

ARTHUR AZAMBUJA SANTOS

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA BIOCOMPATIBILIDADE E CAPACIDADE
OSTEOINDUTORA DO NITRATO DE GÁLIO COMBINADO AO SULFATO DE
CÁLCIO**

CAMPO GRANDE
2012

ARTHUR AZAMBUJA SANTOS

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA BIOCAMPATIBILIDADE E CAPACIDADE
OSTEOINDUTORA DO NITRATO DE GÁLIO COMBINADO AO SULFATO DE
CÁLCIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Tecnologia e Saúde

Orientador: Prof. Dr. Danilo M. Zanello Guerisoli

CAMPO GRANDE
2012

FOLHA DE APROVAÇÃO

ARTHUR AZAMBUJA SANTOS

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA BIOCOMPATIBILIDADE E CAPACIDADE
OSTEOINDUTORA DO NITRATO DE GÁLIO COMBINADO AO SULFATO DE
CÁLCIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Mestre.

Resultado _____

Campo Grande (MS), 21 de dezembro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Danilo Mathias Zanello Guerisoli

Instituição: UFMS

Prof. Dr. Petr Melnikov

Instituição: UFMS

Dra. Raffaella Di Iorio Jeronymo Ferreira

Primeiro Tenente Dentista da Base Aérea de Campo Grande

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho de dissertação de mestrado a minha filha Isabelle Leite Azambuja Santos, a razão da minha existência, que me motiva todos os dias a lutar por uma vida melhor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe por toda a paciência que teve comigo nesses últimos dias.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, professores e funcionários.

Meus irmãos que mesmo longe, sempre me apoiaram.

Meu orientador Danilo Mathias Zanello Guerisoli pelos conhecimentos, tempo e disponibilidade prestadas nesse trabalho.

À Prof.^a Ms. Daniela Moraes Antunes pela análise histológica e pela ajuda prestada nesse trabalho.

Ao professor Dr. Petr Melnikov, por nos fornecer o nitrato de gálio para a pesquisa e nos guiar neste trabalho.

Meus verdadeiros amigos por toda a conversa e pelo apoio.

Muito obrigado a todos!

Existem apenas duas maneiras de ver a vida. Uma é pensar que não existem milagres e a outra é que tudo é um milagre”.

Albert Einstein

RESUMO

Azambuja-Santos A. **Avaliação *in vivo* da biocompatibilidade e capacidade osteoindutora do nitrato de gálio combinado ao sulfato de cálcio.** Campo Grande; 2012. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Atualmente o sulfato de cálcio apresenta-se como um biomaterial opcional para os procedimentos de preenchimento de cavidades ósseas patológicas e de alvéolos dentários após exodontias em reabilitações orais com implantes dentários, visto que apresenta muitos estudos na literatura, pode ser obtido em grande quantidade e possui uma longa história como material auxiliar no processo de regeneração óssea. Porém, como não apresenta propriedades osteoindutoras nem osteogênicas, suas aplicações clínicas são limitadas, sendo associado ao osso autógeno em grande parte dos casos. Neste contexto, os compostos à base de gálio têm reconhecida capacidade osteoindutora, sendo utilizados pela Medicina há alguns anos. Este trabalho estudou *in vivo* o nitrato de gálio combinado ao sulfato de cálcio, com o intuito de analisar histologicamente o comportamento desses biomateriais. Para tanto, foram utilizados 12 ratos adultos jovens da linhagem Wistar, onde se realizou dois defeitos experimentais na calvária de cada animal, sendo um lado o controle, preenchido apenas com coágulo sanguíneo e o outro lado o experimental, onde no grupo I foi preenchido com sulfato de cálcio e no grupo II com sulfato de cálcio associado ao nitrato de gálio a 1% em peso. Após trinta dias os animais foram sacrificados e as peças submetidas à análise histomorfométrica e ao MEV. Os resultados demonstraram indícios de ação sistêmica do nitrato de gálio em uso local, contudo mais estudos devem ser realizados para melhor demonstrar o efeito anti-reabsortivo e osteoindutor desse biomaterial.

Palavras-chave: osteoindução, nitrato de gálio, sulfato de cálcio.

ABSTRACT

Azambuja-Santos A. **Evaluation *in vivo* of biocompatibility and osteogenesis capacity of gallium nitrate combined with calcium sulfate.** Campo Grande; 2012. [Dissertation - Federal University of Mato Grosso do Sul].

Calcium sulfate currently presents itself as a biomaterial optional to fill procedures of pathological bone cavities and dental alveoli after tooth extractions in oral rehabilitation with dental implants, as it presents many studies in the literature, can be obtained in large quantities and has a long history as auxiliary material in the process of bone regeneration. However, as no osseous inducers or osteogenic properties, their clinical applications are limited, being associated with autogenic bone in most cases. In this context, the gallium based compounds have recognized osteoinductive capacity, being used by Medicine a few years ago. This work studied *in vivo* gallium nitrate combined with calcium sulfate, to analyze the behavior of these histologically biomaterials. Therefore, were used 12 young adult rats of Wistar strain, which was detected two defects during the experiments in the skull of each animal, being in one hand the control, filled only with blood clot and the otherside the experimental group I, which was filled with calcium sulfate and group II with calcium sulfate associated with gallium nitrate 1% by weight. After thirty days the animals were sacrificed and specimens underwent histomorphometric analysis and SEM. The results showed evidence of systemic action of gallium nitrate in local use, however more studies must be done to demonstrate the effect antiresorptive and osteoinductive this biomaterial.

Keywords: osteoinduction, gallium nitrate, calcium sulfate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estante ventilada com fotoperíodo de 12 horas ao dia.

Figura 2- Anestesia intraperitoneal com cloridrato de ketamina associada com cloridrato de xilazina.

Figura 3- A: Mesa cirúrgica. B: Incisão sagital na linha média craniana e descolamento pericraniano para exposição do sítio cirúrgico.

Figura 4- A: Materiais necessários para experimentação. B: micropipeta monocanal de volume variável (estrela) e medidor de cimento odontológico (seta).

Figura 5- Defeitos experimentais na calvária dos animais, preenchido com material experimental (seta branca) e com coágulo sanguíneo (seta preta).

Figura 6- A: Fio de sutura de nylon monofilamentar 5.0 B: Sutura na incisão sagital com pontos simples e interrompidos com fio de nylon 5.0.

Figura 7- A e B: Animais acondicionados em gaiolas individuais e acomodados em estante ventilada para observação pós-operatória.

Figura 8- A: Remoção da calvária dos animais para análise microscópica após 30 dias do procedimento operatório. B: Peças acondicionadas em formol a 10%.

Figura 9 – A e B: Metalização dos espécimes para análise ao microscópio eletrônico de varredura.

Figura 10- Peças metalizadas e montadas para observação em microscopia eletrônica de varredura.

Figura 11 - Análise ao microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM-6380LV, Tóquio, Japão da UFMS).

Figura 92- Lâmina histológica do grupo II em aumento de 100x. Linha em negrito demarcando a divisão entre osso antigo (O) e osso neoformado (ON).

Figura 13- Lâmina histológica do defeito tratado do grupo II com aumento de 400x, onde se pode notar as diferenças entre o osso maduro (O) e o osso neoformado (ON), onde a demarcação esta sinalizada (seta).

Figura 14- Lâmina histológica do defeito controle do grupo I com aumento de 400x, onde pode-se notar a presença das linhas basofílicas cimentantes (setas).

Figura 15- Lâmina histológica do grupo 1 com aumento de 25x, observe toda a espessura da calvária, local que foi incluído para análise histomorfométrica (setas).

Figura 16 - Área média de neoformação óssea dos defeitos controle e experimental com e sem a utilização de nitrato de gálio.

Figura 17- Lâmina histológica do defeito controle do grupo I em aumento de 100x mostrando osso neoformado restrito as margens cirúrgicas, separação entre osso antigo e osso novo (seta).

Figura 18- Lâmina histológica do defeito experimental do grupo I em aumento de 400x mostrando tecido de reparação (TR), osteoclastos (asterisco), linha basofílica cimentante (seta), osso antigo (O) e osso neoformado (ON).

Figura 19- Lâmina histológica do defeito tratado do grupo I em aumento de 100x mostrando periosteio (P), tecido de reparação (TR), osso antigo (O), osso neoformado (ON), dura-máter (DM).

Figura 20- Lâmina histológica do defeito tratado do grupo II mostrando o completo fechamento da loja cirúrgica.

Figura 21- Grupo I observe que enquanto do defeito experimental foi totalmente fechado, o defeito do defeito controle apresentava-se aberto (setas). Aumento original de 15x.

Figura 22- Defeito controle do grupo I, observa-se que o defeito de 2 mm, não apresentava-se cicatrizado. Aumento original de 37x.

Figura 23- Defeito controle do grupo I. Observe a interface entre osso antigo e osso neoformado (seta) e a presença de fibras colágenas (estrela). Aumento original de 150x.

Figura 24- Defeito controle do Grupo I. Observa-se grande quantidade de fibras colágenas participando do processo de reparo ósseo no interior da loja cirúrgica (seta). Aumento original de 1300x.

