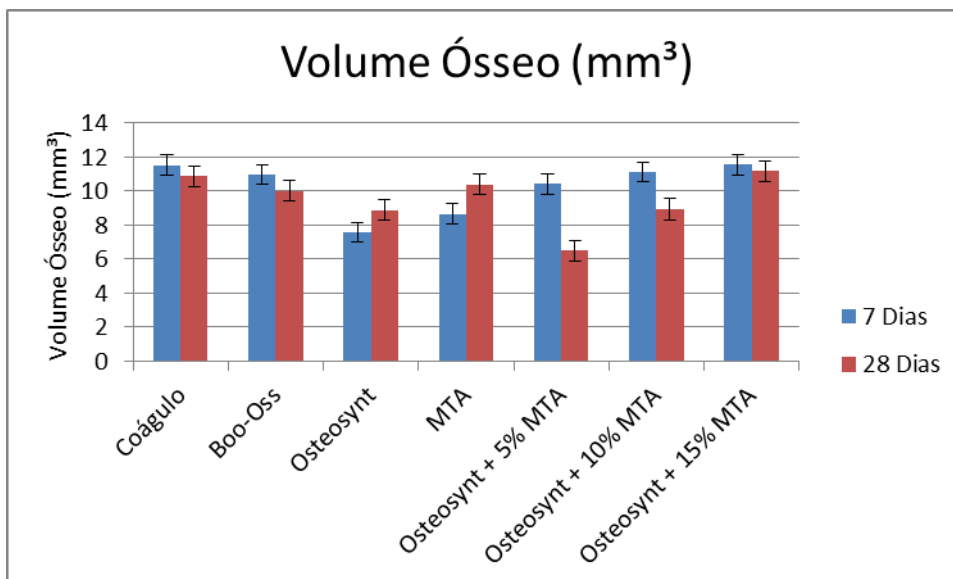


Figura 35: Gráfico dos valores médios de volume ósseo para os períodos de 7 e 28 dias.

Porcentagem do Volume Ósseo (BV/TV)

A análise quantitativa do parâmetro BV/TV aos 7 dias apresentou destaque para os grupos Osteosynt[®] + 15% MTA, Osteosynt[®] + 10% MTA e Bio-Oss[®] que apresentam valores médios respectivamente de 77,3%, 74% e 73%. Aos 28 dias os grupos Osteosynt[®] + 15% MTA, Coágulo e Bio-Oss[®] apresentam respectivamente valores médios de porcentagem de 75%, 73% e 67%.

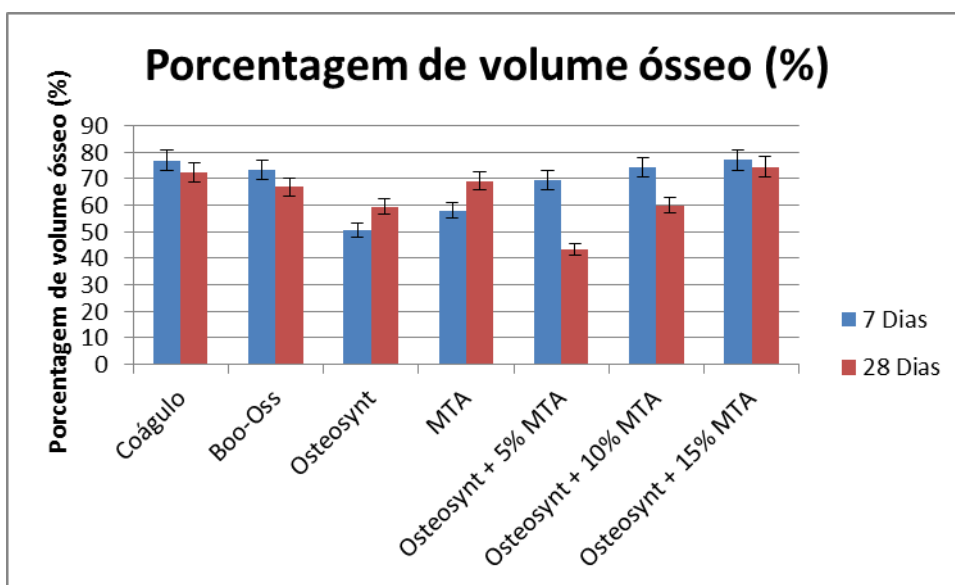


Figura 36: Gráfico dos valores médios em porcentagem de volume ósseo para os períodos de 7 e 28 dias.

Espessura do Trabeculado Ósseo (Tb.Th)

Aos 7 dias os grupos Osteosynt[®] + 15% MTA e Osteosynt[®] + 5% MTA apresentam os maiores valores médios respectivos de 0,31mm² e 0,30mm². Aos 28 dias o grupo Osteosynt[®] + 15% MTA e Osteosynt[®] + 5% MTA mantiveram valores médios estáveis quando comparados ao período de 7 dias, já o grupo coágulo apresentou o maior valor médio da espessura do trabeculado ósseo com 0,32mm².

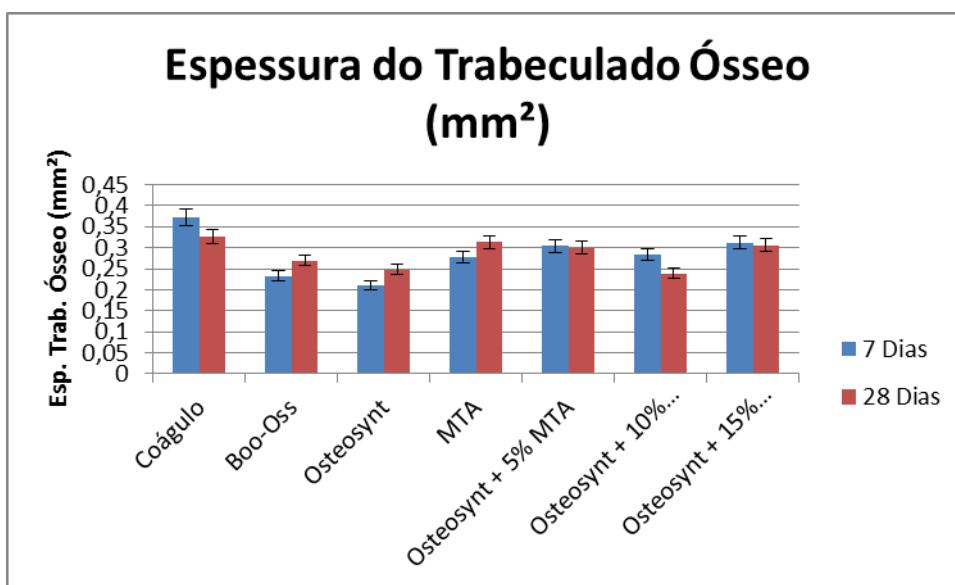


Figura 37: Gráfico dos valores médios da espessura do trabeculado ósseo para os períodos de 7 e 28 dias

Separação de Trabéculas (Tb.Sp)

O período de 7 dias apresentou valores máximos e mínimos de separação das trabéculas respectivamente para o grupo Osteosynt® com 0,2mm e e o grupo Osteosynt® + 10% MTA com 0,12 mm. Já no período de 28 dias os valores máximos e mínimos apresentam valores médios respectivos para os grupos Osteosynt® + 5% MTA com 0,25mm e grupo Coágulo com 0,17mm.

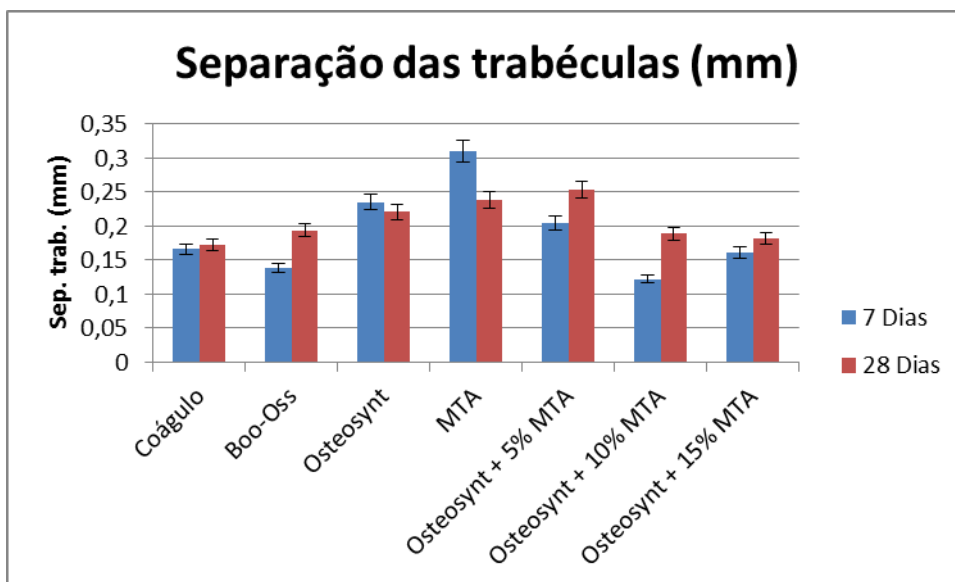


Figura 38: Gráfico dos valores médios da separação das trabéculas para o período de 7 e 28 dias.

Número de Trabéculas (Tb.N)

Para o período de 7 dias os valores demonstraram-se próximos com pequeno destaque para o grupo Bio-Oss® que apresentou 3 (1/mm²). O período de 28 dias também apresentou valores muito próximos do número de trabéculas com leve destaque para o grupo Osteosynt® + 10% MTA que apresentou o valor 3 (1/mm²).

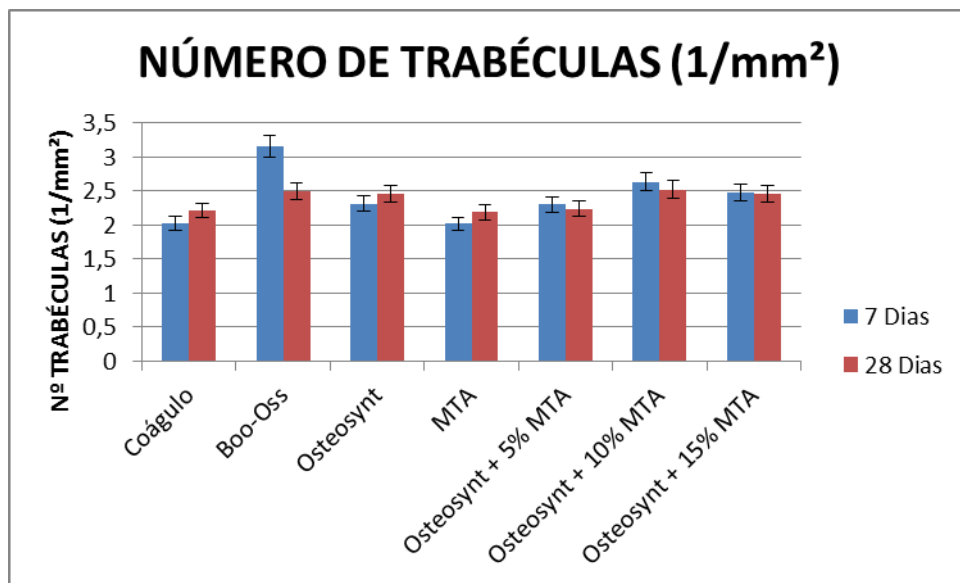


Figura 39: Gráfico dos valores médios do número de trabéculas para o período de 7 e 28 dias.

