

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

GUSTAVO CAVIQUIOLI

JOÃO GUILHERME DELLA COLETTA ROZANTE

**ESTUDO DA REPARAÇÃO ÓSSEA EM DEFEITOS
REALIZADOS EM CALVÁRIA DE COELHOS
UTILIZANDO VITROCERÂMICA BIOATIVA
BIOSILICATO®**

BAURU
2011

**GUSTAVO CAVIQUIOLI
JOÃO GUILHERME DELLA COLETTA ROZANTE**

**ESTUDO DA REPARAÇÃO ÓSSEA EM DEFEITOS
REALIZADOS EM CALVÁRIA DE COELHOS
UTILIZANDO VITROCERÂMICA BIOATIVA
BIOSILICATO®**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de Cirurgião-Dentista, sob orientação da Prof^a Dr^a Mariza Akemi Matsumoto.

BAURU
2011

C382e

Caviquioli, Gustavo

Estudo da reparação óssea em defeitos realizados em calvária de coelhos utilizando vitrocerâmica bioativa Biosilicato® / Gustavo Caviquioli, João Guilherme Della Coletta Rozante -- 2011.

41f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Mariza Akemi Matsumoto

Co-orientador: Prof. Ms. Leandro de Andrade Holgado

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) –

Universidade Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Reparo ósseo. 2. Coelhos. 3. Vidro bioativo. 4. Biomateriais. I. Rozante, João Guilherme Della Colletta. II. Matsumoto, Mariza Akemi. III. Holgado, Leandro de Andrade. IV. Título.

**GUSTAVO CAVIQUIOLI
JOÃO GUILHERME DELLA COLETTA ROZANTE**

**ESTUDO DA REPARAÇÃO ÓSSEA EM DEFEITOS REALIZADOS
EM CALVÁRIA DE COELHOS UTILIZANDO VITROCERÂMICA
BIOATIVA BIOSILICATO®**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de Cirurgião-Dentista, sob orientação da Prof^a Dr^a Mariza Akemi Matsumoto.

Banca examinadora:

Prof^a Dr^a Mariza Akemi Matsumoto
Universidade Sagrado Coração

Prof^o Dr^o Roberto Yoshio Kawakami
Universidade Sagrado Coração

Prof^o Ms. Leandro de Andrade Holgado
Universidade Sagrado Coração

Bauru, 30 de junho de 2011

Dedicamos este trabalho primeiramente à Deus, pois sem Ele, nada seria possível e não estaríamos aqui reunidos, desfrutando, juntos, destes momentos que nos são tão importantes.

Aos nossos pais, pelo esforço, dedicação e compreensão, em todos os momentos desta e de outras caminhadas.

Dedicamos também à nossa orientadora Prof^a Dr^a Mariza Akemi Matsumoto que nos ajudou em todos os momentos desta etapa.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos nossos queridos colegas, amigos e demais professores, em especial ao Profº Ms. Leandro de Andrade Holgado, ao Profº Ms. Rodrigo Ricci Vivan, ao Profº Drº Roberto Yoshio Kawakami e a colega Cláudia Cristina Bigueti, que colaboraram durante toda a execução deste trabalho de conclusão de curso.

RESUMO

Inúmeros biomateriais tem sido desenvolvidos a fim de atuarem como substitutos ósseos. No presente estudo avaliou-se o comportamento de uma nova vitrocerâmica bioativa granulada no reparo de defeitos ósseos. Trinta coelhos foram submetidos à cirurgias para confecção de defeitos nos ossos parietais, distribuídos em 4 grupos de acordo com o material de preenchimento: 1 - coágulo (Controle), 2 - osso autógeno triturado, 3 - vitrocerâmica bioativa (Biosilicato®), e 4 - vitrocerâmica bioativa e osso autógeno triturado. Os espécimes foram removidos após 7, 14 e 30 dias para análise microscópica morfológica. Padrões similares de neoformação óssea foram observados nos grupos experimentais, com deposição de osso primário mais evidente a partir do 14^o dia diretamente sobre os fragmentos não-viáveis do enxerto ósseo, bem como dos grânulos do biomaterial, e maturação óssea aos 30 dias. Apesar da reação tipo corpo estranho induzida quando da presença da vitrocerâmica, já evidente aos 14 dias, não houve prejuízo da neoformação e maturação óssea no decorrer do processo. A presença do biomaterial e do enxerto ósseo proporcionou maior volume na região do defeito até o último período, diferente do Grupo Controle, quando se observou a presença de trabéculas curtas permeadas por tecido conjuntivo, resultando em reparo com espessura menor que osso original.

O Biosilicato® mostrou comportamento satisfatório durante o reparo de defeitos ósseos, permitindo neoformação óssea diretamente sobre suas superfícies quando utilizado isoladamente ou associado com osso autógeno.

Palavras-chave: Reparo Ósseo. Coelhos. Vidro Bioativo. Biomateriais.

ABSTRACT

A number of biomaterials have been developed in order to act as bone substitutes. In the present study, the behavior of a new granulate bioactive vitroceramic in bone repair defects was evaluated. Thirty rabbits underwent surgical confections of defects in parietal bones, distributed into 4 groups, according to the filling material: 1 – blood clot (Control), 2 – particulate autogenous bone, 3 – bioactive vitroceramic (Biosilicato®), and 4 - bioactive vitroceramic and particulate autogenous bone. Specimens were retrieved after 7, 14, and 30 days for microscopic morphological analysis. Similar patterns of new bone formation were observed amongst experimental groups, with a more evident woven bone deposition at day 14, directly upon the non-viable bone grafts particles, as well as on the biomaterial granules, and bone maturation at day 30. Despite the foreign body reaction induced in the presence of the vitroceramic, evident from the 14th day, no deficit on bone formation and maturation occurred during the process. The presence of both biomaterial and bone graft offered a greater volume in the region of the defect until the last period, differently from the Control Group where small trabeculas surrounded by connective tissue could be seen, resulting in a repaired defect thinner than the original bone.

Biosilicato® presented a satisfactory behavior during the repair of bone defects, permitting new bone formation directly upon its granules surfaces when used associated with bone graft or alone.

Key-words: Bone Repair. Rabbit. Bioactive Glass-Ceramic. Biomaterials.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - a) Região da calota a ser operada tricotomizada; b) antissepsia da área cirúrgica; c) infiltração com anestésico local.....**p.18**

Figura 2 - a) Incisão; b) descolamento dermoperiostal para exposição da superfície óssea.....**p.18**

Figura 3 - a) Confecção do defeito na calota craniana com broca trefina e irrigação; b) vitrocerâmica bioativa (Biosilicato®); c) preenchimento do defeito do lado direito com coágulo sanguíneo; d) defeito do lado esquerdo preenchido com o biomaterial.....**p.19**

Figura 4 - a) Reposicionamento do periósteo seguido de sutura simples; b) sutura em pele contínua.....**p.19**

Figura 5 - Retículo posicionado sobre o corte histológico sobre a tela do computador.....**p. 21**

Figura 6 - Aspecto macroscópico dos defeitos preenchidos com coágulo (Cg) e biosilicato (Bio) em a, e enxerto (Enx) e enxerto com biosilicato (Enx-Bio) em b.....**p.23**

Figura 7 - Controle 7 dias – a, b) Tecido de granulação (tg) preenchendo o defeito ósseo (a – H.E.; b – Tricrômico de Goldner; barra = 200 µm).....**p.25**

Figura 8 - Controle 14 dias – a, b) Focos de neoformação óssea (Op) em meio a intensa atividade osteogênica (setas) (a – H.E.; b – Tricrômico de Goldner; barra = 200 µm).....**p.26**

Figura 9 - Controle 30 dias – a, b) Trabéculas ósseas curtas e arredondadas apresentando focos de atividade osteogênica (setas); c, d) Linhas de reversão

(Lrv) e presença de osteoclastos (Ocl) indicando atividade de maturação (a, b – Tricrômico de Goldner; c, d – H.E.; barra = 200 µm).....**p.26**

Figura 10 - Enxerto 7 dias – Observa-se tecido de granulação (tg) em meio aos fragmentos de enxerto ósseo não-viáveis (Enx) (a – H.E.; b – Tricrômico de Goldner; barra = 200 µm).....**p.27**

Figura 11 – Enxerto 14 dias – a,b) tecido ósseo neoformado (Op) sendo depositado na superfície do enxerto (Enx) intensa atividade osteoblástica (setas) (a,b – Tricrômico de Goldner; barra = 200 µm).....**p.27**

Figura 12 - Enxerto 30 dias – a) Trabéculas ósseas em maturação, marcadas por linhas basofílicas de reversão (Lrv); b) medula óssea (m) organizada em meio a tecido ósseo maduro (O); c) atividade osteoclástica (Ocl); d) maturação das trabéculas neoformadas (tb) por sobre fragmento de enxerto não-viável (Enx) (a, b – H.E.; c, d – Tricrômico de Goldner; barra = 200 µm).....**p.28**

Figura 13 - Biosilicato 7 dias – a, b) Espaços irregulares correspondentes às partículas do biomaterial (*) em meio a tecido de granulação (tg) (a – H.E.; b – Tricrômico de Goldner; ; barra = 200 µm).....**p.29**

Figura 14 - Biosilicato 14 dias – Partículas do biosilicato (*) circundadas ora por tecido de granulação (tg), em a e b, ora por tecido ósseo neoformado (op) em justaposição à superfície do biomaterial, em c e d. Observam-se, ainda, células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho (CG) (a – H.E.; b, c, d – Tricrômico de Goldner; barra = 200 µm).....**p.29**

Figura 15 - Biosilicato 30 dias – a, b) Persistência das partículas do biomaterial (*) em meio a tecido ósseo em maturação, marcado por numerosas linhas basofílicas de reversão (Lrv); b) tecido ósseo (o) em justaposição às partículas do

biomaterial (*); d) célula gigante multinucleada tipo corpo estranho (CG) sobre o biomaterial (a,b – H.E.; c, d - Tricrômico de Goldner; barra = 200 µm).....**p.30**

Figura 16 - Enxerto e Biosilicato 7 dias – a, b) Fragmentos de osso enxertado (Enx) e partículas do biomaterial (*) em meio a tecido de granulação (tg) (a – H.E.; b – Tricrômico de Goldner; barra = 200 µm).....**p.30**

Figura 17 - Enxerto e Biosilicato 14 dias – a) Fragmentos do enxerto (Enx) sendo reabsorvidos; b) partículas do biomaterial (*) associados a células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho (CG); c, d) osso neoformado (Op) sendo depositado sobre a superfície do enxerto ósseo (Enx) (a – H.E.; b, c, d – Tricrômico de Goldner; barra = 200 µm).....**p.31**