Figura 25- Defeito experimental do grupo I. Observe que o defeito já havia sido totalmente fechado após 30 dias. Aumento original de 37x.

Figura 26- Defeito experimental do grupo I, defeito fechado após 30 dias. Aumento original de 1300x.

Figura 27- Defeito experimental do grupo I, notar a presença de grânulos de sulfato de cálcio ainda não reabsorvidos (seta), e grande presença de fibras colágenas (estrela). Aumento original de 5000x.

Figura 28- Defeito controle do grupo II apresentando-se quase totalmente fechado após 30 dias do procedimento cirúrgico. Aumento original de 37x.

Figura 29- Defeito controle do grupo II observe a presença de fibras colágenas e células (seta). Aumento original de 1000x.

Figura 30- Defeito experimental do grupo II, defeito havia sido parcialmente fechado após 30 dias do procedimento operatório. Aumento original de 37x.

Figura 31- Defeito experimental do grupo II, região onde foi constatada a presença de neoformação óssea. Aumento original de 1000x.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMP	proteínas morfogenéticas do osso
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	cristais de hidroxiapatita
CO_2	gás carbônico
e-PTFE	politetrafluoretileno expandido
HA	hidroxiapatita
I.M	intramuscular
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MVD	densidade de microvasos
PVPI.....	polivinilpirrolidona iodo
SC	sulfato de cálcio
VB	vidro bioativo

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
mm	milímetro
ml	mililitro
μm	micrômetro
μm^2	micrômetro quadrado
g	grama
cm	centímetro
s	segundo
pH	potencial hidrogeniônico
°	grau
h	hora
°C	grau Celsius
$\mu\text{g/ml}$	micrograma por mililitro
mg/kg	miligrama por quilograma
mg/m^2	miligrama por metro quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 O tecido ósseo	16
2.2 Princípios biológicos de neoformação óssea	16
2.2.1 Osteogênese	18
2.2.2 Osteoindução	19
2.2.3 Osteocondução	19
2.3 Classificação dos enxertos	20
2.3.1 Enxertos autógenos	20
2.3.2 Enxertos alógenos	20
2.3.3 Enxertos xenógenos	21
2.3.4 Enxertos aloplásticos	21
2.4 Biomaterias para substituição e regeneração óssea	22
2.5 Sulfato de cálcio	29
2.6 Nitrato de gálio	33
2.7 Modelos experimentais	36
3 OBJETIVO	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
5 RESULTADOS	47
6 DISCUSSÃO	61
7 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS	67
ANEXO	74

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, existe uma procura constante por um material capaz de substituir o osso humano e eliminar a necessidade de áreas doadoras ósseas para enxerto intra e extrabucais. As pesquisas nessa área são direcionadas para a busca de um biomaterial que possua as propriedades de induzir a diferenciação osteoblástica e favorecer a liberação e a ativação dos fatores de crescimento, porém ainda inexistem relatos de um substituto ósseo ideal (MAGINI, 2006).

O osso bovino liofilizado apresenta-se atualmente como uma alternativa para o preenchimento de cavidades ósseas patológicas e levantamento de seio maxilar, visto que podem ser obtidos em grandes quantidades, evitando cirurgias de coleta de osso autógeno, diminuindo assim o tempo e a morbidade cirúrgica. Porém, diferentemente do osso autógeno, o osso bovino liofilizado não apresenta propriedades osteoindutoras e não é osteogênico, sendo utilizado na grande maioria das vezes associado ao osso autógeno particulado, apresentando aplicações clínicas limitadas (CHIAPASCO, 2008).

O sulfato de cálcio, durante mais de cem anos, tem se distinguido de outros biomateriais por ser um dos materiais aloplásticos mais simples, possuindo uma longa história como material sintético. Entre as suas principais propriedades, destacam-se a sua fácil obtenção, capacidade de osteocondução, sua total absorção, não causa inflamação ou reações antigênicas, fácil modelação e resistência à compressão semelhante ao tecido ósseo (LÓPEZ & ALARCON, 2011).

Os compostos à base de gálio têm reconhecida capacidade osteoindutora, sendo utilizados pela Medicina há alguns anos. O nitrato de gálio é utilizado no tratamento de doenças que apresentam reabsorções ósseas, como a síndrome de Paget (BOCKMAN *et al.*, 1990). Pequenas doses do nitrato de gálio constituem um método seguro e extremamente efetivo em reduzir perdas ósseas aceleradas em pacientes com câncer e distúrbios no metabolismo ósseo (WARREL, 1995). Além da inibição de reabsorções ósseas pela sua ação nos osteoclastos, o nitrato de gálio também age estimulando osteoblastos, favorecendo a neoformação óssea (BOCKMAN *et al.*, 1995). Esta propriedade osteoindutora juntamente com a propriedade osteocondutora do sulfato de cálcio, revela-se muito interessante no tratamento de lesões ósseas patológicas e para reabilitações orais com implantes

osteointegrados, pois poderia estimular o reparo tecidual e favorecer a cicatrização local evitando assim cirurgias para o sítio doador.

Tendo em vista o enorme potencial que estes compostos apresentam quando aplicados à odontologia, além da carência de estudos sobre os mesmos nesta área do conhecimento humano, torna-se premente a realização de pesquisas focando a aplicação *in vivo* dos mesmos.

Deste modo, devido às características interessantes e promissoras, o gálio merece ser avaliado do ponto de vista experimental, como um agente antiabsortivo e osteoindutor, tendo como veículo de aplicação o sulfato de cálcio, para reabilitações ósseas nas áreas de cirurgia buco-maxilo-facial, traumatologia, patologia óssea e implantodontia.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O Tecido ósseo

O tecido ósseo serve de suporte para os tecidos mucosos e protege órgãos vitais, como os contidos nas caixas craniana e torácica e no canal medular. Aloja e protege a medula óssea, formadora das células sanguíneas. Proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis, e constitui um sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular. Suas células específicas são os osteoblastos que possuem alta atividade metabólica com a função de secretar a matriz óssea, os osteócitos que estão presos em lacunas e secretam substâncias para a manutenção óssea e os osteoclastos que estão relacionados a remodelação e reabsorção óssea. A superfície interna e externa do tecido ósseo é recoberta por células osteogênicas e tecido conjuntivo, que constituem o endóstio e o perióstio, respectivamente. Estes tecidos têm a função de nutrir o tecido ósseo e fornecer osteoblastos para o crescimento e reparação do osso (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

O componente orgânico da matriz, produzido pelos osteoblastos, é predominantemente constituído por colágeno tipo I (85%), com pequenas quantidades de colágeno tipo III e V (5%). As proteínas não colagênicas da matriz, juntas, perfazem os 10% restantes. Além da porção orgânica, a matriz óssea é composta por uma porção inorgânica cuja composição é basicamente de íons fosfato e cálcio na forma de cristais de hidroxiapatita, principal componente mineral do osso. Esses cristais conferem também ao tecido ósseo a participação secundária no processo de homeostasia do nível de cálcio no sangue (MOORE *et al.*, 2001).

2.2 Princípios biológicos de neoformação óssea

Apesar do aspecto aparentemente inerte, os ossos crescem, são remodelados e se mantêm ativos durante toda a vida do organismo. Quando lesados, como em fraturas, são capazes de reparação, fenômeno que demonstra sua permanente vitalidade. O processo pelo qual o tecido ósseo se desenvolve é

denominado ossificação ou osteogênese. Os ossos podem se originar de duas maneiras: no seio de uma região condensada de natureza conjuntiva ou quando o tecido ósseo se forma substituindo gradualmente um modelo cartilaginoso preexistente. Pelas suas características, esses dois processos foram denominados, respectivamente, ossificação intramembranosa e ossificação endocondral (LYNCH *et al.*, 1999).

Miloro *et al.* (2008), relataram que o tecido ósseo é biologicamente privilegiado, pois a sua cicatrização ocorre mais por regeneração do que por reparo, originando assim um tecido biologicamente semelhante ao original.

De acordo com Peterson *et al.* (2005) os eventos que ocorrem durante a cicatrização normal de feridas e tecidos moles (inflamação, fibroplasia e remodelação) também ocorrem durante a reparação de um osso lesado. Mas, em contraste com os tecidos moles, osteoblastos e osteoclastos também estão envolvidos para reconstituir e remodelar o tecido ósseo. Os osteoblastos depositam então, o osteóide que, se mantido completamente imóvel durante o processo de cicatrização, chega à calcificação.

O reparo é um processo complexo com eventos celulares e extracelulares, sendo influenciado por uma variedade de fatores incluindo tipo de osso (cortical ou trabecular), local de fratura ou implante, severidade do trauma na fratura ou local de implantação, grau de fixação durante o reparo, espécie e idade. Sendo que o reparo bem sucedido seria aquele com reconstituição da continuidade tecidual (DAVIES *et al.*, 2000).

Assim, o tecido ósseo quando lesado por trauma ou por procedimentos cirúrgicos passa por fase inflamatória inicial, seguida de reparo e, por fim, remodelação. A duração de cada fase depende do tipo de osso envolvido, da idade do indivíduo, do estado de saúde geral e nutricional, da intensidade do trauma, irrigação local, presença ou não de forças mecânicas, imobilização e ausência de infecção para que o tecido ósseo possa constituir osso com capacidade de receber carga funcional (TEN CATE, 2001).