4.3. Análise histológica

4.3.1. Análise descritiva

Grupo Coágulo

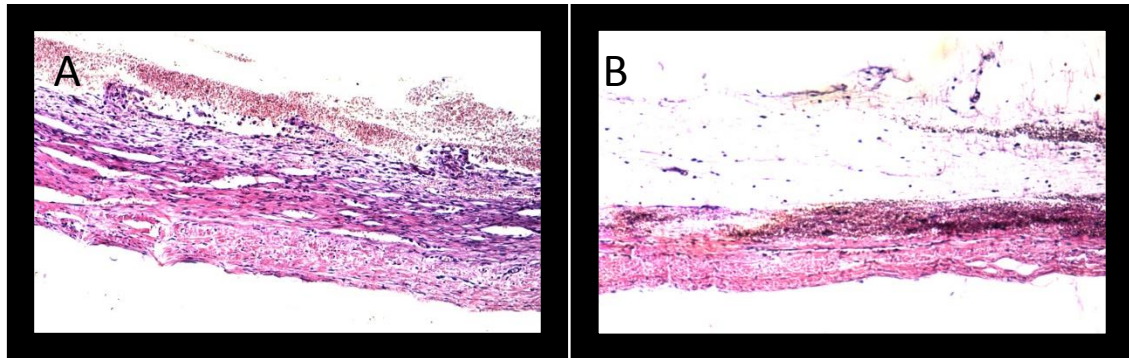


Figura 40: Aumento de 10x para a visualização panorâmica da área de interesse a ser analisada, possibilitando a visualização do infiltrado inflamatório presente, bem como evidenciar a direção das fibras colágenas, aos tempos de 7 (A) e 28 dias (B).

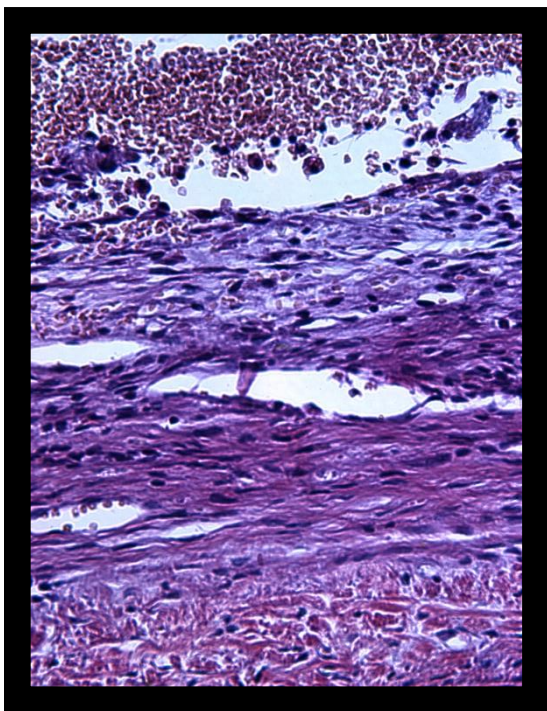


Figura 41: Ao aumento de 40x para o período de 7 dias no grupo Coágulo é possível observar a presença de eritrócitos degenerados, presença de infiltrado linfoplasmocitário, e células gigantes multinucleadas, organização transversal das fibras colágenas e presença dominante de fibroblastos.

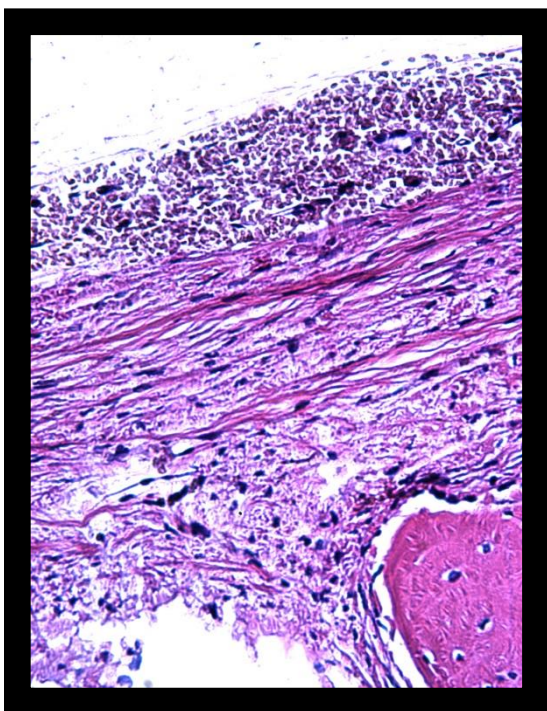


Figura 42: Ao aumento de 40x para o período de 28 dias é possível observar infiltrado plasmocitário, presença de células gigantes multinucleadas em contato com a crosta remanescente, organização das fibras colágenas de forma transversal, presença de fibroblastos e osteoblastos, áreas de neoformação óssea apresentando dinâmica aposicional com presença de osteoblastos e osteócitos e osteoclastos.

Bio- oss

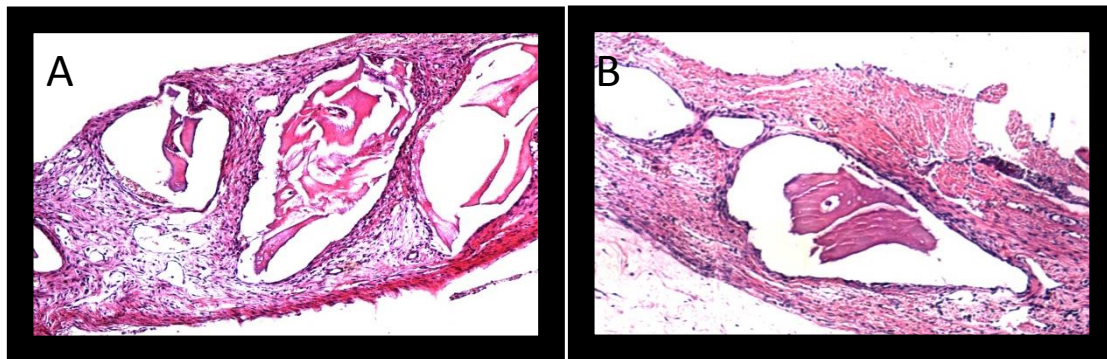


Figura 43: Aumento de 10x para a visualização panorâmica da área de interesse a ser analisada, possibilitando a visualização do infiltrado inflamatório presente, bem como evidenciar a direção das fibras colágenase a presença dos grânulos de biomaterial, aos tempos de 7 (A) e 28 dias (B).

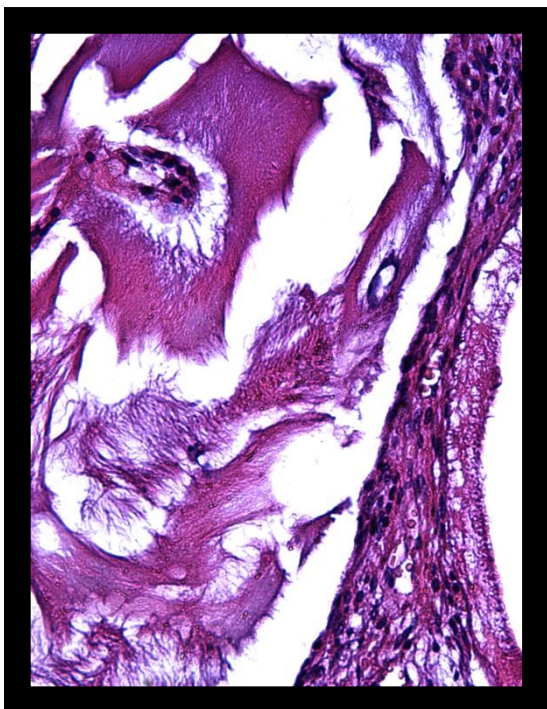


Figura 44: Ao aumento de 40x para o período de 7 dias no grupo Bio-Oss® é possível observar a presença de leve infiltrado linfoplasmocitário, células gigantes multinucleadas, organização das fibras colágenas ao redor dos grânulos do material com presença dominante de fibroblastos.

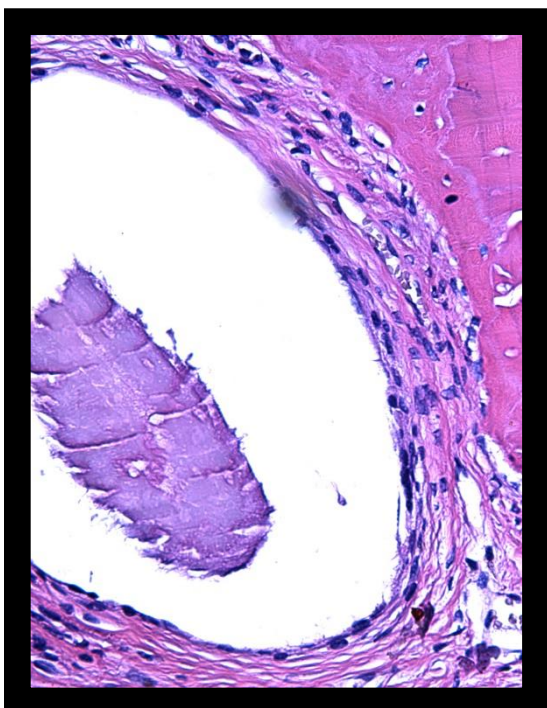


Figura 45: Ao aumento de 40x para o período de 28 dias é possível observar a organização das fibras colágenas de ao redor dos grânulos do biomaterial, presença de fibroblastos e osteoblastos entremeando o tecido conjuntivo, áreas de neoformação óssea apresentando dinâmica aposicional com presença de osteoblastos e osteócitos e osteoclastos.

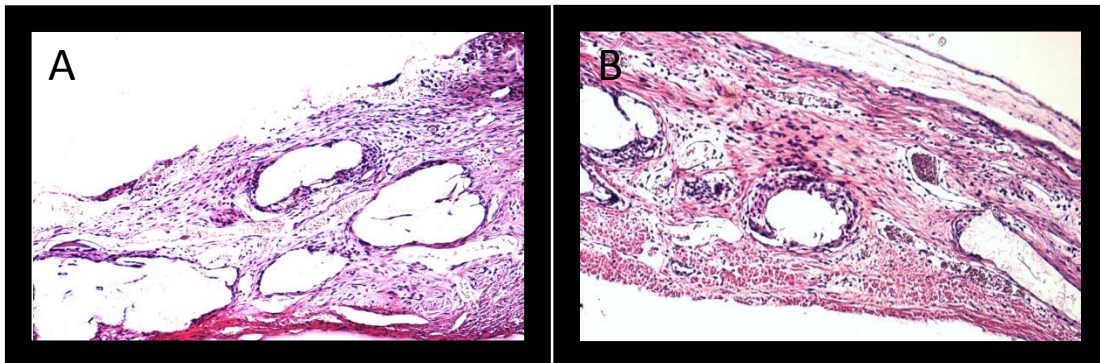


Figura 46: Aumento de 10x para a visualização panorâmica da área de interesse a ser analisada, possibilitando a visualização do infiltrado inflamatório presente, bem como evidenciar a direção das fibras colágenase a presença dos grânulos de biomaterial, aos tempos 7 (A) e 28 dias (B).