Figura 18 - Enxerto e Biosilicato 30 dias – a, b) Tecido ósseo em maturação em contato com a superfície do biomaterial (*) marcado por linhas de reversão (Lrv); c) medula óssea (m) organizada; d) partícula do biomaterial (*) sendo fagocitada por células multinucleadas tipo corpo estranho (CG) (a, b – H.E.; c, d – Tricrômico de Goldner; barra = 200 µm).....**p.32**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Médias (%) de osso neoformado no Grupo Controle aos 7, 14 e 30 dias.....**p.32**

Tabela 2 – Médias (%) de osso neoformado e enxerto ósseo no Grupo Enxerto aos 7, 14 e 30 dias.....**p.33**

Tabela 3 – Médias (%) de osso neoformado e biomaterial no Grupo Biosilicato aos 7, 14 e 30 dias.....**p.33**

Tabela 4 – Médias (%) de osso neoformado, enxerto e biomaterial no Grupo Enxerto e Biosilicato aos 7, 14 e 30 dias.....**p.33**

Tabela 5 - Resultados estatísticos obtidos aos 14 dias pós-operatório..... **p.34**

Tabela 6 – Resultados estatísticos obtidos aos 30 dias pós-operatório..... **p.34**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 GERAIS.....	16
2.2 ESPECÍFICOS.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	17
3.2 DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA MORFOLÓGICA.....	20
3.3 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	20
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
4. RESULTADOS.....	23
4.1 EUTANASIA DOS ANIMAIS.....	23
4.2 ANÁLISE MACROSCÓPICA.....	23
4.3 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA.....	24
4.4 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	32
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
5. DISCUSSÃO.....	35
6. CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS.....	40
ANEXOS.....	42

1. INTRODUÇÃO

Vários métodos têm sido estudados na tentativa de minimizar o tempo de reparo ósseo, bem como, diminuir a chance de desenvolvimento de possíveis complicações advindas do processo anormal de reparação óssea (HADJIARGYROU ET AL, 1998).

Os tratamentos dos defeitos ósseos podem variar, dependendo de sua localização, extensão e à que se destina a área reparada. Para tanto, pode-se utilizar desde o próprio coágulo, formado a partir do sangramento local, até os enxertos ósseos autógenos, alógenos, xenógenos e os biomateriais sintéticos, entre tantas outras opções.

Os enxertos autógenos são considerados “padrão ouro” para tratamento de defeitos ósseos devido ao risco diminuído de resposta imune adversa, da sua capacidade osteoindutora que irá fornecer células funcionais de caráter osteogênico que irá propiciar a neoformação óssea e também uma propriedade osteocondutora que proporcionará uma estrutura em forma de arcabouço que favorece o processo de osteogênese (BLOCK & KENT 1997; CRESPI ET AL. 2007; SBORDONE ET AL. 2009; GERRESSEN ET AL. 2009). Todavia, o uso de enxertos ósseos autógenos requer um leito doador cirúrgico maior, anestesia geral prolongada em alguns casos e promove um aumento da morbidade, ausência de tecido ósseo viável disponível para transplantes autógenos (RAGHOEBAR ET AL., 2007; PALMER ET AL., 2008). Os aloenxertos envolvem a coleta e processamento do osso de cadáveres, transplantados mais tarde nos pacientes. Os xenoenxertos, de origem bovina ou suína também são usados para defeitos ósseos, porém com um potencial para transmissão de doenças (HSIONG & MOONEY, 2006).

Os biomateriais são utilizados nos vários domínios da medicina e odontologia, permanecendo em contato com os tecidos biológicos de forma profunda ou superficial. Por esta razão estes materiais devem ser cuidadosamente analisados, a fim de avaliar seu comportamento no sistema biológico e verificar possível ocorrência de toxicidade aplicada ao mesmo.

Atualmente, um promissor biomaterial estudado é o vidro bioativo, composto por $\text{Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$. De acordo com Hench & Polak (2002), este biovidro, quando em contato com o tecido vivo e na presença de fluidos corpóreos, desenvolve uma camada de hidroxicarbonatoapatita (HCA) na sua superfície, promovendo uma ligação química extremamente forte entre o tecido e o implante. Esta camada interfacial assemelha-se aos processos naturais de reconstrução dos tecidos e é química e estruturalmente equivalente à fase mineral do osso. Devido a essas propriedades, os vidros bioativos são utilizados há cerca de 30 anos na forma de implantes em cirurgias cranio-maxilo-faciais e como substitutos do tecido ósseo (HENCH & POLAK, 2002).

Apesar dos seus efeitos benéficos para a formação óssea, o uso dos vidros bioativos tem sido limitado devido às baixas propriedades mecânicas destes materiais (JAMES, 1995). Esta constatação estimulou Hench, então pesquisador da University of Florida, e os pesquisadores Zanotto e Peitl do Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) da UFSCar, a buscarem uma vitrocerâmica que conservasse o elevado nível de bioatividade apresentado pelos vidros bioativos e ao mesmo tempo apresentasse propriedades mecânicas superiores a estes. Assim, esses pesquisadores obtiveram, na década de 90, uma vitrocerâmica altamente bioativa e com elevadas propriedades mecânicas, denominada Biosilicato® (ZANOTTO ET AL., 2004).

Como a maioria dos vidros bioativos, a composição química do Biosilicato® apresenta os elementos químicos silício, oxigênio, sódio, cálcio e fósforo (Si, O, Na, Ca e P), sendo liberados em solução na forma de Si(OH)_4 , Na^+ , Ca^{2+} e PO_4^{2-} . Estes são liberados em pequenas quantidades no processo de dissolução e formação da camada de hidroxicarbonatoapatita na superfície do Biosilicato®, que possibilita o estabelecimento de uma ligação química extremamente forte com o tecido ósseo e semelhante química e estruturalmente à fase mineral do osso, assim como ocorre com os vidros bioativos (RAVAGNANI, 2003).

No entanto, importante, porém, poucas pesquisas foram desenvolvidas para avaliação do comportamento biológico deste material. Moura e colaboradores (2007) em estudo *in vitro*, observaram formação de tecido *bone-like* por células

osteogênicas, quando em contato com o Biosilicato® após 17 dias, além do desenvolvimento de uma camada de apatita sobre a superfície do material após 24 horas em líquido simulando os fluidos corporais.

Avaliando o mesmo material, Granito et al. (2009) observaram satisfatória atividade osteogênica do Biosilicato® quando utilizado em defeitos em tíbias de ratos comparando-o a outro biovidro, o Bioglass®, após análise microscópica histológica subjetiva dos defeitos.

Deste modo, tornou-se relevante o desenvolvimento de mais estudos relacionados ao comportamento *in vivo* deste novo material, com análises qualitativas e quantitativas acerca da sua atividade durante a neoformação óssea para utilização como substituto ósseo em procedimentos reconstrutivos, tanto de maneira isolada, quanto associado ao enxerto ósseo autógeno triturado, como usualmente utilizados na prática clínica.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAIS

O presente estudo teve por objetivo avaliar a eficácia da vitrocerâmica bioativa (Biosilicato®) como material de preenchimento de defeitos ósseos no processo de reparo ósseo, associado ou não a enxerto ósseo autógeno triturado.

2.2 ESPECÍFICOS

Utilizar como parâmetros de análise métodos morfológicos, microscópicos e histomorfométricos conforme relacionados a seguir:

- Padrão histopatológico das lesões coradas em H.E e Tricrômico de Masson;
- Quantificação de tecido ósseo neoformado na área de interface enxerto/leito receptor por meio de histomorfometria de área.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Primeiramente, este trabalho passou por avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Sagrado Coração e foi aprovado sob o protocolo número 110/09.

Foram utilizados 30 coelhos Nova Zelândia machos, com idade variando entre 4 a 6 meses de idade e peso variando de 3 a 4Kg. Durante todo o período experimental os animais permaneceram confinados em gaiolas de aço individuais no Biotério da Universidade Sagrado Coração (USC), sendo limpas diariamente, sob condições adequadas de temperatura e ciclo de luz de 12 horas claro/escuro e exaustão do ar, e recebendo água e ração sem restrição.

Os animais foram divididos aleatoriamente a fim de compor os Grupos 1, 2, 3 e 4 contendo cinco animais cada, a serem eutanasiados em três tempos diferentes: a) 7 dias, b) 14 dias e c) 30 dias, como se segue:

- Grupo 1 - Defeitos ósseos preenchidos por coágulo sanguíneo;
- Grupo 2 - Defeitos ósseos preenchidos por enxerto ósseo autógeno triturado;
- Grupo 3 - Defeitos ósseos preenchidos por vitrocerâmica bioativa;
- Grupo 4 - Defeitos ósseos preenchidos por vitrocerâmica bioativa associada a osso autógeno triturado.

Ao início do delineamento experimental, todos os animais foram submetidos à cirurgia para a indução do defeito ósseo. Assim, procedeu-se a anestesia geral por meio de injeção intramuscular do anestésico cloridrato de quetamina a 1% (Francotar, Virbac Ltda., São Paulo, Brasil) associado ao sedativo cloridrato de xilazina a 2% (Virbaxyl 2%, Virbac Ltda., São Paulo, Brasil), na dosagem recomendada pelo fabricante.

Após tricotomia da calota craniana, a anti-sepsia foi realizada com solução aquosa de polivinilpirolidona 1% (Ceras Johson, Rio de Janeiro, Brasil) e anestesia local com mepivacaína 2% e adrenalina 1:100.000 (Figura 1 a, b, c).



Figura 1 – a) Região da calota a ser operada tricotomizada; b) antissepsia da área cirúrgica; c) infiltração com anestésico local.

Sobre a pele da calvária, na linha média, foi realizada a incisão com posterior descolamento dermo-periosteal, que permitiu o acesso ao tecido ósseo (Figura 2 a, b).

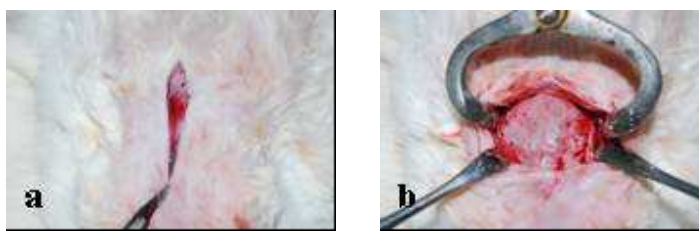


Figura 2 – a) Incisão; b) descolamento dermoperiosteal para exposição da superfície óssea.

Uma broca trefina apresentando diâmetro interno de 10 mm, montada em peça reta em motor de baixa rotação, foi utilizada pra realizar os defeitos ósseos na calvária dos animais, um em cada lado da sutura sagital, removendo-se totalmente a cúpula, permanecendo intacta a meninge dura-máter. Os defeitos do lado direito do coelho foram preenchidos com coágulo por sangramento espontâneo da área, e o defeito do lado esquerdo do coelho foi preenchido por vitrocerâmica bioativa (Biosilicato®, granulometria de 180-212 μ m) até o preenchimento total do mesmo, alcançando a altura da cortical externa (Figura 3 a, b, c, d). Deste modo compôs-se os Grupos 1 e 3.