O reparo ósseo é dividido em três estágios: inflamatório, fibroblástico e de remodelação.

Junqueira & Carneiro em 2004, relataram que o estágio inflamatório inicia-se no momento em que a lesão tecidual ocorre e dura, geralmente, de três a cinco dias, sendo dividido em duas fases, a vascular e a celular. Através de uma vasoconstrição

inicial, o coágulo é formado, e minutos após a histamina e as prostaglandinas E1 e E2 causam vasodilatação, possibilitando a passagem do plasma e leucócitos através das células endoteliais. Fibrina proveniente do transudato plasmático causa obstrução linfática, acumulando-se na área da lesão, diluindo os contaminantes e provocando edema.

Segundo Peterson *et al.* (2005), na fase de fibroplasia, ocorre o entrelaçamento dos fios de fibrina que possibilita a precipitação de substância fundamental e tropocolágeno pelos fibroblastos. Os fibroblastos induzem as células mesenquimais indiferenciadas presentes na lesão ou na corrente sanguínea e estas por sua vez, iniciam a produção de tropocolágeno entre o terceiro e o quarto dia após a lesão tecidual. Além disso, os fibroblastos secretam fibronectina, que ajudam a estabilizar a fibrina e auxiliam, ainda, no reconhecimento de materiais estranhos a serem removidos pelo sistema imune guiando macrófagos ao longo dos fios de fibrina.

Ainda de acordo com Peterson *et al.* (2005), na fase de remodelação, o osso produzido desordenadamente é reabsorvido por osteoclastos e os osteoblastos depositam novo osso, orientando para o baixo grau de tensão que normalmente atua sobre os ossos neste momento.

Enlow & Hans (1998), reforçam que o tecido ósseo neoformado adquire características idênticas ao destruído devido ao processo fisiológico de remodelamento e adaptação funcional do osso.

2.2.1 Osteogênese

Osteogênese é a formação e desenvolvimento do osso. Neste mecanismo, os biomateriais são capazes de promover a formação óssea por carregarem consigo células ósseas. Células osteogênicas podem encorajar a formação óssea em tecidos mucosos ou ativar rapidamente a neoformação nos sítios ósseos. O osso autógeno intra-oral e extra-oral são exemplos de materiais de enxertos com propriedades osteogênicas e são capazes de formar tecido ósseo mesmo na ausência de células mesenquimais indiferenciadas (LINDHE *et al.*, 2005).

Segundo Chiapasco & Romeu (2008), a osteogênese é definida como a capacidade de neoformação óssea pelo enxerto, independente da área doadora,

sendo que as células com atividade osteogênica provêm do perióstio (30%) do próprio córtex (20%), do endóstio e da medula óssea (50%). Ao contrário, as células da linhagem hemopoética parecem não possuir nenhuma função.

2.2.2 Osteoindução

Osteoindução é o ato ou processo de estimular a osteogênese. Envolve a formação de um novo tecido ósseo, pela diferenciação local das células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, sob a influência de um ou mais agentes indutores, como as proteínas ósseas morfogenéticas (BMP), presentes nos enxertos (LINDHE et al., 2005).

Para Chiapasco & Romeu (2008), osteoindução é a capacidade de um tecido de induzir as células mesenquimais indiferenciadas, provenientes do leito receptor ou da vizinhança, em se diferenciarem em osteoblastos, estimulando assim a neogênese óssea.

2.2.3 Osteocondução

Na osteocondução o biomaterial funciona como uma matriz física ou arcabouço para deposição de novo osso oriundo das imediações. É caracterizada por um processo de crescimento e invasão de vasos sanguíneos, de tecidos perivasculares e de células osteoprogenitoras do sítio receptor para o enxerto. O biomaterial é gradativamente reabsorvido e simultaneamente substituído por novo tecido ósseo (BAUER & MUSCHLER, 2000).

Chiapasco & Romeu (2008), relataram que a osteocondução é definida como a capacidade do enxerto de criar suporte estrutural para a neoformação óssea. Por essa razão, é um processo de crescimento vascular e de invasão do enxerto pelas células matrizes provenientes do tecido receptor, inicialmente da sua periferia e, posteriormente, com a penetração no enxerto

2.3 Classificação dos enxertos

2.3.1 Enxertos autógenos

Dentre os substitutos ósseos, o osso autógeno apresenta ainda os melhores resultados devido a sua característica osteogênica e osteoindutora, com isto, Kuabara *et al.* (2000) revisou a literatura sobre as áreas doadoras para enxerto ósseo autógeno e técnicas cirúrgicas de obtenção de enxertos, concluindo que as melhores áreas doadoras intrabucais são o mento, a região retromolar e a tuberosidade da maxila, sendo que destas a região retromolar apresenta menor índices de complicações e um bom pós-operatório quando comparado com a região de mento. Entre as possíveis áreas doadoras externas estão a crista ilíaca anterior e a calota craniana sendo que o osso de origem intramembranosa (mandíbula e calota craniana) apresenta menor reabsorção óssea que o de origem endocondral (ilíaco, tibia e costela).

Segundo Chiapasco & Romeu (2008), define-se como enxerto autógeno como o deslocamento de tecido de uma área doadora para um leito receptor, no mesmo indivíduo, sendo atualmente, o material de referência por sua confiabilidade e capacidades osteoindutora e osteocodutora. Ressaltam também que frente as indiscutíveis vantagens, o uso do osso autógeno para enxertos ósseos, apresenta algumas desvantagens, dentre as quais estão principalmente, a necessidade de coleta em áreas intra ou extra bucais, com aumento de morbidade pós-operatória, ampliação dos tempos operatórios e de convalescença, e a necessidade em alguns casos do emprego de anestesia geral, sendo por essa razão que as pesquisas clínicas e experimentais têm sido dirigidas para o uso de substitutos de osso autógeno.

2.3.2 Enxertos alógenos

Os enxertos alógenos ou homogêneos são obtidos de indivíduos da mesma espécie, porém com diferentes genótipos. O material pode provir tanto de cadáveres

quanto de seres vivos que, por diferentes razões, foram submetidos a amputações terapêuticas (CHIAPASCO & ROMEO, 2008).

Segundo Tulasne & Andréani (2010), os aloenxertos são materiais essencialmente osteocondutores, tendo sofrido um tratamento para eliminar a antigenicidade e o risco infeccioso. A matriz orgânica é conservada, mas as proteínas de indução não podem estar acessíveis.

2.3.3 Enxertos xenógenos

Os biomateriais xenógenos provêm de doadores de outra espécie, como exemplo o osso de origem bovina. Sua resistência biomecânica é similar a do osso humano e tratamentos adequados para a sua obtenção podem evitar respostas imunológicas ou inflamatórias adversas. A ausência de proteína torna-o seguro para a utilização em humanos, deixando como restrições ao seu uso apenas os aspectos culturais e religiosos (MISCH, 2000).

Os xenoenxertos mais utilizados derivam da porção mineral do osso animal e representam o arcabouço à migração vascular e celular sendo essencialmente osteocondutores (TULASNE & ANDRÉANI, 2010).

2.3.4 Enxertos aloplásticos

Os materiais aloplásticos são dispositivos de origem sintética. Esses biomateriais, bioinertes e/ou bioativos, podem ser porosos, cristalinos, amorfos e granulados, porém, sobretudo, devem garantir a formação de ligações estáveis como osso neoformado, com o passar do tempo. Utilizados para reconstrução de defeitos ósseos e aumento do rebordo alveolar reabsorvido, funcionam através da promoção de um arcabouço para a angiogênese e consequente neoformação óssea. Em geral, estes materiais exibem boa resistência à compressão e pobre resistência à tensão, similares ao osso humano (MISCH, 2000).

Chiapasco & Romeu (2008), relataram que o enxerto aloplástico é a inserção, no leito receptor, de materiais sintéticos apropriadamente tratados, sendo biocompatíveis ou biotolerados pelo organismo.

2.4 Biomaterias para substituição e regeneração óssea

Pereira *et al.* (1997) realizaram uma pesquisa com o objetivo de avaliar histológica e radiograficamente, a ação da calcitonina de salmão sobre a cicatrização de defeitos ósseos circunscritos, criados cirurgicamente em fêmur de coelhos saudáveis. Esses foram divididos aleatoriamente em dois grupos: controle (n = 12) e tratado (n = 12). O grupo controle não recebeu qualquer substância durante o experimento, enquanto no grupo tratado foi aplicada dose diária de 2 ul/kg de calcitonina por via intramuscular. Os animais foram sacrificados nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias após a criação dos defeitos ósseos. As áreas radiolúcidas desses foram medidas, em mm² por meio de um programa de computador denominado AutoCAD, demonstrando que essas, em média, foram menores no grupo tratado. Histologicamente, aos 7 dias, os defeitos do grupo tratado apresentaram uma maior neoformação óssea. Aos 28 dias houve a formação de um osso menos compacto no grupo controle. No entanto, aos 14 e 21 dias, os resultados foram semelhantes entre os dois grupos. Os resultados obtidos neste trabalho possibilitaram inferir que a calcitonina de salmão demonstrou resultados positivos quanto à cicatrização óssea em defeitos circunscritos, baseados nas análises radiográficas e histológicas realizadas.