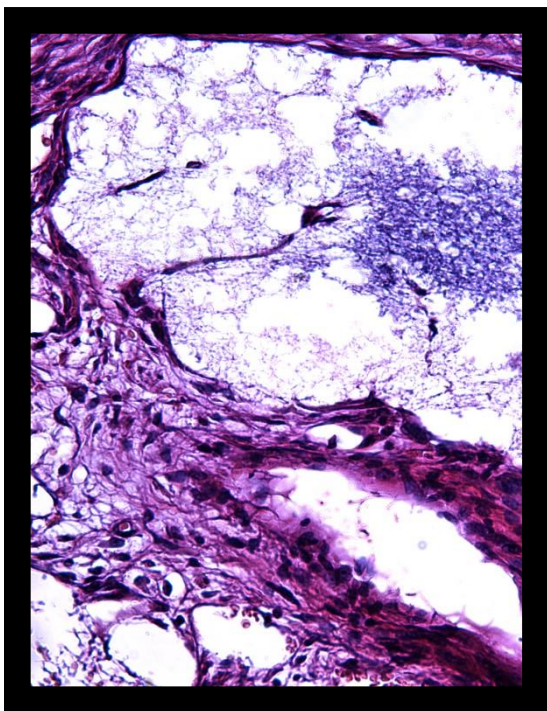


Figura 47: Ao aumento de 40x para o período de 7 dias no grupo Osteosynt® é possível observar a presença de leve infiltrado linfoplasmocitário, células gigantes multinucleadas, organização das fibras colágenas ao redor dos grânulos do material com presença dominante de fibroblastos.

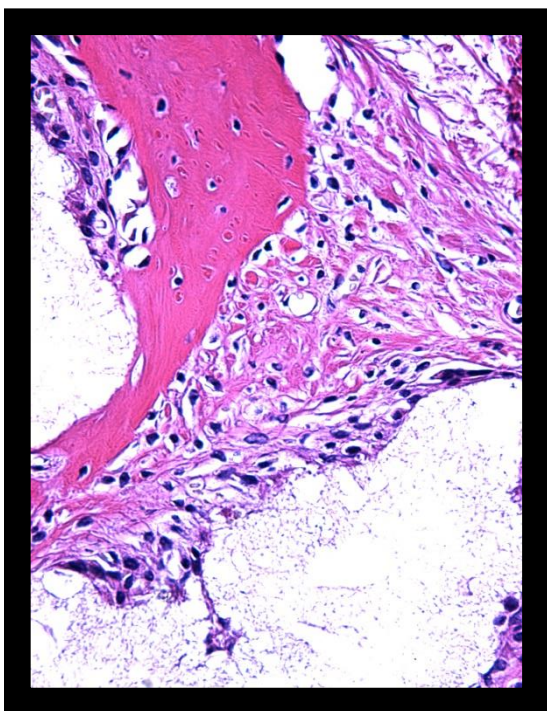


Figura 48: Ao aumento de 40x para o período de 28 dias é possível observar a organização das fibras colágenas de ao redor dos grânulos do biomaterial, presença de fibroblastos e osteoblastos entremeando o tecido conjuntivo, áreas de neoformação óssea apresentando dinâmica aposicional com presença de osteoblastos e osteócitos e osteoclastos.

Grupo MTA

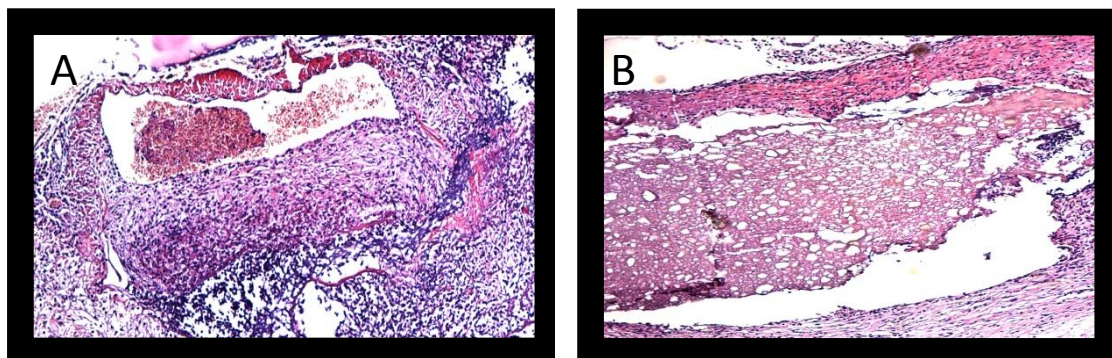


Figura 49: Aumento de 10x para a visualização panorâmica da área de interesse a ser analisada, possibilitando a visualização do infiltrado inflamatório presente, bem como evidenciar a direção das fibras colágenase a presença dos grânulos de biomaterial, aos tempos de 7 e 28 dias. Fib x a e b

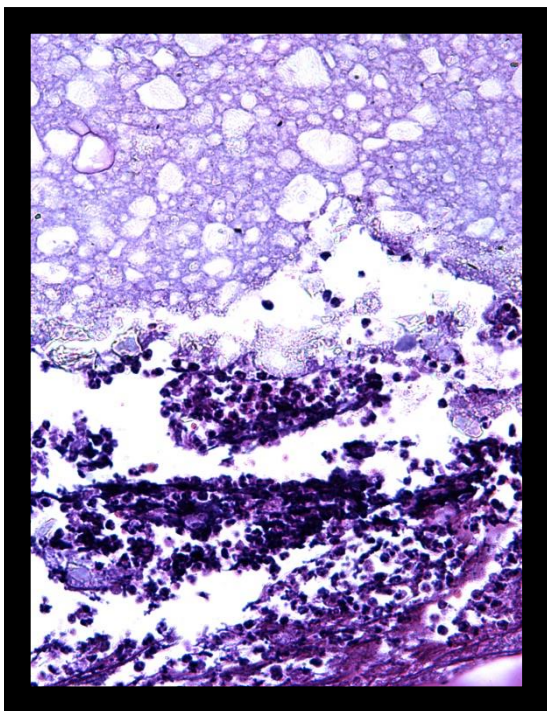


Figura 50: Ao aumento de 40x para o período de 7 dias no grupo MTA é possível observar a presença de intenso infiltrado linfoplasmocitário, áreas de necrose na interface MTA/tecido, células gigantes multinucleadas, presença de MTA, cápsula de tecido conjuntivo.

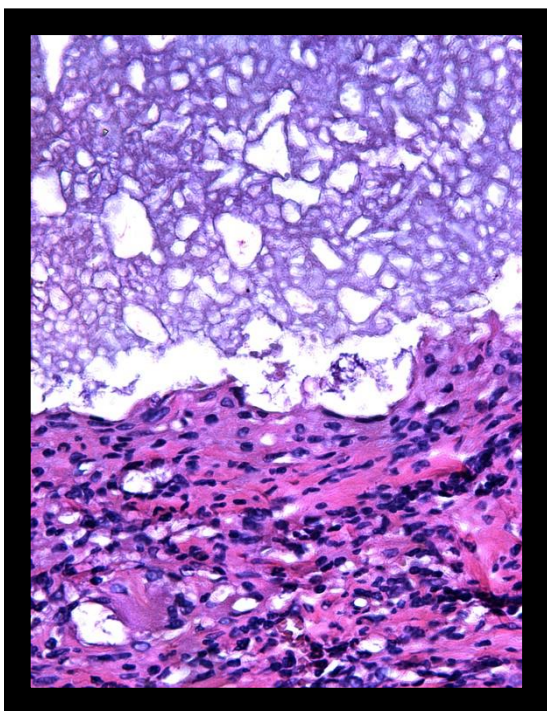


Figura 51: Ao aumento de 40x para o período de 28 dias é possível observar a organização das fibras colágenas de ao redor do biomaterial, presença de fibroblastos entremeando o tecido conjuntivo capsular, presença de células gigantes multinucleadas caracterizando reação de corpo estranho.

Grupo Osteosynt[®] + 5% MTA

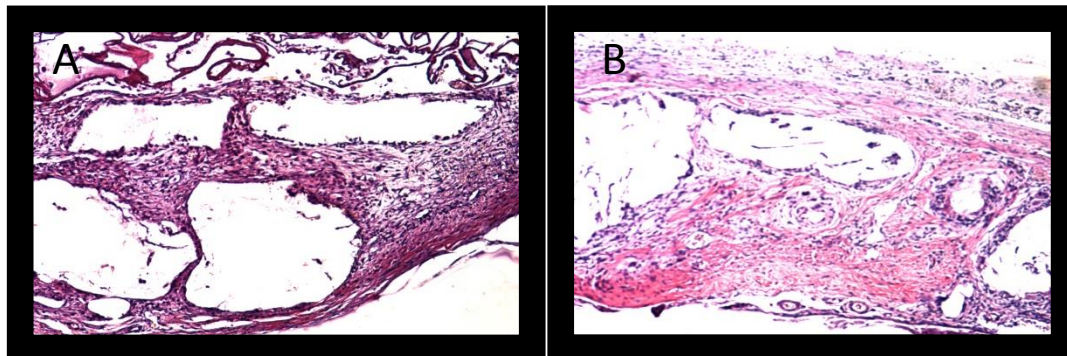


Figura 52: Aumento de 10x para a visualização panorâmica da área de interesse a ser analisada, possibilitando a visualização do infiltrado inflamatório presente, bem como evidenciar a direção das fibras colágenase a presença dos grânulos de biomaterial, aos tempos de 7 e 28 dias. Fib x a e b

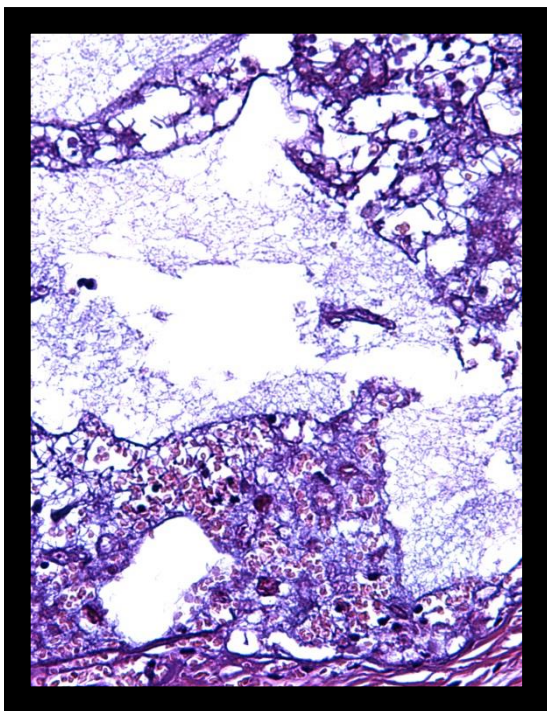


Figura 53: Ao aumento de 40x para o período de 7 dias no grupo Osteosynt® + 5% MTA é possível observar a presença de leve infiltrado linfoplasmocitário, células gigantes multinucleadas, organização das fibras colágenas ao redor dos grânulos do material com presença dominante de fibroblastos.