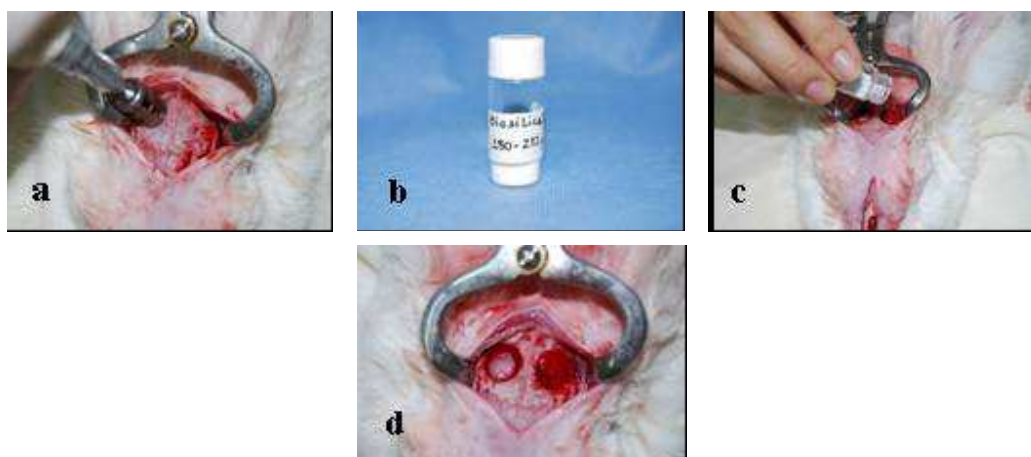


Figura 3 – a) Confecção do defeito na calota craniana com broca trefina e irrigação; b) vitrocerâmica bioativa (Biosilicato®); c) preenchimento do defeito do lado direito do coelho com coágulo sanguíneo; d) defeito do lado esquerdo preenchido com o biomaterial.

De modo semelhante, os animais que compuseram os Grupo 2 e 4 foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, diferindo no tipo de material a ser inserido nos defeitos ósseos. Nos defeitos do lado direito do animal foi inserido o enxerto ósseo triturado, utilizando-se o próprio fragmento ósseo removido da calota para a confecção dos defeitos, e no lado esquerdo, o enxerto triturado misturado ao biosilicato.

Posteriormente, os tecidos foram reposicionados e suturados por planos com fio de nylon 4-0 (Ethicon-Johnson&Johnson, São José dos Campos, Brasil) (Figura 4 a, b).

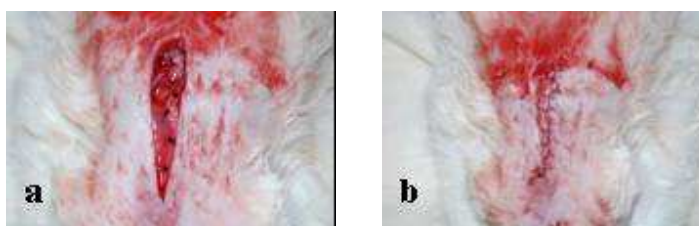


Figura 4 – a) Reposicionamento do perióstio seguido de sutura simples; b) sutura em pele contínua festonada.

Os animais receberam antibiótico Flotril 2,5% (Schering-Plough S.A., Rio de Janeiro, Brasil) na dose de 0,2mL/Kg (equivalente a 5mg/Kg de peso de enrofloxacin) por três dias e analgésico de ação central cloridrato de tramadol na dose de 5mg/kg em aplicação intramuscular imediatamente após o procedimento cirúrgico.

Ao final dos períodos experimentais estabelecidos, todos os animais foram eutanasiados para as avaliações histopatológicas. Para tanto, os mesmos foram anestesiados e sacrificados por meio de sobredosagem anestésica. As calotas cranianas contendo os defeitos ósseos foram removidas *en bloc* com auxílio discos diamantados em baixa rotação com irrigação abundante e imediatamente fixados em formalina (Merck) a 10% por 48 horas. Posteriormente, os espécimes foram lavados em água corrente por 24 horas antes de imersas em solução de EDTA à 10% para desmineralização dos mesmos, até que apresentassem consistência suficiente para a microtomia. As lâminas com cortes semi-seriados de 5µm de espessura foram coradas com H.E. (hematoxilina e eosina) e Tricrômico de Goldner.

3.2 DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA MORFOLÓGICA

A descrição morfológica das lesões foi feita em todos os espécimes considerando padrão de reparação óssea na presença dos biomateriais, como: atividade osteogênica, neoformação óssea, presença de inflamação, atividade osteocondutora e reabsorção do biomaterial.

3.3 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Inicialmente, a metodologia proposta para obtenção da histomorfometria das regiões de reparo ósseo das áreas enxertadas, foi utilizar o programa Programa Image Pro-Plus – Versão 5.1 para Windows (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD, EUA), nos cortes corados em Tricrômico de Goldner. O programa converte a cor original dos tecidos em tons a serem selecionados pelo operador e expressa os valores em unidades µm², previamente calibrados no aparelho. Porém, as peças coradas não proporcionaram a diferenciação de cor necessária entre tecido ósseo neoformado e tecido maduro, especialmente quando na fase de incorporação dos mesmos e maturação do osso primário, para a obtenção precisa dos valores de áreas reparadas. Deste modo, optou-se pelo

método de contagem de pontos para esta análise, a qual foi adaptada pelos autores (MELO, 2007). Para realização da contagem, as imagens dos cortes histológicos das regiões de interface entre enxerto e leito receptor foram capturadas em microscópio Nikon, aumento de 10x, com uma resolução de 300 dpis.

A imagem capturada foi exibida utilizando-se programa de computador Microsoft Office Power Point®, visualizada no seu tamanho real, em monitor de 19 polegadas, tela do tipo *Wide Screen*. Para a realização da contagem, um retículo foi sobreposto ao monitor (Figura 5), considerando-se apenas os pontos que coincidiram dentro do osso neoformado na região interface.



Figura 5 – Retículo posicionado sobre o corte histológico sobre a tela do computador.

Conforme visualizado na Figura 5, o sistema de retículo adotado apresentou um total de 408 pontos, sendo que 396 pontos incidiram em toda a imagem. Os pontos apresentaram-se dispostos de forma de traços de 200 micrometros, não coincidentes, com espaçamento de mesma largura, confeccionados em folha tamanho A4 transparente.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por meio dos testes de Análise de Variância (ANOVA) e para individualização, o teste de Tukey e Dunet. O nível de probabilidade de erro foi fixado em 5% ($P < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 ASPECTO CLÍNICO

Ao final dos períodos estabelecidos de 7, 14 e 30 dias os animais foram eutanasiados por meio de dose total anestésica, sendo os espécimes removidos com auxílio de discos diamantados montados em baixa rotação sob abundante irrigação para serem mergulhadas imediatamente em formol a 10% tamponado (Merck) por 48 horas e lavadas em água corrente por 24 horas antes de serem imersas em EDTA a 10% para o processo de desmineralização, o qual se dava após período de 20 dias, com duas trocas semanais do desmineralizador.

4.2 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Macroscopicamente observou-se satisfatório processo de reparação e fechamento dos defeitos, especialmente quando da associação do biomaterial com o enxerto ósseo particulado, no período de 30 dias, conforme Figura 6.

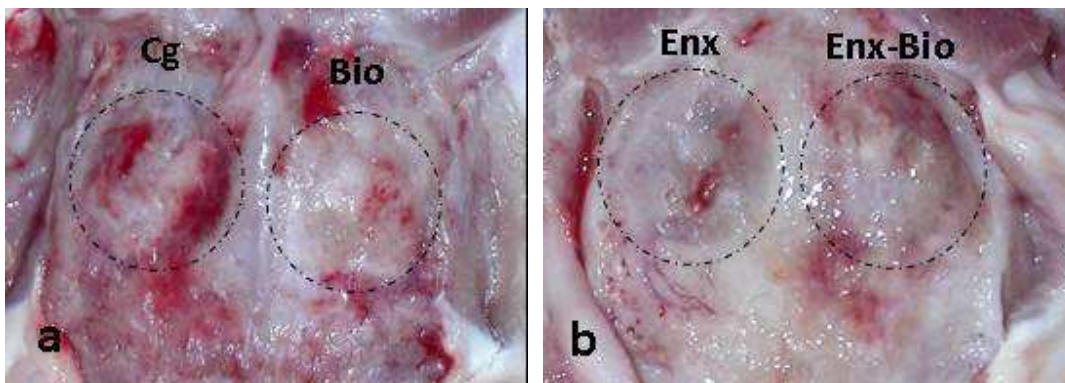


Figura 6 – Aspecto macroscópico dos defeitos preenchidos com coágulo (Cg) e biosilicato (Bio) em **a**, e enxerto (Enx) e enxerto com biosilicato (Enx-Bio) em **b**.

4.3 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA

Grupo 1) Controle – Aos 7 dias, observou-se defeito ósseo preenchido por tecido de granulação em meio a focos de coágulo. Periféricamente, visualizou-se discreta neoformação óssea a partir das paredes do defeito (Figura 7 a, b). Aos 14 dias, notou-se a presença de trabéculas ósseas neoformadas, curtas e arredondadas, em intensa atividade osteoblástica, em meio a tecido conjuntivo fibroso vascularizado (Figura 8 a, b). Após 30 dias, as trabéculas ósseas mostravam superfícies ora cobertas por células de revestimento, ora em atividade osteogênica. Em algumas regiões, notaram-se evidentes linhas de reversão, indicando processo de maturação (Figura 9 a-d).

Grupo 2) Enxerto – Após 7 dias, os defeitos apresentavam-se preenchidos por fragmento acelulares do enxerto ósseo autógeno em meio a tecido de granulação e focos de coágulo. Os fragmentos menores apresentavam-se em estado de reabsorção, induzindo atividade celular (Figura 10 a, b). Aos 14 dias, observou-se fragmentos ósseos não viáveis ora em reabsorção marcados por linhas de reversão, ora servindo como superfície condutora para crescimento de trabéculas ósseas primárias organizadas. Os espaços medulares mostraram-se definidos com presença de vasos sanguíneos (Figura 11 a, b). Aos 30 dias, os fragmentos de enxerto ósseo apresentavam-se incorporados ao tecido neoformado, agora em fase de maturação marcados por linhas de reversão. A medula óssea mostrou-se organizada (Figura 12 a-d).