Segundo Arisawa *et al.* (2000) a reparação óssea, principalmente em decorrência dos implantes osseointegrados, tem sido objeto de estudos em diferentes condições como, por exemplo, as alterações hormonais decorrentes do climatério. Com isto, esses autores realizaram um estudo para observar a ação da calcitonina no processo de reparação óssea em tíbias de ratas ovariectomizadas. Doze ratas com aproximadamente sessenta dias foram ovariectomizadas e, um mês após esta cirurgia, um defeito ósseo na tíbia foi realizado, através de processo cirúrgico utilizando broca esférica n.º 6, sob irrigação constante com soro fisiológico 0,9%. Imediatamente após a cirurgia, iniciou-se a administração de calcitonina 2 ul/kg, I.M, três vezes por semana em nove animais. Estes foram sacrificados após 7, 14 e 21 dias, sendo suas tíbias removidas e encaminhadas para preparação histológica de rotina. As ratas do grupo controle foram submetidas ao mesmo procedimento, recebendo apenas soro fisiológico. Todos os espécimes foram analisados histologicamente e os resultados demonstraram que a administração de calcitonina em ratas ovariectomizadas, imediatamente após a realização de um defeito ósseo

cirúrgico circunscrito, apresentando, histologicamente, uma maior neoformação óssea após o período de 7 e 14 dias em relação aos animais não tratados.

Duarte da Silva *et al.* (2000) realizaram uma pesquisa para analisar as alterações histológicas de enxerto ósseo homogêneo preparado de diferentes modos. Em um grupo, ossos metatársicos de ratos foram armazenados a -70°C e em outro grupo, os ossos foram descalcificados e estocados em temperatura ambiente após terem sido liofilizados. Esses ossos foram enxertados nas regiões inguinais de ratos e retirados para estudo histológico após 30 dias do procedimento cirúrgico. Na análise microscópica existiram diferenças histológicas entre o enxerto de osso homogêneo armazenado a -70°C quando comparado ao enxerto de osso homogêneo descalcificado e liofilizado. O enxerto de osso homogêneo armazenado a -70°C apresentou grande quantidade de osso mineralizado sofrendo processo de absorção no trigésimo dia após a enxertia. O enxerto de osso homogêneo descalcificado e liofilizado apresentou, no trigésimo dia após a enxertia, tecido homogêneo avascular e acelular, na sua maior parte, muito semelhante à cartilagem.

De acordo com Mastrocinque *et al.*, (2002) as fraturas ósseas complexas, de difícil tratamento, ainda são um grande desafio dentro da medicina humana e veterinária. Métodos cirúrgicos que envolvem enxertos ósseos podem trazer bons resultados, porém eleva o tempo cirúrgico, a morbidade e não estão totalmente livres de complicações. Nesses casos mais complexos, a associação de proteínas ósseas morfogenéticas e outros fatores de crescimento, de maneira sistêmica ou local, poderiam contribuir para a consolidação de fraturas complexas em menor tempo, com menor morbidade cirúrgica e menor incidência de intercorrências.

Leonel *et al.* (2004) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a ação do polímero de mamona durante a neoformação óssea. Para isto, utilizaram um grupo de 45 ratos, onde foi realizado a criação de um defeito ósseo na região do arco zigomático de todos os animais, sendo que todos estes defeitos foram preenchidos com o polímero de mamona. Decorridos períodos de 15, 30, 60, 90 e 120 dias, os animais foram sacrificados e seguiram-se as tramitações laboratoriais de rotina para análise histológica, concluindo que o polímero de mamona mostrou-se como um material auxiliar ao processo regenerativo dos defeitos ósseos, levando a formação de tecido ósseo maduro. A neoformação óssea ocorrida deveu-se principalmente ao fenômeno biológico da osteocondução, uma vez que o polímero de mamona

permitiu o crescimento tecidual em meio a seus poros e sobre sua superfície externa desde os períodos iniciais de observação.

Sassioto *et al.* (2004) realizaram um estudo para avaliar o efeito da calcitonina no reparo de defeito femoral preenchido com matriz óssea bovina desvitalizada. Para isso, quarenta e oito ratos Wistar, machos e adultos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos com 24 animais, onde foram produzidos bilateralmente, defeitos na diáfise femoral com 2 mm de diâmetro e preenchidos com matriz óssea bovina desvitalizada. O grupo experimental recebeu 0,05 ml de calcitonina, intramuscular, no pós-operatório imediato e o grupo controle recebeu 0,05 ml de cloreto de sódio 0,9%. Os animais foram sacrificados com 7, 14 e 21 dias e os fêmures submetidos à avaliação clínica, microscópica e histométrica. Microscopicamente, os defeitos demonstraram reação inflamatória e formação óssea ativa nas proximidades da matriz óssea bovina. A análise quantitativa mostrou maior formação óssea nas fases iniciais da osteogênese reparadora no grupo experimento, sem diferenças em relação à reação inflamatória em ambos os grupos, concluindo que o uso de calcitonina em defeitos preenchidos com matriz óssea bovina desvitalizada estimula a neoformação óssea com 7 e 14 dias de pós-operatório, mas não diminui a reação inflamatória.

Oliveira *et al.* (2005) revisaram as bases científicas para a utilização do enxerto ósseo desmineralizado humano associado ao uso de membranas biológicas relatando a sua aplicação em dois casos clínicos. Concluíram que a associação de enxerto ósseo homogêneo em alvéolos pós-extração, irrigação com solução de tetraciclina e uso de membranas biológicas, após um tempo de espera de 90 dias para colocação de implantes e de 120 dias para a confecção da prótese, têm-se mostrado com previsibilidade de resultados na prática da implantologia.

Cruz *et al.* (2005) relataram que os substitutos ósseos são materiais utilizados em terapia óssea regenerativa podendo ser de origem humana, bovina, hidroxiapatita ou materiais bioativos. Analisando a morfologia de oito tipos de substitutos ósseos por microscopia eletrônica de varredura, concluíram que todos os substitutos ósseos analisados possuíam o formato irregular em sua superfície apresentando diferentes tipos de porosidades.

Miranda *et al.* (2005) realizaram um trabalho com proposta de avaliar o resultado na consolidação de fraturas do rádio em coelhos utilizando enxerto ósseo orgânico e enxerto ósseo mineral. No estudo foram utilizados 20 animais adultos,

machos e fêmeas pesando entre 3,0 e 3,5 kg, divididos em dois grupos iguais e submetidos à osteotomia transversa completa simples na diáfise do rádio direito sendo retirado 1 cm de fragmento ósseo. No grupo I (G1) foi colocado fragmento de enxerto ósseo orgânico retirado da asa íliaca do mesmo animal no local da osteotomia; no grupo II (G2) foi colocado enxerto ósseo inorgânico *Osteosynt*, constituído de hidroxiapatita sintética e fosfato de cálcio. Os grupos foram subdivididos em 5 períodos (15, 30, 45, 60 e 75 dias), para avaliação dos aspectos radiográficos e histológicos do local da osteotomia visando observar o processo de consolidação óssea local. Concluíram que o enxerto inorgânico estimulou precocemente o início do processo de reparação óssea em coelhos quando comparado ao osso orgânico e os achados radiográficos e histológicos mostraram melhor evolução na formação de calo ósseo com uso de enxerto inorgânico.

Carlo *et al.* (2007) realizaram um trabalho experimental com o objetivo de estudar o efeito osteoindutor do biovidro e da hidroxiapatita sintética, esses biomateriais foram implantados no tecido subcutâneo de cães e analisados ao microscópio óptico. Nas lâminas que continham a hidroxiapatita observou-se infiltrado celular intenso com células gigantes do tipo corpo estranho e reação inflamatória exsudativa inicial importante, que posteriormente se tornou granulomatosa. Nas lâminas dos animais com o biovidro, até os 30 dias, verificaram-se infiltrado discreto, predominantemente macrofágico, e, aos 45 dias, predominava infiltrado fibroso. Em nenhuma lâmina foi encontrada qualquer evidência de degradação das partículas dos biomateriais analisados ou formação ectópica de tecido ósseo; portanto, concluiu-se que os dois biomateriais não são osteoindutores.

Laureano-Filho *et al.* (2007) realizaram um estudo comparativo entre uma matriz óssea desmineralizada de origem humana com uma resina poliuretana derivada do óleo da mamona, analisando o processo de reparação óssea de ambos. No estudo foram utilizados 24 coelhos, e em cada calvária foram preparadas duas cavidades cirúrgicas, sendo uma do lado direito e a outra do lado esquerdo da sutura parietal. Os animais foram divididos em dois grupos. No grupo I, a cavidade experimental foi preenchida com a matriz óssea desmineralizada de origem humana, enquanto no grupo II a cavidade experimental foi preenchida com a poliuretana derivada do óleo de mamona. Os autores concluíram que histologicamente, tanto os grupos controle quanto os grupos experimentais, houve um aumento na neoformação óssea ao longo do tempo, sendo nos grupos controle mais rápidas que

nos experimentais. Ambos os materiais testados apresentaram-se como materiais biocompatíveis, sendo a matriz óssea desmineralizada de origem humana reabsorvida bem mais rapidamente que a poliuretana derivada do polímero da mamona, a qual parece ser um material de reabsorção tardia, conforme observado, na análise histológica, nos períodos de 4, 7 e 15 semanas.