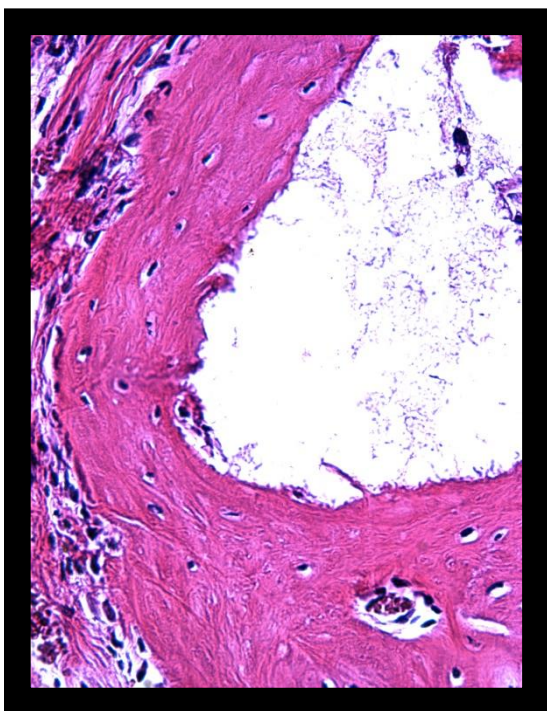


Figura 54: Ao aumento de 40x para o período de 28 dias é possível observar a organização das fibras colágenas de ao redor dos grânulos do biomaterial, presença de fibroblastos e osteoblastos entremeando o tecido conjuntivo, áreas de neoformação óssea apresentando dinâmica aposicional com presença de osteoblastos e osteócitos e osteoclastos.

Grupo Osteosynt® + 10% MTA

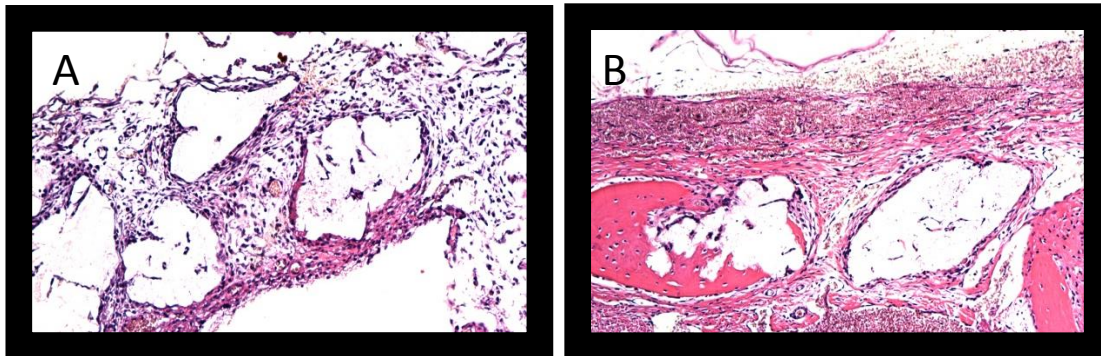


Figura 55: Aumento de 10x para a visualização panorâmica da área de interesse a ser analisada, possibilitando a visualização do infiltrado inflamatório presente, bem como evidenciar a direção das fibras colágenase a presença dos grânulos de biomaterial, aos tempos de 7 e 28 dias. Fib x a e b

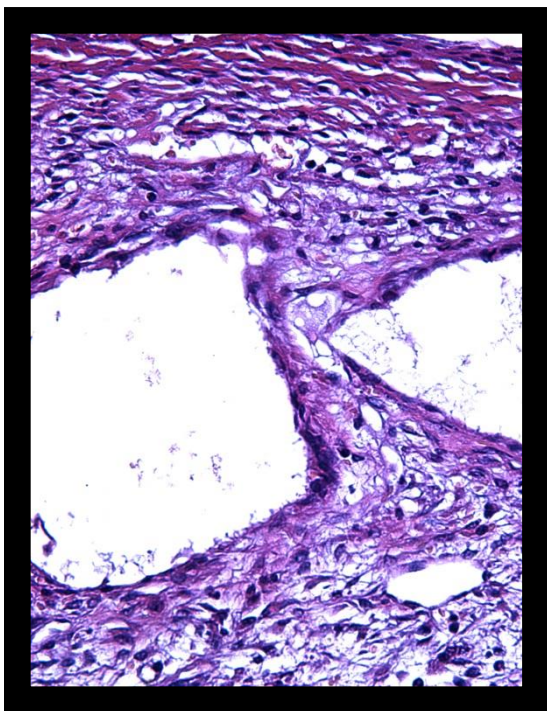


Figura 56: Ao aumento de 40x para o período de 7 dias no grupo Osteosynt® + 10% MTA é possível observar a presença de leve infiltrado linfoplasmocitário, células gigantes multinucleadas, organização das fibras colágenas ao redor dos grânulos do material com presença dominante de fibroblastos.

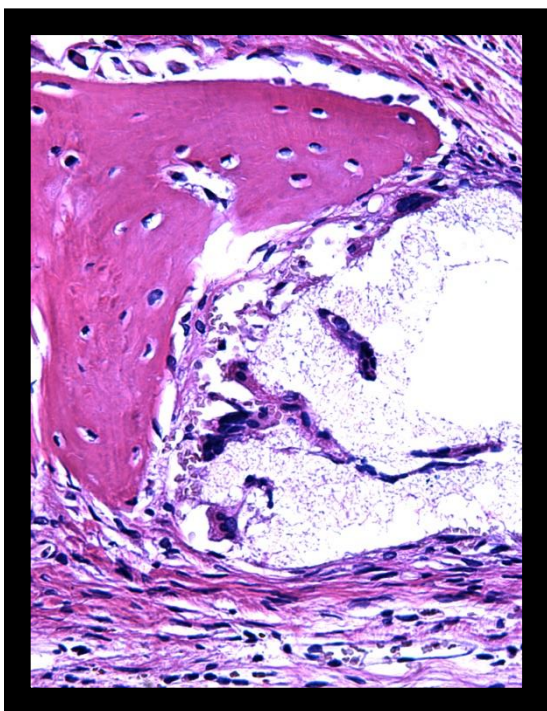


Figura 57: Ao aumento de 40x para o período de 28 dias é possível observar a organização das fibras colágenas de ao redor dos grânulos do biomaterial, presença de fibroblastos e osteoblastos entremeando o tecido conjuntivo, áreas de neoformação óssea apresentando dinâmica aposicional com presença de osteoblastos e osteócitos e osteoclastos.

Grupo Osteosynt® + 15% MTA

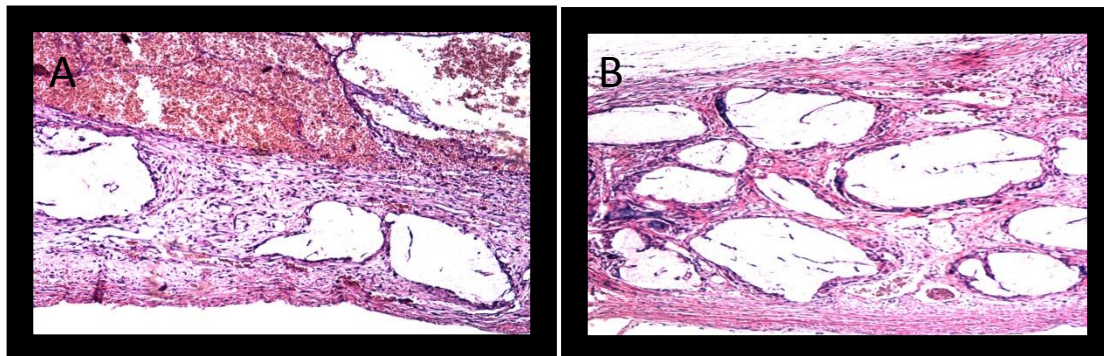


Figura 58: Aumento de 10x para a visualização panorâmica da área de interesse a ser analisada, possibilitando a visualização do infiltrado inflamatório presente, bem como evidenciar a direção das fibras colágenase a presença dos grânulos de biomaterial, aos tempos de 7 e 28 dias. Fib x a e b

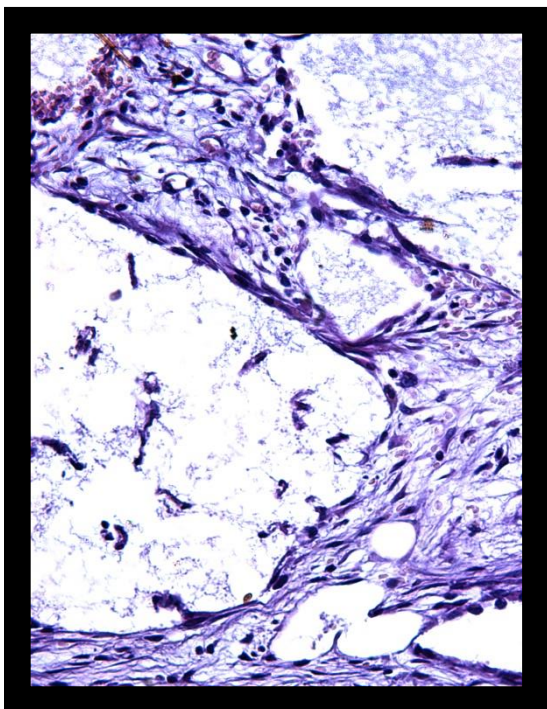


Figura 59: Ao aumento de 40x para o período de 7 dias no grupo Osteosynt® + 15% MTA é possível observar a presença de leve infiltrado linfoplasmocitário, células gigantes multinucleadas, organização das fibras colágenas ao redor dos grânulos do material com presença dominante de fibroblastos.

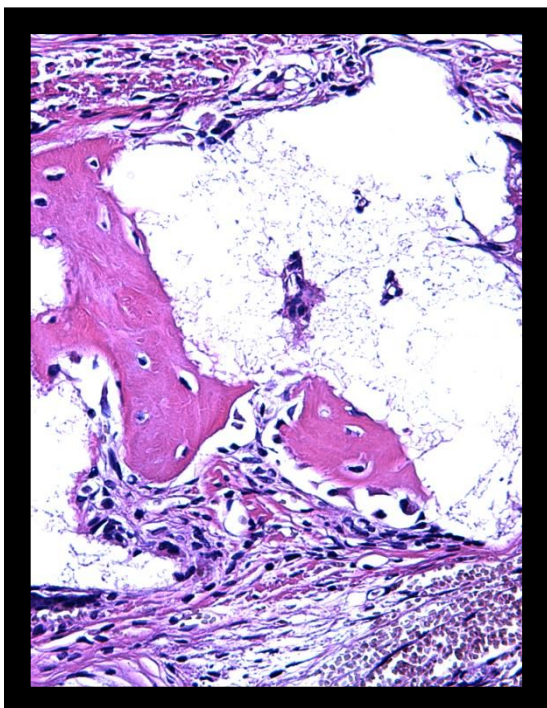


Figura 60: Ao aumento de 40x para o período de 28 dias é possível observar a organização das fibras colágenas de ao redor dos grânulos do biomaterial, presença de fibroblastos e osteoblastos entremeando o tecido conjuntivo, áreas de neoformação óssea apresentando dinâmica aposicional com presença de osteoblastos e osteócitos e osteoclastos.