Grupo 3) Biosilicato – Aos 7 dias, os defeitos preenchidos pelo biomaterial exibiam espaços irregulares correspondentes às partículas do biomaterial permeados por tecido de granulação. Eventualmente pode-se observar discretas áreas de matriz óssea depositada diretamente sobre a superfície do biomaterial (Figura 13 a, b). Após 14 dias, as partículas do biomaterial mostravam-se permeadas por tecido conjuntivo e discreta área osteogênica. Observaram-se numerosas células gigantes multinucleadas irregulares depositadas sobre a superfície do material. Periféricamente havia o englobamento

total de partículas por tecido ósseo viável (Figura 14 a-d). Após 30 dias, áreas de tecido ósseo em maturação era visualizado em contato com as partículas do biomaterial nas regiões mais centrais do defeito. Próximo a algumas partículas, notou-se intensa atividade celular, com células gigantes tipo corpo estranho irregulares e grandes, bem como células mononucleadas com citoplasma claro e vacuolado, sugerindo macrófagos. Estas células acabam ocupando toda a área onde se encontram as partículas, ficando isoladas em lobos delimitados por tecido conjuntivo fibroso (Figura 15 a-d).

Grupo 4) Enxerto e Biosilicato – No período de 7 dias, não observou-se sinais de atividade osteogênica em meio aos fragmentos do enxerto ósseo triturado e as partículas do biomaterial, somente a presença de tecido de granulação (Figura 16 a, b). Aos 14 dias, notaram-se trabéculas ósseas organizadas depositadas sobre os fragmentos do enxerto, além de tecido ósseo primário depositado de permeio às partículas do biomaterial, onde se observou intensa atividade osteoblástica. Reabsorção das partículas ósseas por osteoclastos e do biomaterial por células gigantes multinucleada foi visualizada (Figura 17 a-d). Após 30 dias, poucos fragmentos de enxerto ósseo não viável foram visualizados, incorporados às trabéculas maduras, em maturação. Partículas do biomaterial em meio ao tecido formado e tecido conjuntivo, em plena atividade de reabsorção, com intensa celularidade. As partículas se encontram muitas vezes pequenas, quase que totalmente reabsorvidas, como no grupo biosilicato também (Figura 18 a-d).

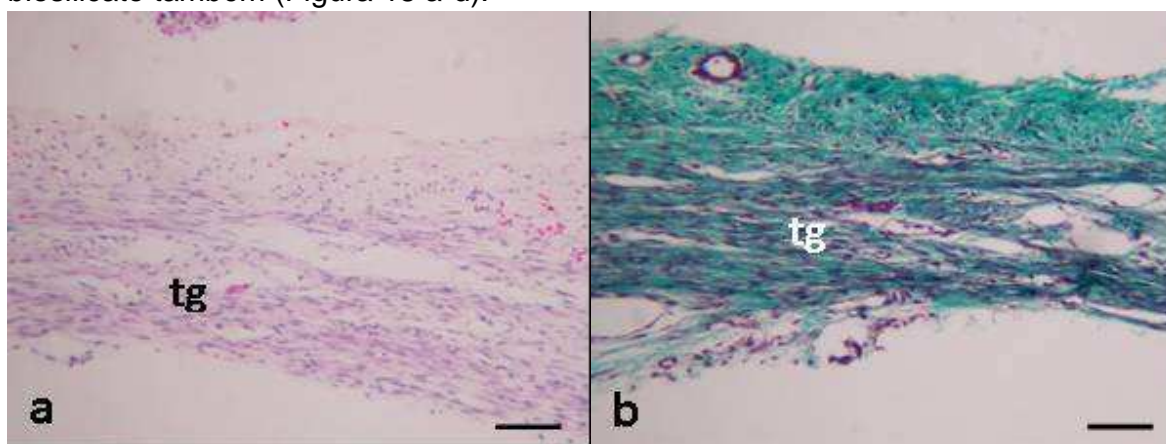


Figura 7 – Controle 7 dias – a, b) Tecido de granulação (tg) preenchendo o defeito ósseo (a – H.E.; b – Tricrômico de Goldner; barra = 200 µm).

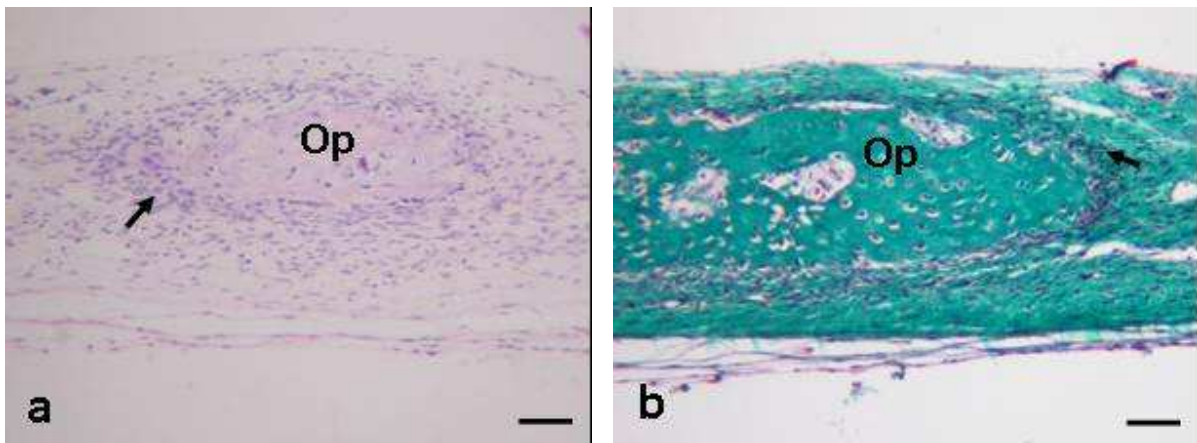


Figura 8 – Controle 14 dias – a, b) Focos de neoformação óssea (Op) em meio a intensa atividade osteogênica (setas) (a – H.E.; b – Tricrômico de Goldner; barra = 200 µm).

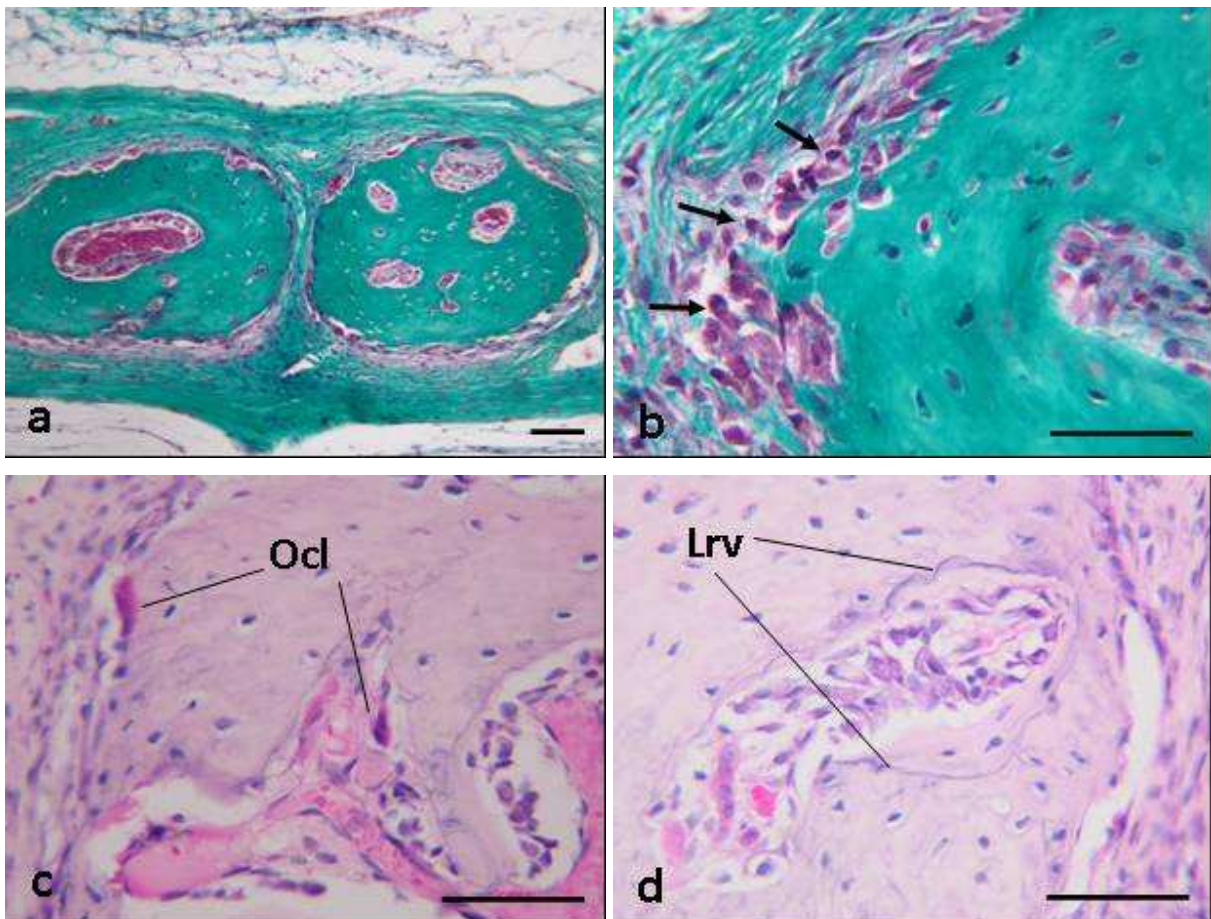


Figura 9 – Controle 30 dias – a, b) Trabéculas ósseas curtas e arredondadas apresentando focos de atividade osteogênica (setas); c, d) Linhas de reversão (Lrv) e presença de osteoclastos (Ocl) indicando atividade de maturação (a, b – Tricrômico de Goldner; c, d – H.E.; barra = 200 µm).

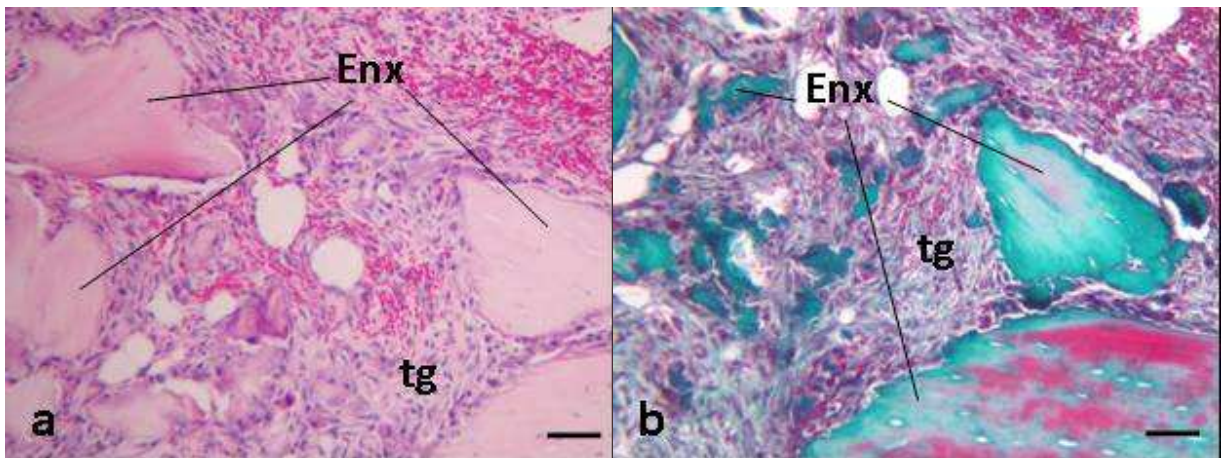


Figura 10 – Enxerto 7 dias – Observa-se tecido de granulação (tg) em meio aos fragmentos de enxerto ósseo não-viáveis (Enx) (a – H.E.; b – Tricrômico de Goldner; barra = 200 μ m).