Mendonça *et al.* (2007) realizaram um estudo para avaliar histologicamente o processo de reparo ósseo após a implantação de um pool de proteínas morfogenéticas ósseas (Gen-Pro®). Para isto, foram utilizados 24 *Rattus norvegicus* machos, clinicamente sadios e com peso aproximado entre 300 e 350 gramas, onde foram criados defeitos ósseos no fêmur, sendo um defeito por cobaia e divididos em 2 grupos: Grupo I (controle; n=12) que foram preenchidos apenas com coágulo sanguíneo e grupo II (Gen-Pro; n=12) preenchidos com o pool de BMPs. Os animais foram sacrificados em 15, 21 e 30 dias, e as lâminas foram coradas em hematoxilina/eosina e picosirius e analisadas por microscopia de luz através de análise descritiva e semiquantitativa, considerando parâmetros representativos do processo de reparo, tais como: reparo cortical, fibras colágenas, infiltrado inflamatório e neoformação óssea. Nos períodos iniciais de 15 e 21 dias foi observada uma diferença estatisticamente significativa no confronto do Grupo I contra o Grupo II, sendo que a velocidade de neoformação óssea foi maior no grupo I. Aos trinta dias, todos os defeitos ósseos estudados alcançaram reparação, com diferentes graus de resolução. Concluíram então que o biomaterial testado promoveu efeito biomodulador positivo sobre a neoformação óssea, embora se tenha verificado maior velocidade de neoformação óssea no grupo I (controle).

Carvalho (2009) relatou que os substitutos ósseos foram desenvolvidos para auxiliar e facilitar os procedimentos regenerativos de tecido ósseo nas mais variadas situações, seja de reforço ou na recuperação da dimensão vertical e horizontal após as perdas dentárias. No entanto, atualmente ainda não existe um material que possa substituir o osso autógeno com todos os eventos primordiais da neoformação óssea. Contudo, segundo esses autores, atualmente, inúmeras pesquisas em todo o mundo estão evoluindo e investigando os componentes celulares que influenciam diretamente na osseointegração e na regeneração óssea.

De acordo com Teixeira (2009), os biomateriais à base de fosfato de cálcio são amplamente utilizados como substitutos ósseos. Para avaliar o efeito osteocondutor da hidroxiapatita, realizou um trabalho com hidroxiapatitas com

diferentes características físico-químicas, uma com baixa cristalinidade (HA-1) e outra com alta cristalinidade (HA-2) inseridas em defeitos ósseos de tamanho crítico na calvária de ratos. Foram utilizados 45 ratos, sendo 15 enxertados com HA-1, 15 com HA-2 e 15 preenchidos apenas pelo coágulo. O sacrifício dos animais ocorreu em 1, 3 e 6 meses após a cirurgia e os procedimentos histotécnicos e histomorfométricos foram realizados para se determinar a densidade de volume de osso neoformado nas regiões periférica, intermediária e central do defeito, nos três grupos. A primeira análise comparou a densidade de volume de osso neoformado nas regiões periférica, intermediária e central entre os grupos. A segunda avaliou a dinâmica da neoformação óssea em cada grupo isoladamente. Ao comparar os grupos HA-1, HA-2 e coágulo não existiram diferenças estatisticamente significantes na densidade de volume de osso neoformado nas três regiões estudadas, no intervalo de tempo determinado. No entanto, ao se analisar os grupos isoladamente houve diferença na dinâmica da neoformação óssea. O grupo coágulo apresentou um aumento da densidade de volume de osso neoformado na região intermediária aos 6 meses após a cirurgia. Os grupos enxertados com HA-1 aos 3 meses e com HA-2 a 1 e aos 6 meses após a cirurgia apresentaram equivalentes densidade de volume de osso neoformado nas regiões periférica, intermediária e central sem diferença estatisticamente significativa, demonstrando satisfatório potencial osteocondutor desse biomaterial.

Almeida *et al.* (2010) realizaram um experimento com o objetivo de avaliar histomorfometricamente o comportamento do polímero de mamona durante o processo de cicatrização de defeitos de tamanho crítico preparados em calvárias de 20 ratos, onde foi realizado cirurgicamente, um defeito crítico de 8 mm de diâmetro com broca trefina. Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com os seguintes procedimentos: grupo C, não receberam nenhum tratamento local e o defeito ósseo foi preenchido com coágulo sanguíneo; grupo M, o defeito ósseo foi preenchido com partículas de polímero de mamona. Os animais foram sacrificados 180 dias após os procedimentos cirúrgicos e as peças foram submetidas à análise histomorfométrica, onde foi constatado que nos animais do grupo C o tecido ósseo neoformado mostrou-se bem desenvolvido, com áreas adjacentes de matriz osteoide rica em osteoblastos, e restrito às proximidades das bordas do defeito. Nos animais do grupo M, observou-se tecido ósseo lamelar neoformado restrito às proximidades das bordas do defeito e partículas de polímero de mamona distribuídas ao longo do

defeito. Houve uma maior porcentagem de área de osso neoformado nos animais do grupo C comparado aos animais do grupo M. Concluíram que o polímero de mamona apresentou-se histomorfometricamente biocompatível e manteve o espaço durante o processo de cicatrização de defeitos de tamanho crítico cirurgicamente preparados em calvárias de ratos.

De acordo com Souza *et al.* (2010) a regeneração de defeitos ósseos representa um grande desafio para a área biomédica, pois podem acarretar em sequelas funcionais e/ou estéticas que comprometem a qualidade de vida do indivíduo afetado. Nesses casos, os enxertos ósseos podem ser utilizados para o tratamento do tecido ósseo perdido reabilitando e devolvendo a autoestima ao paciente. Os enxertos ósseos autógenos são eleitos como os de primeira escolha, pela sua eficiência, biossegurança e facilidade de obtenção, porém apresentam algumas desvantagens e limitações. A utilização de homoenxertos provenientes de bancos de ossos demonstra ser uma ferramenta bastante útil para a odontologia, com a finalidade de regenerar o tecido ósseo perdido dos maxilares, porém faz-se necessário que mais bancos de coleta e preparo do tecido ósseo sejam instalados nos hospitais brasileiros para que esta opção torne-se viável e acessível a um número maior de serviços que atuam com reconstruções ósseas.

Guimarães *et al.* (2011) realizaram um estudo relativo a biocompatibilidade e capacidade osteocondutora do cimento de fosfato de cálcio para a substituição óssea. O objetivo deste estudo foi fazer uma comparação histomorfométrica da regeneração óssea usando cerâmica bifásica de hidroxiapatita, cimento de fosfato de cálcio e enxerto ósseo autógeno. Para isto, foram confeccionadas duas cavidades de 5 mm de diâmetro (esquerda e direita - teste e controle) no osso parietal de 72 ratos. Os grupos GI, GII, GIII e GIV, as cavidades teste foram preenchidas respectivamente com cimento de fosfato de cálcio, cerâmica bifásica de hidroxiapatita, enxerto ósseo autógeno e coágulo sanguíneo. Os animais foram sacrificados com 30, 60 e 90 dias e as amostras foram submetidas à análise histomorfométrica. Os resultados demonstraram que os defeitos tratados com enxerto ósseo autógeno apresentaram mais osso neoformado aos 30 dias em comparação com outros grupos de teste. Dentro de 60 e 90 dias, a neoformação óssea foi mais significativa nos grupos de teste GI, GII e GIII; GI e GII abrangeram áreas maiores. Ao longo dos períodos de avaliação, os testes do GII apresentaram maior formação óssea, quando comparado ao GI. Concluiu-se então que os

biomateriais descritos apresentaram um aumento significativo na neoformação óssea e podem ser utilizados para auxiliar na regeneração óssea.

Sousa (2010) realizou um trabalho com o objetivo de avaliar histomorfometricamente a reparação óssea em defeitos criados na calota craniana de ratos Wistar, acima do limite crítico, utilizando biomaterial sintético (hidroxiapatita + β - tricálcio-fosfato). Foram utilizados 18 animais, distribuídos aleatoriamente em três grupos G1, G2 e G3, com 6 animais cada. O estudo foi pareado, com defeito de 5 mm criado no osso parietal em cada lado da sutura sagital mediana do animal, onde o lado esquerdo correspondeu ao experimento, subgrupo A, (preenchido por biomaterial de origem sintética) e o lado direito ao controle, subgrupo B, (preenchido por coágulo sanguíneo). Os espécimes foram enviados para avaliação histológica, nos períodos de 15, 30 e 45 dias, que corresponderam aos grupos G1, G2 e G3. Os resultados demonstraram que a matriz óssea neoformada foi maior nos defeitos ósseos preenchidos pelo biomaterial ($4,00 \pm 0,89 \mu\text{m}^2$) do que no grupo controle ($1,67 \pm 0,82 \mu\text{m}^2$), havendo diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos. Concluiu-se que o biomaterial utilizado contribuiu no processo de reparação óssea.