4.3.2. Análise do infiltrado inflamatório

Para a análise do infiltrado inflamatório, visando verificar a biocompatibilidade dos materiais aplicados foi feita a contagem de células inflamatórias e correlacionado a escores onde os escores correspondentes são respectivamente: 0: nenhuma ou poucas células inflamatórias e nenhuma reação. 1: <25 células e reação leve; 2: Entre 25 e 125 células e reação moderada; 3: 125 ou mais células[36].

Onde foi possível observar aos 7 dias os grupos Coágulo e Bio-Oss[®] apresentando reação inflamatória leve, já os grupos Osteosint, Osteosynt[®] + 5% MTA, Osteosynt[®] + 10% MTA e Osteosynt[®] + 15% MTA apresentaram inflamação moderada, sucedidos pelo MTA que apresentou intenso infiltrado inflamatório.

Por sua vez o infiltrado inflamatório aos 30 dias apresentou redução em para este período, excetuando-se os grupos Bio-Oss[®] e Osteosynt[®] + 15% MTA. Como é possível observar na tabela abaixo (tab. 1).

Análise do infiltrado inflamatório

Tabela 1: Escores inflamatórios obtidos a partir aos 07 e 30 dias.

<i>Tempo</i>	<i>Grupos</i>	<i>Infiltrado Inflamatório</i>				
		<i>Escore</i>				<i>Mediana</i>
		<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	
07 dias	Coágulo	2	3	0	0	1
	Bioss	0	3	2	0	1
	Osteosynt[®]	0	1	4	0	2
	MTA	0	0	2	3	3 ^a
	Osteosynt[®] + 5% MTA	0	1	4	0	2
	Osteosynt[®] + 10% MTA	0	1	4	0	2
	Osteosynt[®] + 15% MTA	0	1	4	0	2
28 dias	Coágulo	2	3	0	0	0
	Bioss	0	4	1	0	1
	Osteosynt[®]	0	4	1	0	1
	MTA	0	0	3	2	2 ^a
	Osteosynt[®] + 5% MTA	0	3	2	0	1
	Osteosynt[®] + 10% MTA	0	3	2	0	1
	Osteosynt[®] + 15% MTA	0	1	4	0	2

Legenda: Escores 0: nenhuma ou poucas células inflamatórias e nenhuma reação. 1: <25 células e reação leve; 2: Entre 25 e 125 células e reação moderada; 3: 125 ou mais células e reação grave.

*Diferenças observadas na comparação dos diferentes materiais dentro de cada tempo experimental são indicadas por letras. Letras: a: p<0.05 versus Coágulo.

4.3.3. Histometria

Neoformação óssea

A análise estatística para avaliação da neoformação óssea não apresentou diferenças estatísticas significantes entre os grupos entre os grupos e os tempos respectivos, contudo fortes tendências numéricas se apresentam para a indicação da possível superioridade para a neoformação óssea dos grupos Osteosynt® + 5% MTA e Osteosynt® + 10% MTA quando comparados aos demais grupos.

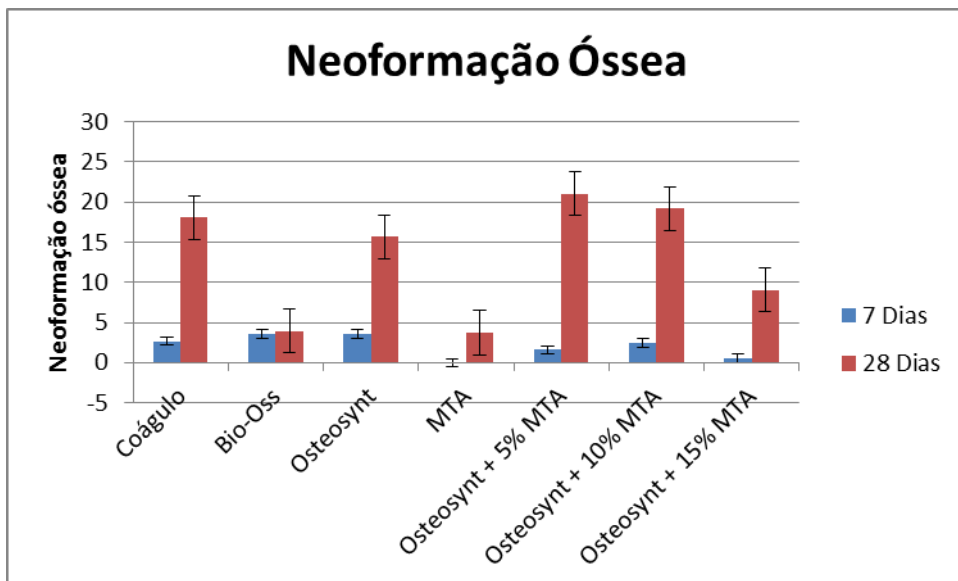


Figura 61: gráfico comparativo entre grupos e períodos para avaliação da neoformação óssea.

Presença e reabsorção dos Biomateriais

Para o parâmetro reabsorção dos materiais a Análise estatística não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos e os períodos. Demonstrando, desta forma, a capacidade da manutenção dimensional dos substitutos ósseos e a um baixo índice de reabsorção do MTA puro.

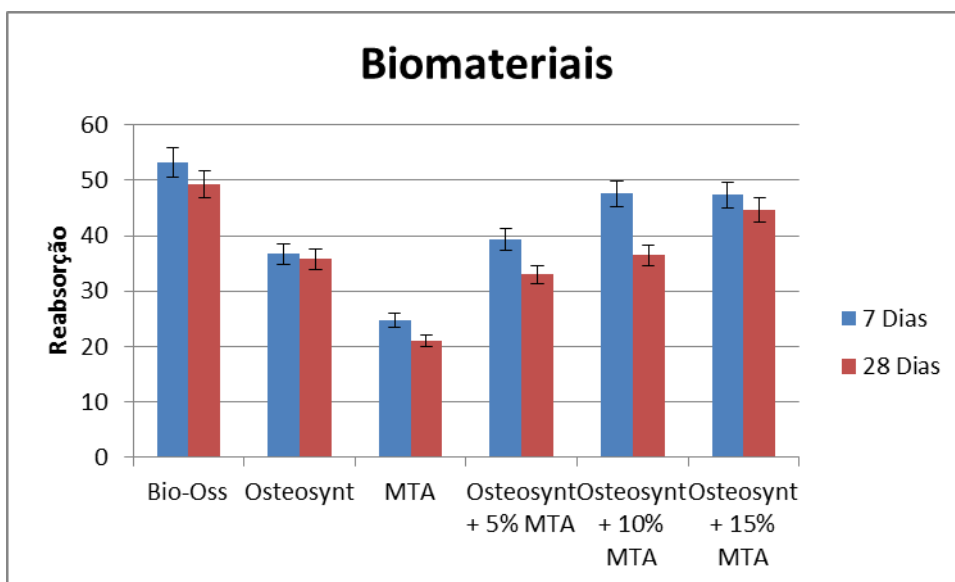


Figura 62: Gráfico comparativo entre grupos e períodos para avaliação da reabsorção e manutenção dimensional dos biomateriais.

5. Discussão

A hipótese nula apresentada pelo presente trabalho foi que a associação do MTA ao material particulado não impactaria o reparo ósseo em comparação ao uso isolado do substituto ósseo particulado. Apesar de as tendências numéricas apresentadas pelas médias dos parâmetros avaliados indicarem possibilidade de superioridade quando comparados os diferentes grupos deste estudo, estatisticamente não houveram diferenças entre os grupos. Desta forma a hipótese nula não foi refutada.

O biomaterial utilizado Osteosynt[®] é composto por hidroxiapatita (HA) e β -tricálcio fosfato (β -TCP), ambos fosfatos de cálcio. Tal associação apresenta o uso concomitante de dois biomateriais onde a HA fornece o arcabouço para a osteocondução e o β -TCP é reabsorvido promovendo angiogênese e neoformação óssea[37].

Dentre as apresentações dos fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e o fosfato tricálcico de α e β ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) apresentam papel de destaque em reabilitações maxilo-faciais, uma vez que suas superfícies possuem características que facilitam a adsorção de proteínas possibilitando aumentar a capacidade osteoindutiva. Contudo, o fosfato tricálcio apresenta configurações espaciais nas fases α e β e apresentam semelhanças em suas características osteocondutoras. No entanto, a fase α apresenta maior bioatividade em função de seu arranjo estrutural promover maior troca iônica com o meio biológico[38, 39]. Já a fase β dos fosfatos de cálcio possui um processo de obtenção que gera menos custo no âmbito industrial quando comparada à obtenção do fosfato de cálcio em sua fase α . Por esta razão a indústria biomédica optou por utilizar o β -TCP, por possuir boas características bioativas e promover menor custo para produção[38, 40].

A utilização de materiais a base dos fosfatos de cálcio apresentam destaque nas reabilitações maxilo-faciais em virtude de suas semelhanças físico-químicas com a porção inorgânica do osso. Os fosfatos de cálcio apresentam boa biocompatibilidade e bioatividade, favorecendo a formação de osso vital e viável para as reabilitações com implantes e utilização em *gaps* ósseos, tanto em levantamentos de seio maxilar como fraturas ósseas, manutenções de espessura de rebordo após exodontias, aumentos verticais e horizontais em arcos edêntulos[1, 2, 39, 41].

O MTA branco é um material com larga utilização em endodontia como cimento reparador. Tendo seu uso em odontologia iniciado na década de 1990 como cimento reparador para selamento de perfurações entre o elemento dentário e o meio que o

cerca. Todavia, por apresentar propriedades favoráveis ao reparo, tornou-se o material a ser usado em pulpotomias, capeamentos pulparem diretos, apicificações, entre outros usos. [9-11]. O MTA possui boa biocompatibilidade e atividade antimicrobiana, além de induzir a formação de tecidos mineralizados[11-15].

Zdrilic e Azevedo (2017) avaliaram as propriedades do MTA enquanto material indutor de regeneração em células do ligamento periodontal e osso alveolar. Demonstrando a capacidade reparadora e regenerativa do MTA por meio da análise histológica evidenciando melhor reparo em dentes tratados com MTA, bem como, pela maior expansão de células progenitoras e osteoblastos em comparação com dentes do grupo controle[17]. Gandolfi et al. (2017) avaliaram a capacidade osteoindutiva de diferentes cimentos a base de silicato de cálcio (ProRoot MTA, MTA Plus e Biodentine). Tanto o ProRoot MTA quanto o MTA Plus apresentaram capacidade de adesão óssea, sendo que o ProRoot MTA e o Biodentine apresentaram capacidade de indução da neoformação óssea[18].

Por sua vez, um substituto ósseo amplamente utilizado e testado ao longo do tempo que encontra-se no mercado é o Bio-Oss[®], com propriedades osteocondutoras e boa previsibilidade o Bio-Oss[®] é amplamente utilizado em estudos como controle para comparação com os demais materiais utilizados. O Bio-Oss[®] é um material a base de HA obtida a partir da sinterização de osso bovino, que ao ser integrado ao coágulo passa a funcionar como arcabouço para a migração celular e consequente formação óssea, sendo utilizado para levantamento de seio maxilar, aumento de disponibilidade óssea em altura e espessura em arcos parciais ou totalmente desdentados, preenchimento de diástases ósseas em cirurgia ortognática e trauma maxilo-facial [42-47].