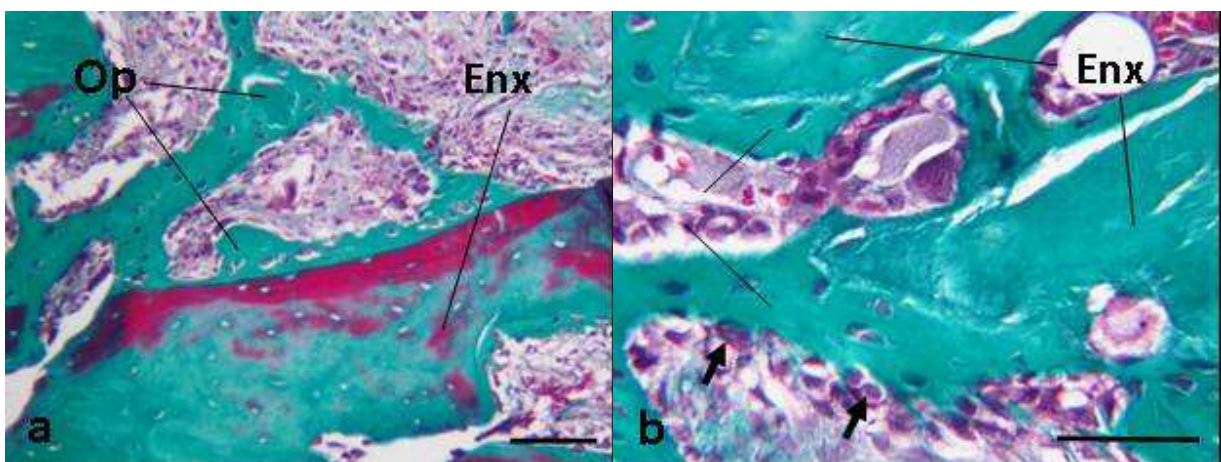


Figura 11 – Enxerto 14 dias – a, b) Tecido ósseo neoformado (Op) sendo depositado na superfície do enxerto ósseo (Enx); intensa atividade osteoblástica (setas) (a, b – Tricrômico de Goldner; barra = 200 μ m).

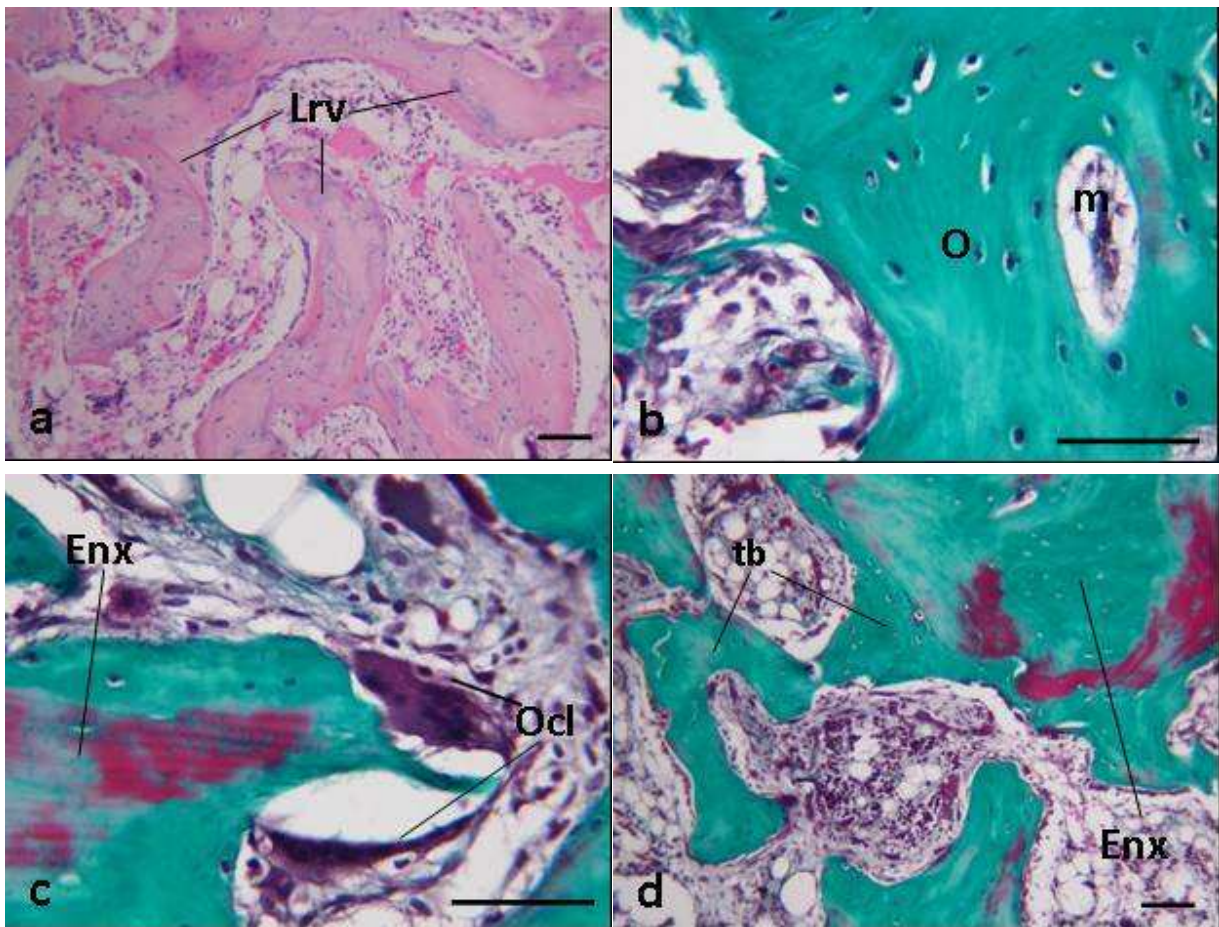


Figura 12 – Enxerto 30 dias – a) Trabéculas ósseas em maturação, marcadas por linhas basofílicas de reversão (Lrv); b) medula óssea (m) organizada em meio a tecido ósseo maduro (O); c) atividade osteoclástica (Ocl); d) maturação das trabéculas neoformadas (tb) por sobre fragmento de enxerto não-viável (Enx) (a, b – H.E.; c, d – Tricrômico de Goldner; barra = 200 μ m).

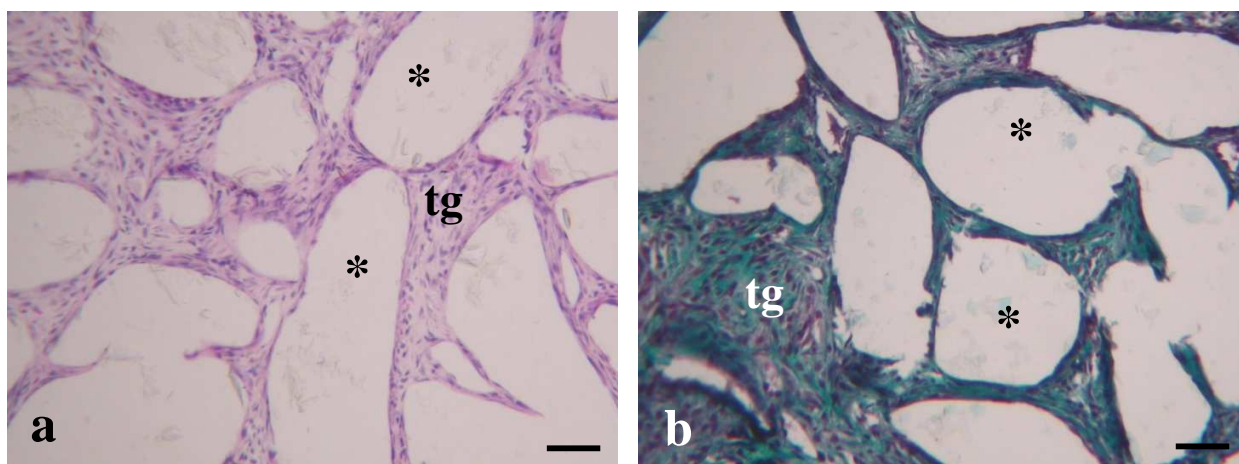


Figura 13 – Biosilicato 7 dias – a, b) Espaços irregulares correspondentes às partículas do biomaterial (*) em meio a tecido de granulação (tg) (a – H.E.; b – Tricrômico de Goldner; barra = 200 µm).