2.5 Sulfato de Cálcio

Em 2001, Alexander *et al.* relataram a utilização do sulfato de cálcio misturado com enxerto ósseo autólogo nas artrodeses da coluna vertebral, na região lombar, sem utilização de materiais de osteossíntese. No estudo foram analisadas a casuística de 40 pacientes, sendo que 32 tinham seguimento de pelo menos um ano de pós-operatório. A análise clínica e radiográfica mostrou resultados semelhantes ao enxerto de osso autógeno de crista ilíaca, sendo, portanto, satisfatórios pra esse fim.

Strocchi *et al.* (2002) relataram que o osso autólogo é o material de enxerto ósseo ideal porque carrega consigo proteínas ósseas, minerais e células ósseas vitais. Porém, entre os substitutos ósseos, o sulfato de cálcio é um biomaterial bem tolerado, biodegradável e osteocondutor podendo ser uma alternativa razoável para substituir o enxerto ósseo autógeno. Os vasos sanguíneos são um componente importante na formação óssea de sua manutenção, sendo que o processo de

indução vascular chama-se angiogênese e desempenha um papel fundamental em todos os processos regenerativos. A diferenciação de tecido ósseo está relacionada com o local e a presença dos vasos sanguíneos. Um método para avaliar a presença de vasos sanguíneos em um tecido é contar o microvasos, avaliando a densidade de microvasos (DMV). Sendo assim, realizaram um estudo com o objetivo de fazer uma avaliação comparativa na densidade vascular nos sítios tratados com sulfato de cálcio com ou sem membranas não reabsorvíveis de e-PTFE (Gore-Tex, Flagstaff, Ariz) e osso autógeno em coelhos. Nove coelhos da Nova Zelândia, com peso de aproximadamente 2,5 kg cada, foram utilizados nesta experiência. Três defeitos ósseos de 6 mm de largura foram criados em cada metáfise tibial sendo preenchidos de forma aleatória. Os defeitos do grupo 1 (3 coelhos) foram preenchidos com grânulos de sulfato de cálcio (Surgiplaster, Classimplant, Roma, Itália) e cobertos com membranas de e-PTFE, os defeitos no grupo 2 (3 coelhos) foram preenchidos com grânulos de sulfato de cálcio (Surgiplaster) e os defeitos do grupo 3 (três coelhos) foram preenchidos com osso autógeno. Um total de 54 defeitos foram preenchidos (18 com sulfato de cálcio e membranas de e-PTFE, com 18 sulfato de cálcio e 18 com osso autógeno). Os nove animais foram sacrificados após 4 semanas e os resultados do DMV foram os seguintes: no primeiro grupo, 9,88 +/- 4,613; no segundo grupo, 7,92 +/- 1,998, e no terceiro grupo, 5,56 +/- 1,895. $P=0,001$ foi altamente significativo. Ouve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos 1 e 3, 1 e 2, e 2 e 3. Com isso, concluíram que a presença de mais vasos sanguíneos nos sítios tratados com sulfato de cálcio pode ajudar a explicar os bons resultados relatado na literatura com a utilização desse biomaterial.

Trevisan-Júnior *et al.* (2006) relataram que a combinação de membrana com sulfato de cálcio, com a associação ao enxerto ósseo autógeno como material de preenchimento, pareceu-lhes uma alternativa altamente efetiva e viável para correção de defeitos ósseos periodontais. O caso relatado obteve sucesso em longo prazo, observando clínica e radiograficamente pela condição de saúde apresentada pelos tecidos periodontais, pela diminuição significativa da profundidade de sondagem e pela manutenção da radiopacidade e estabilidade da área enxertada, sugestiva de neoformação óssea, mesmo após cinco anos de acompanhamento.

Furlaneto *et al.* (2007) realizaram um estudo com o objetivo de analisar histologicamente a influência sobre a cicatrização óssea do vidro bioativo com ou sem barreira de sulfato de cálcio em defeitos de tamanho crítico criados

cirurgicamente na calvária de 48 ratos. Os animais foram divididos em três grupos: C (controle): coágulo de sangue; VB: defeito preenchido com vidro bioativo; VB/SC: vidro bioativo com sulfato de cálcio. Os animais foram sacrificados após 4 e 12 semanas sendo avaliados histomorfometricamente sobre a neoformação óssea. Concluíram então que nenhum defeito foi regenerado completamente com osso, sendo que foram observadas partículas de vidro bioativo nos grupos VB e VB/SC em ambos os períodos da análise não havendo diferença significativa na quantidade de formação óssea observada entre os três grupos. Porém ao comparar 4 e 12 semanas, verificou-se um aumento significativo de osso neoformado dentro dos grupos VB e VB / SC, o que não ocorreu em C.

Macedo *et al.* (2008) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a possibilidade de obter a regeneração óssea guiada com dois tipos de barreiras físicas (sulfato de cálcio e barreira de PTFE não poroso) em defeitos cirúrgicos criado nos ossos parietais de ratos. No osso parietal direito o defeito foi preenchido inteiramente com sulfato de cálcio e no osso parietal esquerdo utilizou-se uma barreira de PTFE que foi posicionada na superfície e no assoalho do defeito cirúrgico. Após 7, 14, 30 e 45 dias, quatro animais foram sacrificados em cada período e o osso contendo os defeitos foram submetidos à análise microscópica. Os resultados revelaram que a barreira de PTFE foi mais eficaz para a regeneração óssea em defeitos transcorticais em comparação com o sulfato de cálcio. Contudo, experiências adicionais são necessárias para determinar se o sulfato de cálcio seria bem sucedido em outros tipos de defeitos ósseos ou a utilização do material sob outra consistência poderia complementar os resultados obtidos neste trabalho.

Zabeu & Mercadante (2008), realizaram uma revisão sistematizada da literatura, de estudos clínicos com nível 1 de evidência, comparando substitutos ósseos ao enxerto autólogo. Para isto, foi realizada uma busca eletrônica de artigos que comparassem o uso do enxerto ósseo autólogo a um substituto ósseo em cirurgia ortopédica considerando como critérios de elegibilidade ensaios clínicos prospectivos e randomizados em cirurgia ortopédica, com casuística mínima de 20 pacientes, envolvendo ossos da coluna vertebral ou esqueleto apendicular, publicados entre janeiro de 1990 e janeiro de 2006. Foram identificados vinte e dois trabalhos, todos em língua inglesa, dos quais cinco compararam enxerto autólogo ao homólogo, sete envolveram uso de proteína morfogenética do tipo 2 (BMP-2), três foi avaliado a proteína morfogenética do tipo 7 (BMP-7) e sete utilizaram

biocerâmicas, como hidroxiapatita, fosfato tricálcio e sulfato de cálcio. Os resultados mais sugestivos da equivalência com o enxerto autólogo se deram nos trabalhos com BMP-2 em cirurgia da coluna vertebral, embora diversos questionamentos possam ser feitos em relação a estes e aos demais estudos analisados, referentes a métodos e possíveis conflitos de interesses. Com esses dados concluiu-se que existem poucos estudos com alto nível de evidência que demonstrem a aplicabilidade clínica dos substitutos ósseos atualmente existentes.

López & Alarcón (2011), relataram que durante mais de cem anos, o sulfato de cálcio tem se distinguido de outros biomateriais por ser um dos materiais aloplásticos mais simples e com uma longa história como material sintético. Entre as suas principais propriedades, se destacam a sua fácil obtenção, capacidade de osteocondução, sua total absorção, não causa inflamação ou reações antigênicas, fácil modelação e resistência à compressão semelhante ao tecido ósseo. Todas estas características são necessárias para utilização como um substituto ósseo. No entanto, relatam também que diferenças na morfologia e na estrutura dos cristais, porosidade, propriedades mecânicas e de constituição química de sulfato de cálcio podem alterar significativamente as suas propriedades biológicas.

Toloue *et al.* (2011) relataram que muitos materiais já foram utilizados com eficácia para preservar o alvéolo dental após exodontias em reabilitações orais e realizaram um estudo com o objetivo de determinar se o sulfato de cálcio é tão eficaz quanto o osso liofilizado na preservação dimensões do alvéolo dentário após exodontias, avaliando a espessura e a quantidade de neoformação óssea desses dois biomateriais através de análise histomorfométrica após 3 meses do procedimento cirúrgico. Os resultados demonstraram que o sulfato de cálcio se mostrou tão eficiente quanto o osso bovino liofilizado na manutenção do alvéolo dentário após exodontias em regiões não molares.