Desta forma, a utilização destes materiais justifica-se em virtude das suas respectivas funções e propriedades. O substituto ósseo Osteosynt[®] é composto por HA e β -TCP na proporção respectivamente de 40% e 60% [48]. A presença da HA fornece um arcabouço para a colonização de células osteogênicas e mantém estabilidade dimensional, já o β -TCP possui bom potencial osteocondutor, rápida reabsorção e capacidade de indução da angiogênese [43, 48, 49]. O MTA possui boa biocompatibilidade, atividade antimicrobiana e induz a formação de tecidos mineralizados através do recrutamento de células da linhagem osteogênica e indução de diferenciação de células pluripotentes indiferenciadas presentes no ligamento periodontal e medula óssea[11-15].

A utilização dos tempos de 7 dias e 28 dias para a avaliação do potencial de mineralização e resposta do tecido frente ao biomaterial particulado (Osteosynt®) quando associado ao MTA nas três proporções utilizadas (5%, 10%, 15%) visou verificar se a cinética inicial de neoformação óssea foi superior quando comparado aos controles Coágulo, Bio-Oss® e Osteosynt® (sem adição de MTA), com tempos de eutanásia precoces para o modelo animal utilizado[50, 51].

A linhagem celular utilizada para este estudo, a SAOS-2, é utilizada em diversos modelos para avaliação do comportamento das células ósseas frente a estímulos, bem como estudos sobre reparo[26, 27]. O MTA é um material que a dissolução em água ou fluidos tissulares promove a elevação do pH (alcalinização) da área onde o mesmo fora aplicado[52, 53], tal elevação da disponibilidade de Ca^{2+} promove um aumento da atividade da fosfatase alcalina, mas também promove aumento do pH. A alcalinização extrema do meio pode vir a aumentar o estresse oxidativo, conduzindo a célula a atingir o ponto de não retorno e por sua vez induzir a célula a entrar em processo de apoptose[54, 55], o que pode vir a justificar os achados citológicos para o grupo MTA e grupos Osteosynt® + 5% MTA, Osteosynt® + 10% MTA e Osteosynt® + 15% MTA(figuras 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18)., estes, apresentaram aumento progressivo da presença de restos celulares após apoptose tanto no período de 24h como de 48h ao ensaio de contato direto, vindo a ser confirmado pelos valores da viabilidade celular pelo ensaio de MTT(figuras 19, 20).

Já os para o ensaio de MTT para os eluentes trouxe um resultado que, apesar de não apresentar diferenças estatísticas entre os grupos e períodos em nenhuma das diluições, corroborou com os achados de pesquisas prévias no tocante aos materiais como o MTA e as demais apresentações de HA e β -TCP, onde os eluentes presentes nos extratos utilizados podem estimular as células da linhagem SAOS-2, mantendo quantitativamente porcentagens elevadas e próximas ao controle, apesar de pouco ultrapassarem o 100% [56-58] (figura 20). Tal estimulação pode ser extrapolada para um sistema biológico complexo podendo ser entendido que a partir do contato entre tecido e material, o meio aquoso dos fluidos tissulares solubiliza a superfície do material utilizado e libera para o meio os íons presentes no material, podendo recrutar células e estimular diferenciação a distância[17].

Da mesma forma, os achado histológicos e citológicos exibem semelhanças no que tange à morfologia celular presente ao redor dos grânulos dos substitutos ósseos utilizados. Os prolongamentos lançados pelas células da linhagem SAOS-2 ao contato

direto e sua organização periférica aos grânulos apresentam semelhanças quanto à organização das células ao redor dos grânulos de Bio-Oss® e Osteosynt® utilizados tanto em ensaio de cultura celular como *in vivo* (Figuras 7, 8, 9, 10, 13, 14, 44, 45, 46, 47, 53, 54, 56, 57, 59, 60).

A avaliação dos achados imaginológicos correlacionados aos eventos histológicos observados, permitiu a obtenção de dados relacionados à ação direta entre o contato dos materiais testados (MTA, Bio-Oss®, Osteosynt®) e às três diferentes proporções entre o Osteosynt® e o MTA. Tais achados permitiram avaliar não apenas a cinética do reparo ósseo, mas também avaliar a manutenção dimensional dos materiais enxertados. No tocante à manutenção dimensional dos biomateriais substitutos ósseos a manutenção dimensional favorece a previsibilidade de um resultado clínico, onde o volume necessário de osso para a instalação de implantes dentários pode ser esperada a partir do volume de material enxertado na área de interesse [43, 59]. Os substitutos ósseos avaliados apresentaram boa manutenção dimensional de seus grânulos em comparação entre períodos mesmo quando acrescido de MTA, com destaque para os grupos Osteosynt® + 5% MTA e Osteosynt® + 10% MTA (Figuras: 21-34, 40-60, 62).

Os achados imaginológicos evidenciaram comportamento semelhante aos apresentados em estudos prévios acerca de materiais substitutos ósseos particulados, apresentando para os grupos Bio-Oss®, Osteosynt® e as três proporções de Osteosynt® + MTA, manutenção da área do defeito crítico em calvária e alguma neoformação óssea aos 7 dias e neoformação óssea aos 28 dias [20, 43, 44, 60]. Os grupos Osteosynt® + 5% MTA, Osteosynt® + 10% MTA e Osteosynt® + 15% MTA aos 28 dias potencialmente podem apresentar comportamento favorável para acelerar e modular o reparo ósseo, possivelmente favorecido pela presença do MTA em virtude da capacidade de indução de tecidos mineralizados e diferenciação das células indiferenciadas presentes no tecido ósseo [11-15, 17] (Figuras: 21-34). O Grupo MTA apresentou achados imaginológicos e histológicos aos 7 e aos 28 dias que corroboram com estudos histológicos prévios acerca do comportamento do material na interface tecido mineralizado-MTA, como descrito por Torabnejad et al.. (1995) acerca da adaptação marginal do material [13] e da corticalização das paredes do defeito ósseo [18] (Figuras 27, 28, 49-51).

Apesar de a análise estatística demonstrar não haver diferenças significativas entre os grupos, os valores médios atingidos pelos parâmetros analisados apresentam dados indicativos que podem vir a guiar novos estudos acerca do presente tema abordados neste estudo. A neoformação óssea foi avaliada por meio de imagens

microtomograficas e medida pelos parâmetros volume ósseo (BV), porcentagem do volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th), separação e número de trabéculas (TB.Sp e Tb.N), bem como pela análise histológica dos diferentes grupos.

A avaliação quantitativa e qualitativa a partir das médias apresentou tendências numéricas que podem inferir na superioridade entre os diferentes grupos e períodos presentes neste estudo. Para o período de 7 dias o parâmetro BV apresentou-se numericamente superior nos grupos Bio-Oss® e Osteosynt® + 15% MTA e Coágulo, com médias de 11,572 mm³ e 11,545 mm³ e 11,521 mm³, respectivamente. Aos 28 dias os grupos Osteosynt® +15% MTA e Bio-Oss® apresentam respectivamente 10,565 mm³ e 10,378 mm³, a tendência numérica para a formação óssea obtida pela histomorfometria atingiu os maiores valores aos 28 dias para os grupos Osteosynt® + 5% MTA e Osteosynt® + 10% MTA com recuo para o grupo Osteosynt® + 15% MTA, respectivamente, 21.05, 19.16 e 9,04 (Figura 36)

Tais características quantitativas volumétricas vão de encontro à literatura, manutenção volumétrica no período de formação óssea da área enxertada com substitutos ósseos particulados e também a manutenção do volume enxertado em períodos mais longos. A manutenção volumétrica do enxerto auxilia a previsibilidade do resultado clínico esperado. O ritmo de absorção dos grânulos e a substituição pelo osso vital guia a escolha do material de enxertia, onde materiais de rápida, média e lenta absorção estão comercialmente disponíveis cada qual com a sua indicação[6, 20, 44].

Os valores médios superiores obtidos pelos grupos Osteosynt® + 5% MTA e Osteosynt® + 10% MTA podem ser explicados pelas características osteocondutoras da HA enquanto fornecedora de arcabouço para a neoformação óssea, juntamente com o β -TCP que possui propriedades que induzem a angiogênese[42, 43, 49, 61]. Mas também, pela presença do MTA que possui importante bioatividade relacionada à formação de tecidos mineralizados [11-15], assim como, o recrutamento celular a distância de células de linhagem óssea e indução à diferenciação de células pluripotentes indiferenciadas presentes em locais como medula óssea e ligamento periodontal[17]. O que pode levar a um aumento discreto da população de células osteogênicas aumentando a quantidade de osso neoformado como consequência.

Os parâmetros Tb.Th, TB.Sp e Tb.N apresentam valores numéricos que quantificam a qualidade da organização micrométrica do trabeculado, que podem influenciar macro características do osso como unidade fisiológica funcional. A organização do trabeculado influencia diretamente na qualidade óssea para a instalação

de implantes dentários[62]. Desta forma, uma menor separação entre as trabéculas e maior espessura das trabéculas neoformadas podem levar a um osso mais denso para perfuração e instalação de implantes dentários, podendo favorecer uma estabilidade primária satisfatória[63, 64].

Aos 7 dias os grupos Osteosynt[®] + 15% MTA e Osteosynt[®] + 5% MTA apresentam os maiores valores médios para o parâmetro Tb.Th (0,31mm² e 0,30mm²). Aos 28 dias o grupo Osteosynt[®] + 15% MTA e Osteosynt[®] + 5% MTA mantiveram valores médios estáveis quando comparados ao período de 7 dias. O grupo coágulo apresentou o maior valor médio da espessura do trabeculado ósseo com 0,32mm² (Figura 38)

O período de 7 dias apresentou valores máximos e mínimos de separação das trabéculas respectivamente para o grupo Osteosynt[®] com 0,2mm e o grupo Osteosynt[®] + 10% MTA com 0,12 mm. Já no período de 28 dias os valores médios para os grupos Osteosynt[®] + 5% MTA com 0,25mm e grupo Coágulo com 0,17mm (Figura 39).

Para o período de 7 dias os valores de Tb.N demonstraram-se próximos entre os grupos com pequeno destaque para o grupo Bio-Oss[®] que apresentou 3 (1/mm²). Figura 26. O período de 28 dias também apresentou valores muito próximos do número de trabéculas com leve destaque para o grupo Osteosynt[®] + 10% MTA que apresentou o valor 3 (1/mm³) (Figura 40).

Estudos prévios demonstraram que o osso neoformado a partir de substituto ósseo particulado apresenta características de normalidade e semelhança após 5 anos e a organização lamelar do osso vital é reproduzida após o equilíbrio aposicional da dinâmica óssea[6, 19]. A formação do trabeculado ósseo favorece também a manutenção tridimensional do biomaterial utilizado na área enxertada, este trabeculado irá sustentar toda a estrutura permitindo a posterior instalação dos implantes dentários [6, 18]. Desta forma, o trabeculado ósseo neoformado assume papel de destaque na reabilitação em áreas enxertadas [51, 62, 63].