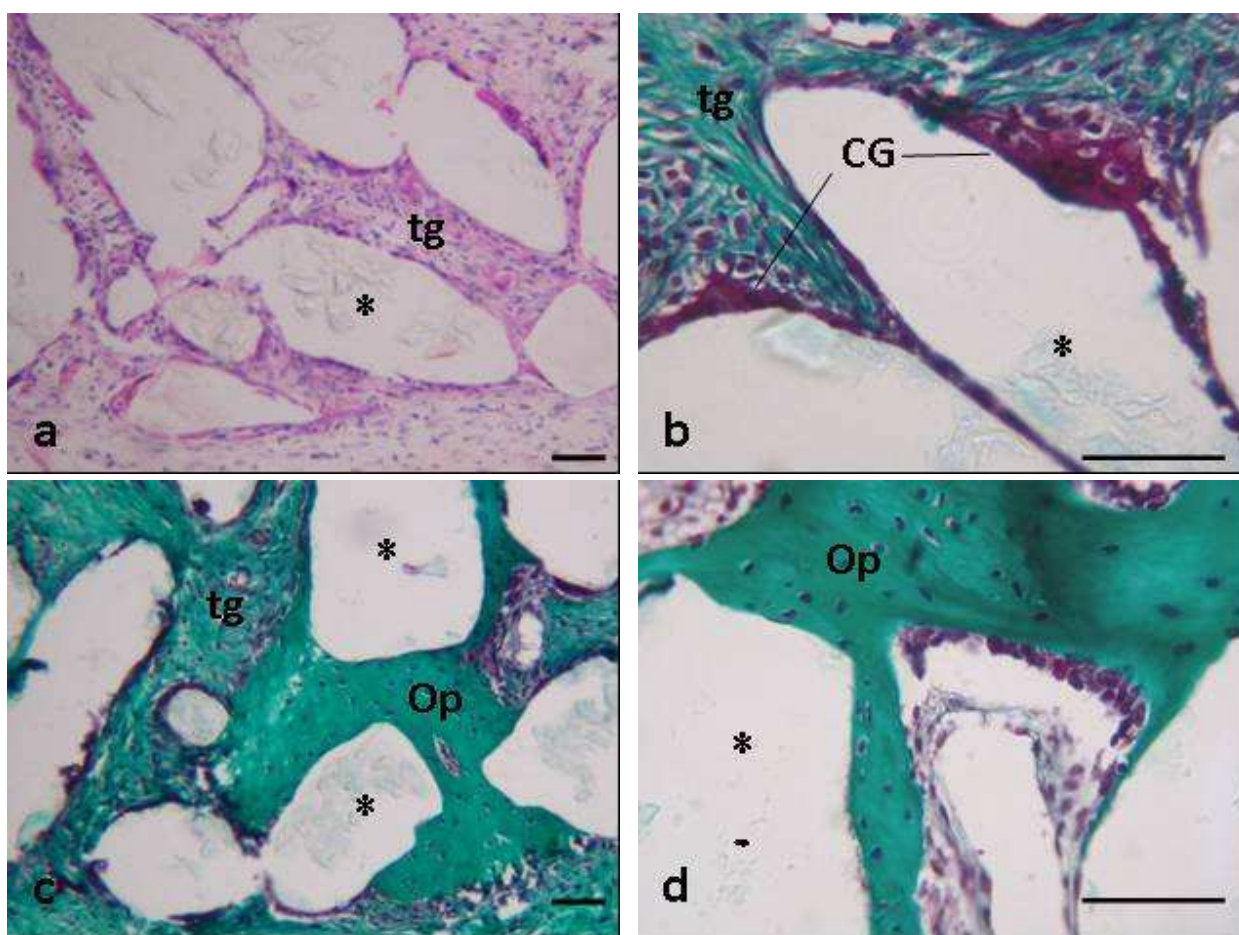


Figura 14 – Biosilicato 14 dias – Partículas do biosilicato (*) circundadas ora por tecido de granulação (tg), em a e b, ora por tecido ósseo neoformado (op) em justaposição à superfície do biomaterial, em c e d. Observam-se, ainda, células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho (CG) (a – H.E.; b, c, d – Tricrômico de Goldner; barra = 200 µm).

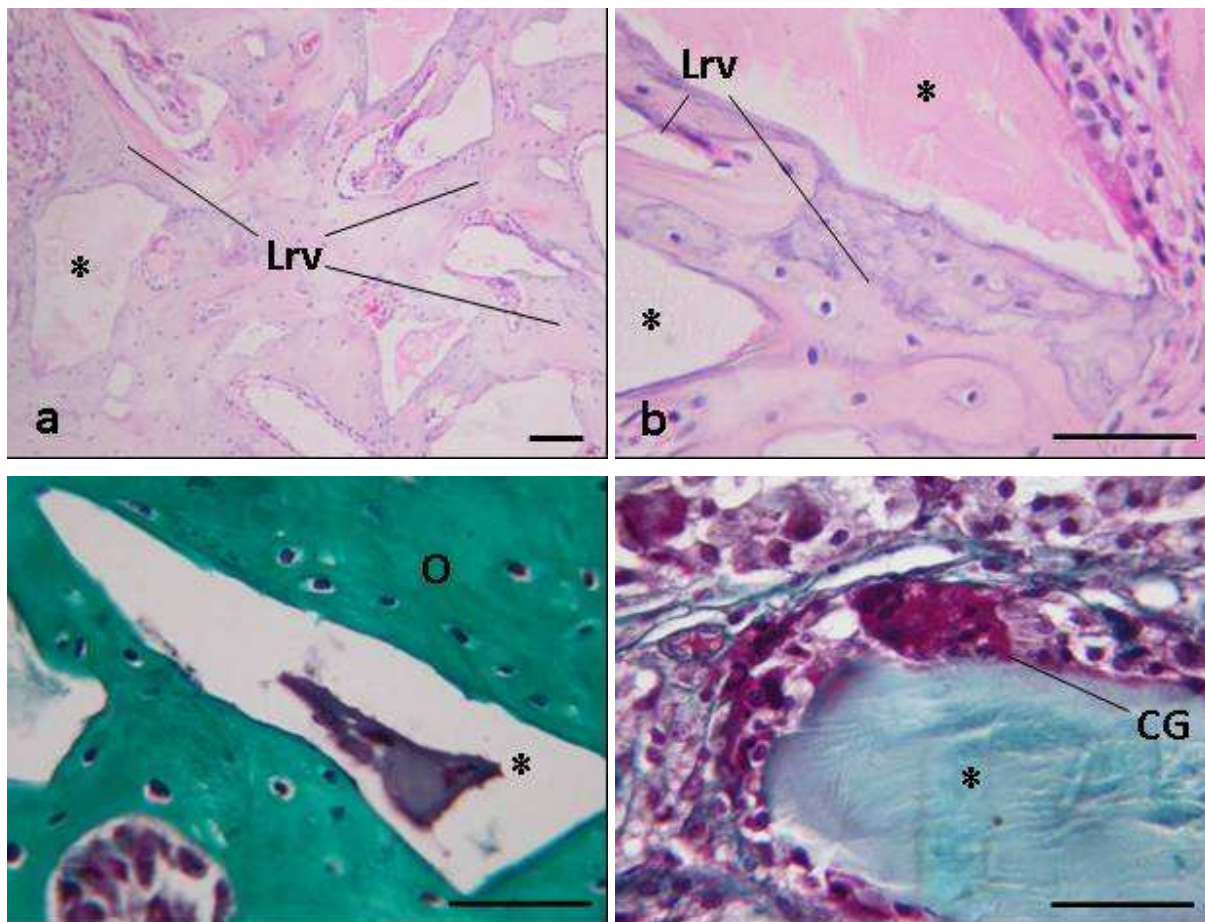


Figura 15 – Biosilicato 30 dias – a, b) Persistência das partículas do biomaterial (*) em meio a tecido ósseo em maturação, marcado por numerosas linhas basofílicas de reversão (Lrv); b) tecido ósseo (o) em justaposição às partículas do biomaterial (*); d) célula gigante multinucleada tipo corpo estranho (CG) sobre o biomaterial (a, b – H.E.; c, d – Tricrômico de Goldner; barra = 200 μ m).

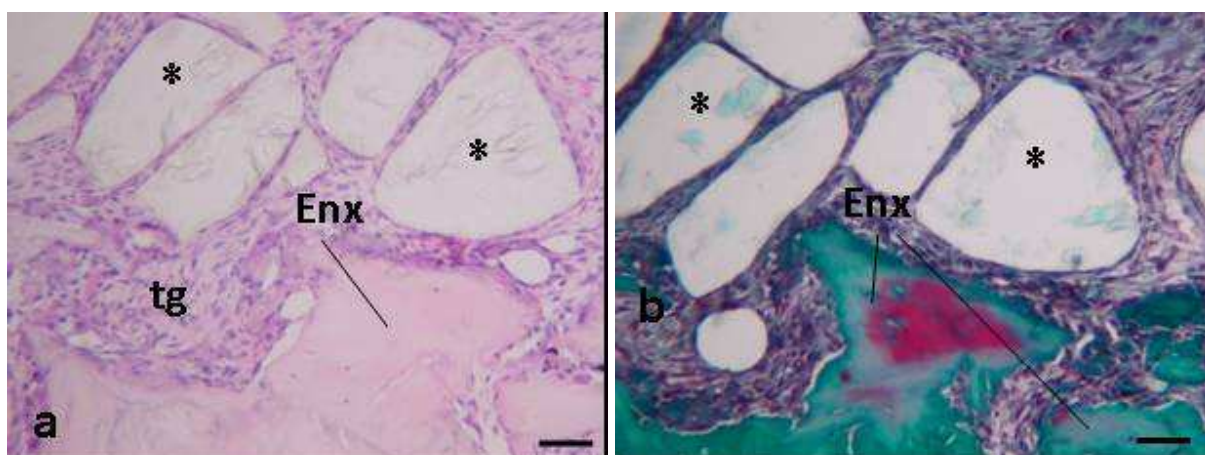


Figura 16 – Enxerto e Biosilicato 7 dias – a, b) Fragmentos de osso enxertado (Enx) e partículas do biomaterial (*) em meio a tecido de granulação (tg) (a – H.E.; b – Tricrômico de Goldner; barra = 200 μ m).