Dasmah *et al.* (2012) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar clínica e histologicamente o uso do sulfato de cálcio em procedimentos de elevação do seio maxilar, para posterior tratamento com implantes dentários. Dez pacientes com maxilas edêntulas foram submetidos à cirurgia de elevação de seio maxilar, utilizando-se para isso, os biomateriais Surgiplaster (Classimplant®, Roma, Itália) recoberto por BioGide® (Geistlich Pharmaceutical, Wolhusen, Suíça). Após 4 meses de cicatrização do enxerto, 40 implantes dentários foram colocados e uma biópsia para análise histomorfométrica foi realizada. Os resultados deste estudo

demonstraram que a neoformação óssea ocorre com sucesso no seio maxilar após a elevação com sulfato de cálcio e após um ano de controle, apenas 1 dos 40 implantes instalados foi perdido, dando uma taxa de sucesso clínico de 97,5%.

Em 2012, Pettinicchio *et al.* realizaram um estudo com o objetivo de avaliar histológica e ultra-estruturalmente o osso formado no seio maxilar humano em procedimentos de elevação de assoalho com sulfato de cálcio. Para tanto foram utilizados a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de raios-x por dispersão em energia para avaliar a relação entre o sulfato de cálcio e o osso neoformado. Os resultados confirmam a elevada biocompatibilidade e taxa de reabsorção rápida do sulfato de cálcio. O mecanismo de transformação do sulfato de cálcio para fosfato de cálcio, que já foi demonstrado em estudos em animais, foi confirmado nesse presente estudo humano.

2.6 Nitrato de Gálio

Jenis *et al.* (1993) relataram que após a aplicação em ratos por um período de 14 dias, o nitrato de gálio, induziu mudanças expressivas nas propriedades minerais dos ossos desses animais, acumulando-se principalmente nas regiões de formação ativa de osso (osteoblásticas), regiões metafisárias. Os autores concluíram que o tratamento com nitrato de gálio, mesmo em curto prazo, causou aumento nos teores de cálcio e fósforo nos ossos, gerando uma resposta óssea favorecendo a sua densidade, dificultando assim sua reabsorção.

Warrel (1995) relatou que o gálio parece ser um agente que atua unicamente no tratamento de doenças reabsortivas do osso, reduzindo perda óssea acelerada em pacientes com câncer e doença osteometabólica. O conceito de usar certas medidas terapêuticas como adjuvantes ao tratamento tradicional anticâncer para fortalecimento do tecido ósseo frente à erosão devida às metástases tem ganhado maior confiança. Contudo, no resultado ideal, essas medidas deveriam não só minimizar perda óssea progressiva, mas também restituir osso previamente erodido, por exemplo, em ortopedia.

Segundo Bernstein (1999), o gálio se acumula intensamente nos focos de infecção e inflamação, incluindo aqueles de origem granulomatosa e sinovites associadas com artrite reumatóide. Nesse estudo foi demonstrado que o elemento

gálio se concentra na maioria dos tumores onde o receptor da transferrina está expresso em grandes quantidades e em áreas de grande atividade osteoblástica.

Rokita *et al.* (2001) realizaram um estudo utilizando fluorescência de raios-X e sua emissão induzida por prótons para demonstrar que o gálio está depositado nos componentes orgânico e inorgânico da célula. Concluíram com esse estudo que o acúmulo do elemento na matriz orgânica indica que o mecanismo de ação do gálio é mais complexo do que o sugerido pela ideia simplista da mera incorporação do íon dentro da rede cristalina da hidroxiapatita.

De acordo com Bockman (2003) a doença de Paget é um dos casos mais bem sucedidos de aplicação do gálio em sua terapia. Essa enfermidade pode ser definida como remodelamento anormal do osso com constante renovação óssea ou reciclagem, sem mudanças anárquicas no seu tamanho e forma. Essa alteração do processo de remodelação do osso muda a sua textura e dá origem a quatro fases da doença observadas radiologicamente. São as fases osteolítica, mista, osteoblástica e osteoesclerótica inativa, as quais são caracterizada pelos níveis de atividade óssea encontrados em cada uma delas.

Mori *et al.* (2006) testaram a solução de nitrato de gálio, um agente anti-reabsortivo, como curativo intracanal para dentes reimplantados tardiamente. Trinta incisivos centrais superiores direitos de ratos foram avulsionados e mantidos a seco por trinta minutos, tiveram os canais radiculares instrumentados e sua superfície radicular tratada com hipoclorito de sódio a 1%, seguido de fluoreto de sódio a 2%. Após isso, os dentes foram divididos em dois grupos de acordo com a medicação intracanal: no grupo I, foi usada solução de nitrato de gálio e grupo II, pasta de hidróxido de cálcio. Após 15, 30 e 60 dias da reimplantação dos dentes, os animais foram sacrificados e as lâminas processadas e obtidas para análise microscópica e morfométrica. Os resultados mostraram que a solução de nitrato de gálio e a pasta de hidróxido de cálcio limitaram a reabsorção radicular, mas não impediram a sua ocorrência. Concluiu-se que ambos os medicamentos possuem ação semelhante.

Mori *et al.* (2007) realizaram um trabalho com o objetivo de testar o efeito da solução de nitrato de gálio, uma substância anti-reabsortiva, para inibir o processo de reabsorção radicular e facilitar o reparo ósseo em dentes reimplantados tardiamente. Para isso, foram utilizados 20 incisivos centrais superiores direitos de ratos, divididos em 2 grupos (n=10). No grupo I, a superfície radicular foi tratada com

solução de nitrato de gálio por 20 min e no grupo II com fluoreto de sódio a 2% por 20 min. Todos os canais foram preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio e após 15 e 60 dias do reimplante, os animais foram sacrificados e as peças obtidas, processadas em laboratório para análise em microscópio de transmissão de luz. Na análise, foi observado que em ambos os grupos, houve pequena ocorrência de anquilose e reabsorção radicular, o tecido conjuntivo formado no espaço do ligamento periodontal era disposto paralelamente à raiz e na maioria dos espécimes dos dois grupos mostrou-se inflamado e com algumas áreas de necrose. Porém no grupo I, houve a formação de bolsa periodontal em todos os espécimes aos 60 dias, indicando a ausência de reparo, desaconselhando então, o uso do nitrato de gálio para o tratamento de superfície de dentes reimplantados tardiamente.

Segundo Malzac (2008) um novo material que pode ser recomendado para enxerto e estimular o crescimento ósseo em implantes têm sido obtido pela introdução de íons de gálio dentro da rede cristalina da hidroxiapatita. O gálio não substitui o cálcio como resultado da substituição heterovalente e conseqüentemente não produz distorção na matriz da hidroxiapatita, não causando nenhuma alteração na estrutura morfológica da hidroxiapatita e o produto desenvolvido segue critérios físico-químicos para o biomaterial a ser empregado na prática ortopédica e tratamento das lesões traumáticas. Confirmou também, que a hidroxiapatita dopada pelo gálio não apresenta citotoxicidade e relataram a sua futura utilização para melhorar a osteossíntese e retenção de cálcio *in loco*.

Melnikov *et al.* (2008) relataram que o gálio (geralmente na forma de nitrato) aumenta a concentração de cálcio e fósforo no osso, influenciando nos osteoclastos de maneira direta e não-tóxica, em doses surpreendentemente baixas. Este fármaco age nos componentes celulares do osso, impedindo sua absorção ao diminuir a secreção ácida dos osteoclastos, estando esse mecanismo relacionado a incorporação direta nos sais de hidroxiapatita e diferentemente de outras drogas que impedem a perda de cálcio, os sais de elemento traço gálio, são eficazes em hipercalcemia severa. Relataram também que o gálio merece ser futuramente avaliado do ponto de vista experimental e clínico, como um agente antiabsortivo em ortopedia, traumatologia e doenças relacionadas com o câncer.

2.7 Modelos experimentais

O osso parietal é formado por uma placa que apresenta corticais externa e interna compactas, relativamente espessas, com faixa intermediária estreita de osso medular e ossificação intramembranosa tendo reparo ósseo muito semelhante a região maxilar (FROTA, 2006).

Prado *et al.* (2006) relataram que devido à semelhança do reparo ósseo em tibia com o reparo mandibular e a simplicidade do modelo experimental no qual se realizam defeitos ósseos em tíbias de ratos, propuseram um trabalho com o objetivo de determinar o tamanho de defeito exequível na tibia para adequada utilização em estudos de regeneração óssea. Para isso foram realizados defeitos monocorticais de 2, 3 ou 3,5 mm de diâmetro nas tíbias de 54 ratos adultos. Após o sacrifício, que ocorreu depois de períodos de observação de 15, 30 ou 45 dias, as tíbias foram fixadas, descalcificadas e preparadas. Como não houve fechamento da área total do defeito, podendo-se utilizar, com ressalvas, o modelo de defeito ósseo em diáfise de tíbias de ratos para pesquisas sobre reparo ósseo.