As limitações apresentadas pelo presente estudo, apresentaram conflito entre o Power Test para definição do “n” da amostra e ideal de n=8 e a literatura, esta que utiliza “n” variando entre 3≤n≤5. Tal conflito pode ter influenciado diretamente na análise estatística, onde o número reduzido de animais pode ter impedido que as diferenças presentes nas tendências numéricas pudessem ser confirmadas pelos testes estatísticos aplicados[65-70].

Outra limitação apresentada pelo modelo experimental e método de análise utilizado no presente estudo, a sensibilidade do μ -CT na avaliação do grupo MTA. O MTA é um silicato tricálcio que apresenta reação de presa, esta reação faz com que o material assuma densidade igual ou superior ao tecido ósseo onde foi aplicado, assim, os parâmetros avaliados BV, BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp e Tb.N, indicam para a presença de tecido ósseo na área, quando, na realidade, o MTA se faz presente como pode ser observado nos achados imaginológicos, levando então a valores falso-positivos para os parâmetros avaliados.

A experimentação animal também é um fator limitante para o presente trabalho, apesar de apresentar um sistema fisiológico complexo o animal possui tempos diferentes para processos homólogos ao meio biológico presente no *Homo Sapiens*. O modelo animal também pode divergir em resposta fisiológica frente ao mesmo estímulo quando comparado ao humano. Apesar de um bom modelo experimental, o uso do modelo animal exige a utilização posterior de testes em modelo experimental humano para confirmação dos dados coletados e se possível liberação para comercialização do produto desenvolvido.

Para que ocorra a extrapolação clínica, o presente tema ainda carece de estudos que visem coletar dados e respostas contundentes quanto ao benefício ou prejuízo da mistura entre MTA e substitutos ósseos particulados. Entretanto, os dados coletados no presente estudo apontam para um caminho onde a modulação e a aceleração do processo de reparo ósseo possa acontecer com qualidade e densidade óssea aceitável, permitindo desta forma reabilitar o paciente alvo, possivelmente em um menor tempo.

6. Conclusão

Com base nos resultados obtidos e considerando as limitações desse estudo é possível concluir que, estatisticamente, a adição de MTA nas 3 proporções testadas não demonstrou efetividade quando comparada ao uso isolado dos substitutos ósseos Bio-Oss® e Osteosynt®, ou na comparação com o reparo promovido pelo coágulo. No entanto, foi evidenciada tendências numéricas à superioridade na associação Osteosynt® + 15% MTA aos 7 dias e Osteosynt® + 5% MTA e Osteosynt® + 10% MTA nas análises aos 28 dias.

7. Referências

1. Chavda, S. and L. Levin, *Human studies of vertical and horizontal alveolar ridge augmentation comparing different types of bone graft materials: A systematic review*. J Oral Implantol, 2017.
2. Ahmed, W., et al., *Non-Vascularized Autogenous Bone Grafts for Reconstruction of Maxillofacial Osseous Defects*. J Coll Physicians Surg Pak, 2018. **28**(1): p. 17-21.
3. Raikar, S., et al., *Factors Affecting the Survival Rate of Dental Implants: A Retrospective Study*. J Int Soc Prev Community Dent, 2017. **7**(6): p. 351-355.
4. Onisor-Gligor, F., et al., *[Clinical study of sinus grafts and implants integration, in the posterior maxilla]*. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2009. **113**(4): p. 1141-5.
5. Elakkiya, S., A.S. Ramesh, and K. Prabhu, *Systematic analysis on the efficacy of bone enhancement methods used for success in dental implants*. J Indian Prosthodont Soc, 2017. **17**(3): p. 219-225.
6. Datta, H.K., et al., *The cell biology of bone metabolism*. J Clin Pathol, 2008. **61**(5): p. 577-87.
7. Yamaguchi, A., T. Komori, and T. Suda, *Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1*. Endocr Rev, 2000. **21**(4): p. 393-411.
8. Komori, T., *Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors*. J Cell Biochem, 2006. **99**(5): p. 1233-9.
9. Lee, S.J., M. Monsef, and M. Torabinejad, *Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations*. J Endod, 1993. **19**(11): p. 541-4.
10. Mente, J., et al., *Treatment outcome of mineral trioxide aggregate: repair of root perforations*. J Endod, 2010. **36**(2): p. 208-13.
11. Torabinejad, M. and N. Chivian, *Clinical applications of mineral trioxide aggregate*. J Endod, 1999. **25**(3): p. 197-205.
12. Tanomaru, J.M., et al., *Antimicrobial activity of endodontic sealers based on calcium hydroxide and MTA*. Acta Odontol Latinoam, 2008. **21**(2): p. 147-51.
13. Torabinejad, M., et al., *Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials*. J Endod, 1995. **21**(6): p. 295-9.
14. Thomson, T.S., et al., *Cementoblasts maintain expression of osteocalcin in the presence of mineral trioxide aggregate*. J Endod, 2003. **29**(6): p. 407-12.
15. Maroto, M., et al., *Dentin bridge formation after white mineral trioxide aggregate (white MTA) pulpotomies in primary molars*. Am J Dent, 2006. **19**(2): p. 75-9.
16. Asgary, S., et al., *Chemical differences between white and gray mineral trioxide aggregate*. J Endod, 2005. **31**(2): p. 101-3.
17. Vidovic Zdrilic, I., et al., *Mineral trioxide aggregate improves healing response of periodontal tissue to injury in mice*. 2017. **52**(6): p. 1058-1067.
18. Gandolfi, M., et al., *Osteoinductive potential and bone-bonding ability of ProRoot MTA, MTA Plus and Biodentine in rabbit intramedullary model: Microchemical characterization and histological analysis*. Dental Materials, 2017. **33**(5): p. e221-e238.
19. Schmitt, C.M., et al., *Anorganic bovine bone (ABB) vs. autologous bone (AB) plus ABB in maxillary sinus grafting. A prospective non-randomized clinical and histomorphometrical trial*. Clinical oral implants research, 2015. **26**(9): p. 1043-1050.

20. Chaves, M.D., et al., *Bovine hydroxyapatite (Bio-Oss((R))) induces osteocalcin, RANK-L and osteoprotegerin expression in sinus lift of rabbits*. J Craniomaxillofac Surg, 2012. **40**(8): p. e315-20.
21. Kim, D.M., et al., *Evaluation of the Bone-Regenerating Effects of Two Anorganic Bovine Bone Grafts in a Critical-Sized Alveolar Ridge Defect Model*. Int J Periodontics Restorative Dent, 2017. **37**(4): p. e234-e244.
22. Carvalho, P.S.P.d., et al., *Biomateriais aplicados a implantodontia*. Implant News, 2010: p. 56-65.
23. Pellizzer, E. and P. Perri de Carvalho, *Fundamentos em Implantodontia: uma visão contemporânea*. São Paulo: Quintessence, 2011.
24. Orsini, G., et al., *Maxillary sinus augmentation with Bio-Oss particles: a light, scanning, and transmission electron microscopy study in man*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2005. **74**(1): p. 448-57.
25. Jayme, S.J., et al., *Uso combinado de rhBMP-2, osso bovino particulado, tela de titânio, L-PRF e incisão a distância para reconstrução óssea maxilar extensa*. ImplantNewsPerio, 2016. **1**(3): p. 492-502.
26. Rodan, S.B., et al., *Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties*. Cancer research, 1987. **47**(18): p. 4961-4966.
27. Ahmad, M., M. McCarthy, and G. Gronowicz, *An in vitro model for mineralization of human osteoblast-like cells on implant materials*. Biomaterials, 1999. **20**(3): p. 211-220.
28. Anderson, H.C., et al., *The mechanism of bone induction and bone healing by human osteosarcoma cell extracts*. Clinical orthopaedics and related research, 1995(313): p. 129-134.
29. Gandolfi, M., et al., *Innovative silicate-based cements for endodontics: a study of osteoblast-like cell response*. Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 2008. **87**(2): p. 477-486.
30. Tsai, C.-L., et al., *Mineral trioxide aggregate affects cell viability and induces apoptosis of stem cells from human exfoliated deciduous teeth*. BMC Pharmacology and Toxicology, 2018. **19**(1): p. 21.
31. Takamiya, A.S., et al., *In Vitro and In Vivo Toxicity Evaluation of Colloidal Silver Nanoparticles Used in Endodontic Treatments*. J Endod, 2016. **42**(6): p. 953-60.
32. Luvizuto, E.R., et al., *The effect of BMP-2 on the osteoconductive properties of β -tricalcium phosphate in rat calvaria defects*. Biomaterials, 2011. **32**(15): p. 3855-3861.
33. Bouxsein, M.L., et al., *Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography*. Journal of bone and mineral research, 2010. **25**(7): p. 1468-1486.
34. Messori, M.R., et al., *Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvaria*. J Periodontal Res, 2008. **43**(6): p. 723-9.
35. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. Nature methods, 2012. **9**(7): p. 671.
36. Gomes-Filho, J.E., et al., *Influence of diabetes mellitus on tissue response to MTA and its ability to stimulate mineralization*. Dental Traumatology, 2015. **31**(1): p. 67-72.

37. Kurkcu, M., et al., *Anorganic bovine-derived hydroxyapatite vs β -tricalcium phosphate in sinus augmentation: a comparative histomorphometric study*. Journal of Oral Implantology, 2012. **38**(S1): p. 519-526.
38. Cardoso, H.A.I., *Síntese, caracterização e cinética de formação do pó de [alfa]-fosfato tricálcico de elevada pureza: Synthesis, characterization and reaction kinetics of high purity [alpha]-tricalcium phosphate*. 2014.
39. Pires, A.L.R., A.C. Bierhalz, and Â.M. Moraes, *Biomateriais: tipos, aplicações e mercado*. Química nova, 2015. **38**(7): p. 957-971.
40. PEREIRA, T., G. SANTOS, and G. FERNANDES, *SÍNTESE DE BETA FOSFATO TRICÁLCICO, POR REAÇÃO DE ESTADO SÓLIDO, PARA USO BIOMÉDICO*. Blucher Chemical Engineering Proceedings, 2015. **1**(3): p. 2293-2297.
41. Dorozhkin, S.V., *Bioceramics of calcium orthophosphates*. Biomaterials, 2010. **31**(7): p. 1465-1485.
42. Lambert, F., et al., *Impact of biomaterial microtopography on bone regeneration: comparison of three hydroxyapatites*. Clinical oral implants research, 2017. **28**(10): p. e201-e207.
43. Cordaro, L., et al., *Maxillary sinus grafting with Bio-Oss® or Straumann® Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial*. Clinical oral implants research, 2008. **19**(8): p. 796-803.
44. Berglundh, T. and J. Lindhe, *Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss®. An experimental study in the dog*. Clinical Oral Implants Research, 1997. **8**(2): p. 117-124.
45. Zitzmann, N.U., et al., *Alveolar ridge augmentation with Bio-Oss: a histologic study in humans*. International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry, 2001. **21**(3).
46. Hislop, W., P. Finlay, and K. Moos, *A preliminary study into the uses of anorganic bone in oral and maxillofacial surgery*. British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 1993. **31**(3): p. 149-153.
47. Maiorana, C., et al., *Reduction of autogenous bone graft resorption by means of bio-oss coverage: a prospective study*. International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry, 2005. **25**(1).
48. Lee, J.H., et al., *Fabrication and evaluation of porous beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite (60/40) composite as a bone graft extender using rat calvarial bone defect model*. The Scientific World Journal, 2013. **2013**.
49. Trubiani, O., et al., *Functional assay, expression of growth factors and proteins modulating bone-arrangement in human osteoblasts seeded on an anorganic bovine bone biomaterial*. Eur Cell Mater, 2010. **20**: p. 72-83.
50. Poi, W.R., et al., *Influência da pasta à base de metronidazol a 10% e lidocaína a 2% sobre o processo de reparo em alvéolo dental infectado: análise histológica e histométrica em ratos*. Rev Odontol UNESP, 1998: p. 53-72.
51. Braz, F., et al., *Emprego de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita no reparo de defeito induzido em crânio de ratos*. Acta Cir. Bras, 2003. **18**(1): p. 1-9.
52. Duarte, M.A.H., et al., *pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2003. **95**(3): p. 345-347.
53. Fridland, M. and R. Rosado, *MTA solubility: a long term study*. Journal of endodontics, 2005. **31**(5): p. 376-379.
54. Gomes-Filho, J.E., et al., *Evaluation of the tissue reaction to fast endodontic cement (CER) and Angelus MTA*. Journal of endodontics, 2009. **35**(10): p. 1377-1380.