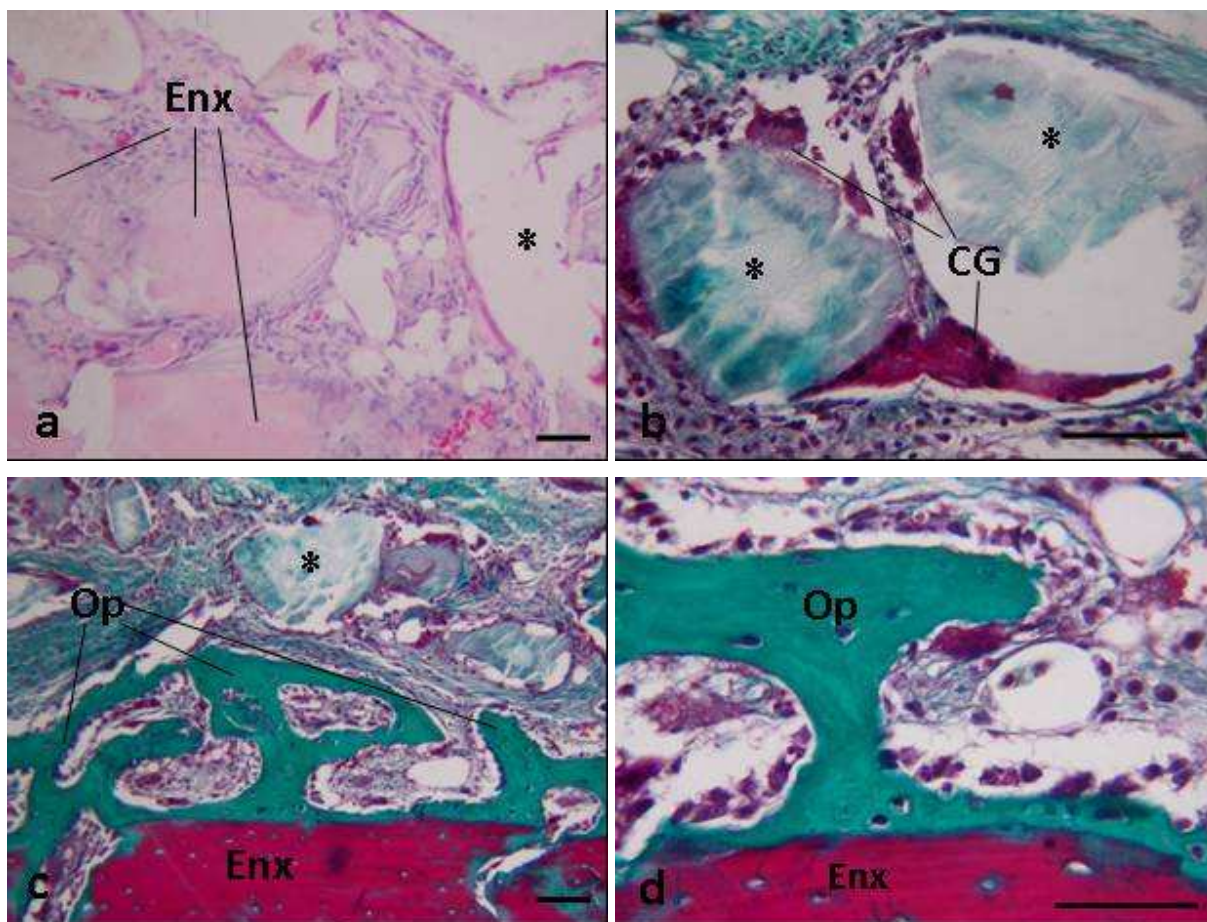


Figura 17 – Enxerto e Biosilicato 14 dias – a) Fragmentos do enxerto (Enx) sendo reabsorvidos; b) partículas do biomaterial (*) associados a células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho (CG); c, d) osso neoformado (Op) sendo depositado sobre a superfície do enxerto ósseo (Enx) (a – H.E.; b, c, d – Tricrômico de Goldner; barra = 200 μ m).

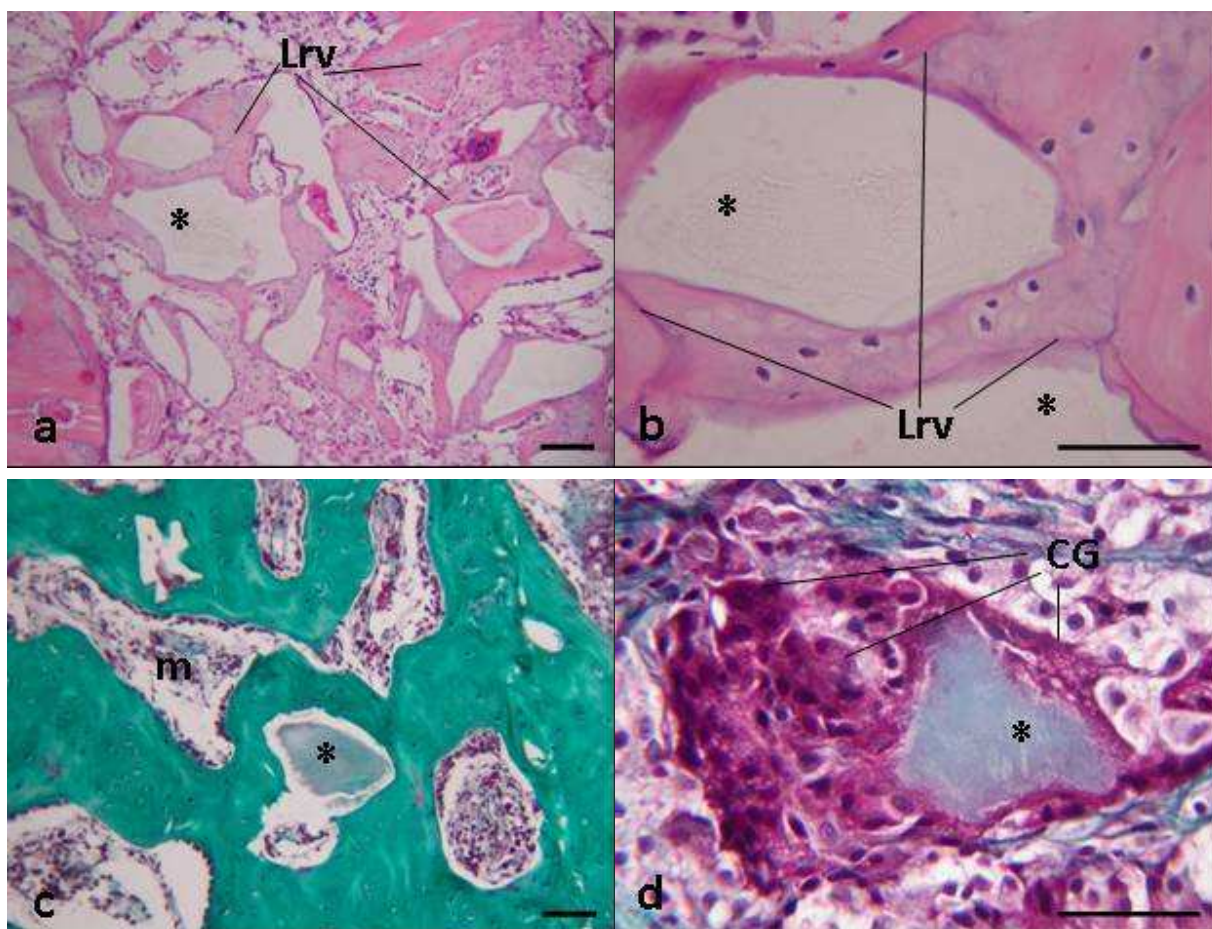


Figura 18 – Enxerto e Biosilicato 30 dias – a, b) Tecido ósseo em maturação em contato com a superfície do biomaterial (*) marcado por linhas de reversão (Lrv); c) medula óssea (m) organizada; d) partícula do biomaterial (*) sendo fagocitada por células multinucleadas tipo corpo estranho (CG) (a, b – H.E.; c, d – Tricrômico de Goldner; barra = 200 μ m).

4.4 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

A quantificação óssea da região dos defeitos realizada por meio de histomorfometria por pontos nos períodos de 7, 14 e 30, pode ser observada nas Tabelas 1, 2, 3 e 4.

Tabela 1 – Médias (%) de osso neoformado no Grupo Controle aos 7, 14 e 30 dias

Grupo Controle	Oosso neoformado (%)
7 dias	0
14 dias	2,95
30 dias	6,7

Tabela 2 – Médias (%) de osso neoformado e enxerto ósseo no Grupo Enxerto aos 7, 14 e 30 dias

Grupo Enxerto	Osso neoformado (%)	Enxerto ósseo (%)
7 dias	0	16,09
14 dias	10,25	15,32
30 dias	8,93	9,28

Tabela 3 – Médias (%) de osso neoformado e biomaterial no Grupo Biosilicato aos 7, 14 e 30 dias

Grupo Biosilicato	Osso neoformado (%)	Biosilicato (%)
7 dias	0	9,03
14 dias	5,64	17,18
30 dias	13,73	22,94

Tabela 4 – Médias (%) de osso neoformado, enxerto e biomaterial no Grupo Enxerto e Biosilicato aos 7, 14 e 30 dias

Grupo Biosilicato	Osso neoformado (%)	Enxerto (%)	Biosilicato (%)
7 dias	0	6,98	5,01
14 dias	7,99	15,27	24,82
30 dias	11,31	6,99	8,74

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise da quantidade de tecido ósseo neoformado utilizou-se somente os períodos de 14 e 30 dias. Realizou-se o teste de Levene para análise de variância, a qual foi homogênea. Assim, Os valores de cada grupo foram comparados entre si, pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) e para individualização o teste de Tukey e Dunet. O nível de probabilidade de erro foi fixado em 5% ($P < 0,05$). Os resultados são demonstrados nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 - Resultados estatísticos obtidos aos 14 dias pós-operatório

Osso neoformado	
Grupo Controle	2,95 ± 1,73 ^a
Grupo Enxerto	10,25 ± 4,42 ^b
Grupo Biosilicato	5,64 ± 4,18 ^a
Grupo Enxerto e Biosilicato	7,99 ± 2,71 ^a

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$).

Tabela 6 – Resultados estatísticos obtidos aos 30 dias pós-operatório

Osso neoformado	
Grupo Controle	6,70 ± 2,93 ^a
Grupo Enxerto	8,93 ± 9,61 ^a
Grupo Biosilicato	13,73 ± 5,46 ^a
Grupo Enxerto e Biosilicato	11,31 ± 13,88 ^a

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de novos biomateriais substitutos ósseos encontra incentivo pela necessidade de sua aplicação na consolidação de fraturas de difícil redução e defeitos ósseos importantes resultantes especialmente de traumas e seqüelas de patologias. Além disso, contribui com a possibilidade de se reabilitar rebordos edêntulos com implantes osseointegráveis por meio de reconstruções de áreas atróficas. Devido a estas necessidades, o presente estudo teve como objetivo avaliar o comportamento de um novo biomaterial na reparação de defeitos ósseos em coelhos.

Atualmente encontra-se no mercado uma variedade de biomateriais disponíveis para este fim. Dentre eles, destacam-se os vidros bioativos como o Bioglass® 45S5, por apresentarem elevado nível de bioatividade permitindo uma rápida ligação com os tecidos. Apesar disto, possuem baixas propriedades mecânicas, o que limita sua aplicabilidade clínica. O aumento da cristalinidade do material a fim de se elevar sua capacidade mecânica pode reduzir de modo relevante o seu nível de bioatividade (James, 1995). Na tentativa de solucionar esta propriedade, os pesquisadores Larry Hench (Departamento de Ciência dos Materiais - Universidade da Flórida – EUA), Edgar Dutra Zanotto e Oscar Peitl (Laboratório de Materiais Vítreos, LaMaV - Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR) desenvolveram uma vitrocerâmica totalmente cristalina denominada Biosilicato® (patente O2004/074199; Zanotto et al, 2004), melhorando suas propriedades mecânicas sem alterar o seu nível de bioatividade. Tais características vem sendo comprovadas na literatura.

Efeito superior do Biosilicato® na atividade de células osteoblásticas e na síntese de matriz óssea foram observados por Moura et al. (2007) em estudo *in vitro* quando comparado ao 45S5®.

Estudos *in vivo* como o de Granito e colaboradores (2009) corroboram com os resultados dos estudos *in vitro*, mostrando resultados satisfatórios na reparação de defeitos ósseos criados em tíbias de ratos, exibindo melhor reorganização tecidual, volume ósseo e número de células osteoblásticas. Além disso, nos testes

mecânicos observaram-se propriedades mecânicas das áreas reparadas com o biomaterial semelhantes ao tecido ósseo normal. A mesma capacidade mecânica foi constatada por Tim (2011) quando da utilização do Biosilicato[®] na forma de *scaffolds* no mesmo modelo animal.