55. ف. رهنگ, et al., *A comparison between gray and white mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium enriched mixture (CEM) cytotoxicity in L929 and Saos-2 cell lines*. International Journal of Advanced Biotechnology and Research. **7**(S5): p. 310-317.
56. Alcaide, M., et al., *L929 fibroblast and Saos-2 osteoblast response to hydroxyapatite- β TCP/agarose biomaterial*. Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 2009. **89**(2): p. 539-549.
57. Fassina, L., et al., *In vitro electromagnetically stimulated SAOS-2 osteoblasts inside porous hydroxyapatite*. Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 2010. **93**(4): p. 1272-1279.
58. Müller, W.E., et al., *Amorphous polyphosphate-hydroxyapatite: A morphogenetically active substrate for bone-related SaOS-2 cells in vitro*. Acta biomaterialia, 2016. **31**: p. 358-367.
59. Carmagnola, D., P. Adriaens, and T. Berglundh, *Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss®*. Clinical oral implants research, 2003. **14**(2): p. 137-143.
60. MENEZES, J.D., et al., *Bioactive glass added to autogenous bone graft in maxillary sinus augmentation: a prospective histomorphometric, immunohistochemical, and bone graft resorption assessment*. Journal of Applied Oral Science, 2018. **26**.
61. Al-Nawas, B. and E. Schiegnitz, *Augmentation procedures using bone substitute materials or autogenous bone—a systematic review and meta-analysis*. Eur J Oral Implantol, 2014. **7**(Suppl 2): p. S219-S234.
62. Gomes, E., et al., *Aspectos clínicos relevantes no planejamento cirúrgico-protético em implantodontia*. Salusvita, 2008. **27**(1): p. 111-124.
63. de Carvalho, M.A., et al., *Estudo clínico da relação do torque de inserção dos implantes e sua osseointegração*. Essa, 2008. **3**: p. 4.
64. Rocha, F.A. and C.N. Elias, *Influência da técnica cirúrgica e da forma do implante na estabilidade primária*. Revista Odontológica do Brasil Central, 2010. **19**(48).
65. Durão, S., et al., *The biomaterial-mediated healing of critical size bone defects in the ovariectomized rat*. Osteoporosis international, 2014. **25**(5): p. 1535-1545.
66. Palin, L.P., et al., *Daily melatonin administration improves osseointegration in pinealectomized rats*. Journal of Applied Oral Science, 2018. **26**.
67. Sousa, D.N.d., *Estudo do efeito local da sinvastatina na neoformação óssea de defeitos na calvária de ratos*.
68. Oliveira, G.J.P.L.d., *Efeito do extrato insaponificável de abacate e soja na doença periodontal induzida, na osseointegração de implantes e no reparo de defeitos críticos de calvaria de ratos*. 2014.
69. Fernandes, P.G., *Aplicação da microtomografia computadorizada para a análise morfológica bi e tridimensional na avaliação da perda óssea experimental em ratos*. 2014, Universidade de São Paulo.
70. Lopes, H.B., *Efeito da membrana de Poli (vinilideno-trifluoretileno)/titanato de bário sobre a formação óssea em defeitos criados em calvárias de ratos*. Universidade de São Paulo.

8. Anexo A – Comitê de ética em estudo animal

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  **ARAÇATUBA**

CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Avaliação preliminar da resposta tecidual, citotoxicidade e do reparo ósseo em defeitos críticos em calvária de ratos utilizando substituto ósseo xenógenos particulado associado ou não ao MTA"**, Processo FOA nº 00175-2019, sob responsabilidade de Wirley Gonçalves Assunção apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 15 de Fevereiro de 2019.

VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 11 de Fevereiro de 2020.

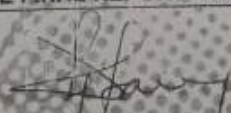
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 11 de Março de 2020.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Preliminary evaluation of the tissue response, cytotoxicity and bone repair in critical defects in calvaria of rats using particulate xenogenous bone substitute associated or not to MTA"**, Protocol FOA nº 00175-2019, under the supervision of Wirley Gonçalves Assunção presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on February 15, 2019.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: February 11, 2020.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: March 11, 2020.


Prof. Ass. Dr. Leobardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (16) 3636-3234 Email CEUA: ceua@flos.unesp.br

9. ANEXO B – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DO PERIÓDICO: THE INTERNATIONAL JOURNAL OF ORAL & MAXILLOFACIAL IMPLANTS GUIDELINES FOR AUTHORS MANUSCRIPT SUBMISSION

Submit manuscripts via JOMI's online submission service: www.manuscriptmanager.com/jomi Manuscripts should be uploaded as a Word (doc) file with tables and figures preferably embedded at the end of the document. No paper version is required. Acceptable material. Original articles are considered for publication on the condition they have not been published or submitted for publication elsewhere (except at the discretion of the editors). Articles on implant or tissue engineering (TE) basic or clinical research, clinical applications of implant/TE research and technology, proceedings of pertinent symposia or conferences, quality review papers, and matters of education related to the implant/TE field are invited.

Number of authors. Authors listed in the byline should be limited to four. Secondary contributors can be acknowledged at the end of the article. (Special circumstances will be considered by the editorial chairman.) Review/editing of manuscripts. Manuscripts will be reviewed by the editorial chairman and will be subjected to blind review by the appropriate section editor and editorial staff consultants with expertise in the field that the article encompasses. The publisher reserves the right to edit accepted manuscripts to fit the space available and to ensure conciseness, clarity, and stylistic consistency, subject to the author's final approval.

Adherence to guidelines. Manuscripts that are not prepared in accordance with these guidelines will be returned to the author before review.

ONLINE ONLY ARTICLES

All technology and case reports will appear in online format only. Articles are listed in the issue's Table of Contents and abstracts are printed in the issue. Full text of articles is available online.

MANUSCRIPT PREPARATION

- The journal will follow as much as possible the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Group) in regard to preparation of manuscripts and authorship (Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Intern Med* 1997;126:36–47). See <http://www.icmje.org>
- Manuscripts should be double-spaced with at least a one-inch margin all around. Number all pages. Do not include author names as headers or footers on each page.

- **Title page.** Page 1 should include the title of the article and the name, degrees, title, professional affiliation, and full address of all authors. Phone, fax, and e-mail address must also be provided for the corresponding author, who will be assumed to be the first-listed author unless otherwise noted. If the paper was presented before an organized group, the name of the organization, location, and date should be included.
- **Abstract/key words.** The abstract should include a maximum of 350 words. A list of key words should be provided, not to exceed six. Abstracts for basic and clinical research articles must be structured with the following four sections: Purpose, Materials and Methods, Results, and Conclusions. Abstracts of short communications should also be structured but should be a maximum of 250 words. For all other types of articles (ie, literature reviews, technical and case reports), abstracts should not exceed 250 words and need not be structured.
- **Article text.** Currently there is no article page limit (within reason).
- **Acknowledgments.** Persons who have made substantive contributions to the study can be acknowledged at the end of the article. Also specify grant or other financial support, citing the name of the supporting organization and grant number.
- **Legends.** Figure legends should be typed as a group at the end of the manuscript. Detailed legends are encouraged. For photomicrographs, specify original magnification and stain.
- **Tables.** Each table should be logically organized, typed on a separate page at the end of the manuscript, and numbered consecutively. Table title and footnotes should be typed on the same page as the table.
- **Abbreviations.** The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.
- **Trade names.** Generic terms are to be used whenever possible, but trade names and manufacturer name should be included parenthetically at first mention.
- **Numbers.** Per SI convention, authors are requested to use decimal points rather than commas for fractional numbers.

REFERENCES

- All references must be cited in the text, numbered in order of appearance.
- The reference list should appear at the end of the article in numeric sequence.
- Do not include unpublished data or personal communications in the reference list. Cite such references parenthetically in the text and include a date.

- Avoid using abstracts as references.

• Provide complete information for each reference, including names of all authors (up to six). If the reference is to part of a book, also include title of the chapter and names of the book's editor(s). Journal reference style: 1. Waasdorp J, Reynolds MA. Allogeneic bone onlay grafts for alveolar ridge augmentation: A systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2010;25:525–531.

Book reference style: 1. Wikesjo UME, Hanisch O, Sigurdsson TJ, Caplanis N. Application of rhBMP-2 to alveolar and periodontal defects. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE (eds). *Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. Chicago: Quintessence, 1999:269–286

ARTICLE ACCEPTANCE

Article acceptance is pending receipt of images judged to be of sufficient quality for publication (see the guidelines below). Once a manuscript is accepted, authors should submit high-resolution digital image files (by email or on disk) to: Managing Editor JOMI Quintessence Publishing Co, Inc 4350 Chandler Drive Hanover Park, IL 60133 Email: jomi.submit@quintbook.com

The disk/package should be labeled with the first author's name, shortened article title, and article number.

DIGITAL IMAGES/ACCEPTED ARTICLES

When preparing final images to send, consider the following points:

- Resolution must be at least 300 dpi when the image is 3 inches wide.
- Images saved in TIFF format are preferred, but JPG or EPS files are acceptable.
- Images grouped together must be saved as individual files.
- Images containing type should either be saved as a layered file or provided along with a second file with type removed.
- Line art (graphs, charts, drawings) should be provided as vector art (AI or EPS files)
- Please do not embed images into other types of documents (eg, Word, Excel, PowerPoint, etc).

MANDATORY SUBMISSION FORM

The Mandatory Submission Form (accessible at www.quintpub.com) must be signed by all authors and can be uploaded as a separate document with the article submission, or

it can be mailed (see address above) or faxed (630-736-3634) to the JOMI Managing Editor.

PERMISSIONS AND WAIVERS

- Permission of author and publisher must be obtained for the direct use of material (text, photos, drawings) under copyright that does not belong to the author.
- Waivers must be obtained for photographs showing persons, otherwise faces will be masked to prevent identification.
- Permissions and waivers should be faxed along with the Mandatory

Submission Form to the JOMI Managing Editor (630-736-3634).

REPRINTS

Reprints can be ordered from the publisher. Authors receive a 40% discount on quantities of 100 or 200.