O presente estudo utilizou um modelo experimental diferente dos demais realizados até o momento, uma vez que em coelhos há a possibilidade de se realizar defeitos ósseos de maiores extensões, pretendendo-se simular a recuperação óssea de regiões de cavidade utilizando-se o biomaterial na forma particulada. Resultados favoráveis neste sentido já foram exibidos por Roriz et al. (2010) quando compararam o Biosilicato[®] com o Biogran[®] para preenchimento de alvéolos de cães, a fim de instalarem implantes osseointegráveis na região após 12 semanas de reparação. Após 8 semanas da instalação dos implantes, observou-se resultado semelhante entre os dois materiais, sugerindo-se que sua utilização pode ser indicada para este fim. No entanto, a presença do enxerto ósseo autógeno associado ao biomaterial ainda não havia sido investigada, reproduzindo uma prática usual na clínica cirúrgica.

Os resultados morfológicos microscópicos revelaram processo de reparação óssea satisfatório, sem alterações em sua morfologia ou cronologia pela presença do biomaterial. Características bastante semelhantes foram observadas quando comparando com o comportamento de outros biomateriais de relevante utilização, como a hidroxiapatita bovina (Bio-Oss[®], Geistlich) e o β -tricálcio fosfato (Cerasorb[®], Curasan), conforme demonstrado por Souza Nunes et al. (2009) em levantamento de seios maxilares de coelhos, com relação à neoformação óssea diretamente sobre as partículas do biomaterial e reação tipo corpo estranho com células gigantes multinucleadas na superfície do biomaterial. No entanto, tal reação não foi observada por Azenha e colaboradores (2009) quando utilizou o Biosilicato[®] na forma de *scaffold* em fêmures de ratos, após 8 e 12 semanas da implantação. Certamente, a morfologia do biomaterial interfere no tipo de resposta biológica a ser organizada frente à degradação do mesmo.

No período de 30 dias, adjacente às partículas do biomaterial, pode-se observar ora uma grande concentração de células macrófágicas, por vezes

formando células gigantes multinucleadas, ora tecido ósseo em maturação. Neste período, muitos grânulos já se mostravam em degradação; porém, nenhuma interferência na qualidade da formação e maturação óssea foi observada, sendo que o reparo ósseo seguiu seu curso dentro dos padrões de normalidade.

Apesar de amplos, os defeitos realizados em calvária de coelhos apresentam profundidade limitada o que dificultou a permanência do biomaterial, especialmente na forma particulada, durante o procedimento de remoção dos espécimes. Além disso, por não ter sido utilizada nenhuma barreira mecânica, como as membranas, partículas do biomaterial podem ser perdidas durante o processamento histotécnico dos espécimes. Isto explica a pouca quantidade de biomaterial quando da morfometria do mesmo no Grupo Enxerto e Biosilicato no período de 7 dias. Por este motivo, aventa-se a possibilidade de excluir esta informação na publicação do trabalho, iniciando-se a morfometria aos 14 dias, conforme foi utilizado para o tratamento estatístico para avaliação do osso neoformado, uma vez que o mesmo ainda não estava presente de maneira importante no período inicial de 7 dias.

Resultados interessantes puderam ser observados a partir do tratamento estatístico da histomorfometria. Aos 14 dias, houve aumento significativo na neoformação óssea somente no Grupo Enxerto, o que se justifica pela capacidade osteocondutora e osteoindutora do tecido ósseo autógeno. No entanto, deve-se atentar para a ausência de diferença entre os demais grupos, mesmo considerando-se que nos defeitos dos Grupos Biosilicato e Enxerto e Biosilicato havia ainda a presença do biomaterial, que poderia ser um empecilho físico ao crescimento ósseo. Aos 30 dias os resultados mostram-se ainda mais relevantes, pela ausência de diferença estatística entre os grupos. No Grupo Controle, apesar de visualmente ter-se a impressão de uma menor quantidade óssea em comparação ao Grupo Enxerto, este último apresentava trabéculas ósseas mais bem constituídas e maduras, com espaços medulares amplos e definidos, enquanto que o Grupo Controle exibia trabéculas mais imaturas permeadas por tecido conjuntivo fibroso. O Grupo Biosilicato e o Grupo Enxerto e Biosilicato exibiram quantidade de tecido ósseo neoformado compatível com os demais,

sugerindo que o biomaterial possa apresentar um nível de degradação que acompanha a formação óssea, igualando-se neste quesito às áreas sem o biomaterial.

Isto poderia representar uma desvantagem ao uso do mesmo; porém, sabe-se que uma das principais funções da utilização do biomaterial em cavidades ósseas é a de propiciar um arcabouço a fim de não se perder a anatomia local. A histomorfometria foi realizada nas áreas mais centrais do defeito, em aumentos que fossem compatíveis com a delimitação dos campos em todos os grupos. Deste modo, não foi possível observar por meio da microscopia a condição arquitetural dos defeitos, os quais se mostravam mais íntegros na presença do biomaterial e enxerto ósseo. No entanto, o aspecto macroscópico das áreas de defeitos preenchidas com Biosilicato[®] com ou sem o osso autógeno foi bastante satisfatório, apresentando um tecido mineralizado bem adaptado, dificultando a distinção do limite entre as bordas do defeito e o osso nativo.

6. CONCLUSÕES

O Biosilicato[®] na forma granulada mostrou comportamento satisfatório durante o processo de reparo de defeitos ósseos em calotas de coelhos, permitindo neoformação óssea diretamente sobre suas superfícies quando utilizado isoladamente ou associado com enxerto ósseo autógeno. A associação com enxerto ósseo autógeno não foi significativa para o aumento da neoformação óssea.

REFERÊNCIAS

AZENHA, M.R.; PEITL, O.; BARROS, V.M. Bone response to biosilicates with different crystal phases. **Braz. Dent. J.** 2010;21(5):383-9.

BLOCK, M.S.; KENT, J.N. Sinus augmentation for dental implants: the use of autogenous bone. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 55, p.1281–1286, 1997.

CRESPI, R.; VINCI, R.; CAPPARÈ, P.; GHERLONE, E.; ROMANOS, G.E. Calvarial versus iliac crest for autologous bone graft material for a sinus lift procedure: a histomorphometric study. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 22, p.527-32, 2007.

De SOUZA NUNES, L.S.; De OLIVEIRA, R.V. HOLGADO, L.A.; NARY FILHO, H.; RIBEIRO, D.A.; MATSUMOTO, M.A. Immunoexpression of Cbfa-1/Runx2 and VEGF in sinus lift procedures using bone substitutes in rabbits. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 21, p. 584-90, 2010.

GERRESSEN, M.; HERMANN-SACHWEH, B.; RIEDIGER, D.; HILGERS, R.D.; SPIEKERMANN, H.; GHASSEMI, A. Purely cancellous vs. corticocancellous bone in sinus floor augmentation with autogenous iliac crest: a prospective clinical trial. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 20, p.109-15,2009.

GRANITO, R. N.; RIBEIRO DA, RENNÓ AC, RAVAGNANI C, BOSSINI PS, PEITL-FILHO O, ZANOTTO ED, PARIZOTTO NA, OISHI J. Effects of biosilicate and bioglass 45S5 on tibial bone consolidation on rats: a biomechanical and a histological study. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, 2009 (aceito para publicação).

HADJIARGYROU, M.; McLEOD, K.; RYABY, J.P.; RUBIN, C. Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 355 (Suppl):S216-29, 1998.

HENCH, L.L.; POLAK, J.M. Third-generation biomedical materials. **Science**, v.8, p.1014-7, 2002.

HSIONG, S. X. & MOONEY, D.J. Regeneration of vascularized bone. **Periodontol.**, v.41, p.2322-2329, 2006.

JAMES, P.F. Glass ceramics: new compositions and uses. **J. Non-Cryst. Solids**, v.181, p. 1-15, 1995.

MELO, A. Análise quantitativa da densidade de área ocupada por osso. In: **Estudo da reparação do alvéolo dental de ratos Wistar preenchido com osso autógeno particulados pós exodontia**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.

MOURA NETO, J.; TEIXEIRA, L.N.; RAVAGNANI, C.; PEITL FILHO, O.; ZANOTTO, E.D.; BELOTI, M.M.; PANZERI, H.; ROSA, A.L.; OLIVEIRA, P.T. *In vitro* osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate®). **J. Biomed. Mater. Res. Part A**, v.82, p. 545-57, 2007.

PALMER, W.; CRAWFORD-SYKES, A.; ROSE, R. E. Donor site morbidity following iliac crest bone graft. **West Indian Med. J.**, v.57, p. 490-2, 2008.

RAGHOEBAR, G. M.; MEIJNDERT, L.; KALK, W. W.; VISSINK, A. Morbidity of mandibular bone harvesting: a comparative study. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v. 22, p.359-65, 2007.

RAVAGNANI, C. **Biosilicato para promoção da saúde oral**. 2003. 161 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2003.

RORIZ, V.M.; ROSA, A.L.; PEITL, O.; ZANOTTO, E.D.; PANZERI, H.; de OLIVEIRA, P.T. Efficacy of a bioactive glass-ceramic (Biosilicate) in the maintenance of alveolar ridges and in osseointegration of titanium implants. **Clin. Oral Implants Res.**, v.21, p.148-55, 2010.

SBORDONE, L.; TOTI, P.; MENCHINI-FABRIS, G.; SBORDONE, C.; GUIDETTI, F. Implant success in sinus-lifted maxillae and native bone: a 3-year clinical and computerized tomographic follow-up. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v.24, p.316-24, 2009.

TIM, C.R. **Efeitos do laser de baixa intensidade e do scaffold de Biosilicato® no processo de reparação óssea**. Dissertação de Mestrado. Prografa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR. São Carlos, 2011.

ZANOTTO E. D. et al. FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS; UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **Process and compositions for preparing particulate, bioactive or resorbable biosilicates for use in the treatment of oral ailments**. Int. C. C03C10/00, 20 Feb. 2004, WO2004/074199.

ANEXOS**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**
Protocolo n.º 110/09**Título do Projeto:**

ESTUDO DA REGENERAÇÃO ÓSSEA EM DEFEITOS ÓSSEOS REALIZADOS EM CALVÁRIA DE COELHOS UTILIZANDO VITROCERÂMICA BIOATIVA BIOSILICATO

Pesquisador (a) Responsável: MARIZA AKEMI MATSUMOTO

Comitê de Ética:

O CEP analisou, baseado em parecer competente, o presente projeto e o considerou aprovado.

Data: 25/06/2009

Assinatura do Presidente:



Prof. Dr. Marcos da Cunha Lopes Virmond