De acordo com Kussano *et al.* (2007) indivíduos imaturos e adultos possuem habilidades diferentes na cicatrização óssea de defeitos amplos criados em calvária. A calvária de ratos adultos possui vantagens como modelo experimental em testes de biomateriais para reparo ósseo. Entretanto, faltam informações sobre a influência da idade de ratos neste processo. Realizaram então um estudo com objetivo de avaliar a cicatrização óssea em defeitos criados em calvárias de ratos Wistar com duas faixas etárias distintas. Os ratos foram divididos em 2 grupos: A: 12 semanas de idade (n = 16); e B: 40 semanas (n = 15). Um defeito de 5 mm de diâmetro foi criado em cada calvária e preenchido com coágulo sanguíneo. Cada grupo foi dividido em dois para eutanásia aos 30 e 90 dias pós-operatórios. Foi realizada análise histomorfométrica da área de osso neoformado. Os Grupos A e B não apresentaram diferenças significativas em relação à quantidade de osso neoformado, tanto aos 30 (22,04% ± 5,42 e 19,88% ± 4,56, respectivamente) como aos 90 dias (26,88% ± 11,83 e 22,32% ± 3,39, respectivamente). Concluiu-se então que ratos Wistar com 12 e 40 semanas de idade não diferem entre si quanto à habilidade de cicatrização óssea em defeitos em calvárias.

Costa *et al.* (2010) realizaram um trabalho com o objetivo desenvolver um modelo experimental em ratos para o estudo de deformidades craniofaciais e concluíram que o modelo experimental com defeitos de 5 x 8 mm na região parietal, com remoção do periósteo e manutenção da integridade da dura-máter são considerados críticos, e podem ser utilizado para o estudo dos defeitos ósseos cranianos nas anomalias craniofaciais permanecendo abertos após 16 semanas da cirurgia.

3. OBJETIVOS

OBJETIVOS GERAIS

Avaliar as propriedades terapêuticas do nitrato de gálio em uso local.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Através de testes *in vivo*, avaliar a biocompatibilidade e a capacidade osteoindutora do nitrato de gálio combinado com o sulfato de cálcio.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Para realização deste experimento, foram utilizados 12 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) adultos jovens, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Após o nascimento, os animais foram observados até atingirem peso corporal de aproximadamente 300 gramas (sendo considerados adultos jovens), o que ocorreu em média após 100 dias de nascimento. Os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos experimentais distintos, contendo 6 indivíduos, sendo que cada um destes grupos recebeu a experimentação de um tipo de biomaterial.

Os animais foram mantidos em gaiolas padronizadas, individuais, etiquetadas e identificadas com o número do grupo ao qual pertenciam, nome do pesquisador, do orientador e acondicionadas em ambiente climatizado por ar condicionado e com mínimo de ruídos. Os animais receberam alimentação constituída de ração sólida balanceada e água à vontade. A limpeza das gaiolas foi realizada em dias alternados, com água corrente, sabão e desinfetante, sendo as mesmas mantidas em estante ventilada e com iluminação de 12 horas ao dia (figura 1).

Todos os procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEUA/UFMS) e sob Protocolo nº 290/2010 (Anexo 1).



Figura 1 - Estante ventilada com fotoperíodo de 12 horas ao dia.

A ração dos animais foi suspensa quatro horas antes do procedimento cirúrgico, permanecendo com ingestão de água a vontade. Após a pesagem em balança de precisão, os animais foram inspecionados a fim de verificar o estado da pele, presença de secreções nos olhos, ouvidos, narinas e características das fezes, para certificar que os mesmos encontravam-se saudáveis; caso contrário, seriam desprezados.

Uma hora antes do procedimento cirúrgico, foi realizada profilaxia antibiótica com oxitetraciclina 50 mg /kg. Os animais foram pré-anestesiados com cloridrato de ketamina 25mg/kg e como medicação analgésica foi administrado o butorfanol 0,1ml/kg (ambos intramuscularmente, na face posterior da coxa dos animais). Após um período de latência de 2 a 5 minutos, a anestesia foi complementada pela associação de cloridrato de ketamina 50 mg/kg (0,05ml/100g) com cloridrato de xilazina 5mg/kg (0,025 ml/100g) por via intraperitoneal, obtendo-se um tempo de trabalho para cada animal de aproximadamente duas horas (Figura 2).



Figura 2- Anestesia intraperitoneal com cloridrato de ketamina associada com cloridrato de xilazina.

Estando os animais anestesiados, foi realizada a tricotomia na região craniana e após a realização de manobras de assepsia e anti-sepsia com PVPI a 2%, realizou-se uma incisão acompanhando o plano sagital na linha média craniana com lâmina de bisturi Bard-Parker nº15 montada em cabo de bisturi nº3, até o

pericrânio dos animais, posteriormente foi realizado o descolamento periosteal com destaca periosteio de Molt nº9 para a exposição do sítio cirúrgico (figura 3).

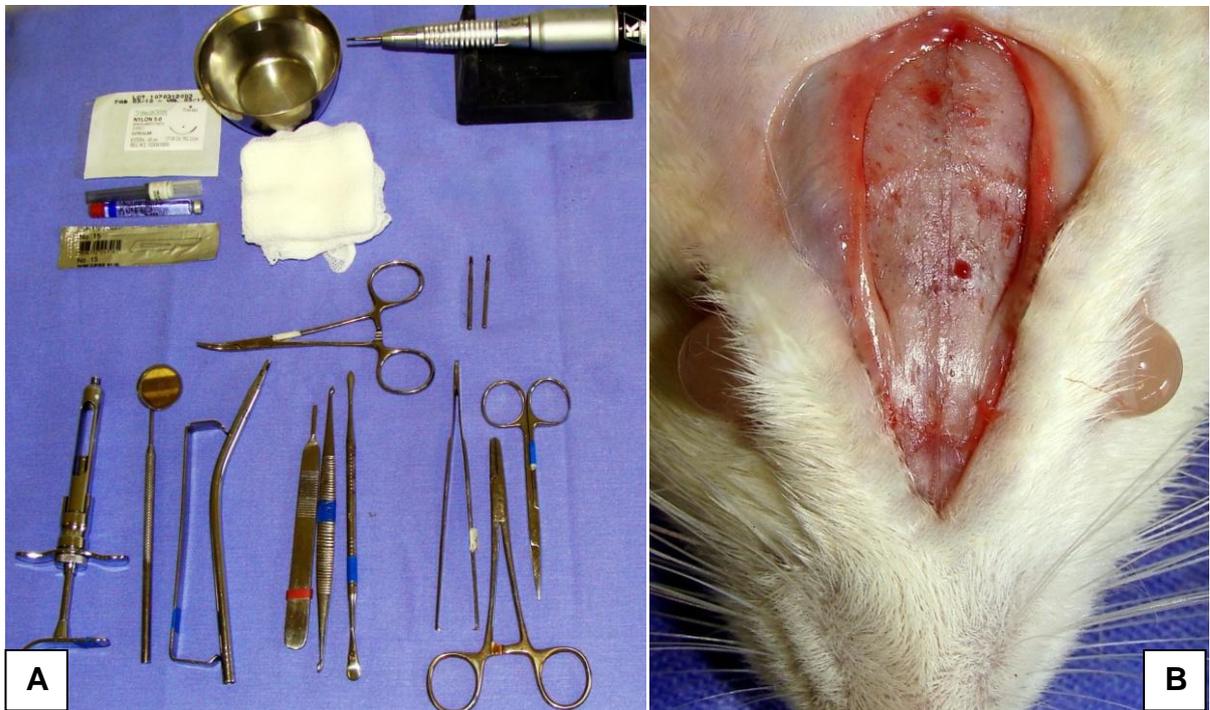


Figura 3- **A:** Mesa cirúrgica. **B:** Incisão sagital na linha média craniana e descolamento pericraniano para exposição do sítio cirúrgico.

Com uma broca de 2,0 mm de diâmetro, acionada por motor elétrico e sob irrigação abundante com soro fisiológico 0,9%, foi realizado um defeito ósseo de 2,0 mm de diâmetro em cada um dos lados da calvária craniana. Um destes defeitos foi considerado o controle sendo preenchido apenas por coágulo sanguíneo, enquanto o outro lado com auxílio de um calcador odontológico foi implantado os seguintes biomateriais de acordo com o grupo experimental: no grupo I com sulfato de cálcio P.A. e grupo II com sulfato de cálcio P.A. associado ao nitrato de gálio 3,0% em peso (Figuras 4 e 5).

O sulfato de cálcio P.A. foi misturado ao nitrato de gálio numa proporção de 240 mg de sulfato de cálcio P.A para 120 µl de nitrato de gálio com auxílio de um medidor de cimento odontológico e de uma micropipeta graduada monocanal ajustada para um volume de 60 µl (figura 4). A concentração final da mistura continha, portanto, 1,0% de nitrato de gálio.



Figura 4- A: Materiais necessários para experimentação. B: micropipeta monocanal de volume variável (estrela) e medidor de cimento odontológico (seta).



Figura 5- Defeitos experimentais na calvária dos animais, preenchido com material experimental (seta branca) e com coágulo sanguíneo (seta preta).

Os ratos foram marcados para distinguir onde está cada corpo de prova e as incisões foram suturadas com fio de nylon 5.0 por pontos simples e interrompidos.



Figura 6- A: Fio de sutura de nylon monofilamentar 5.0 **B:** Sutura na incisão sagital com pontos simples e interrompidos com fio de nylon 5.0.

Depois da implantação, os animais foram colocados em gaiolas individuais e acompanhados até que se recuperassem da anestesia, sendo observados diariamente para verificação do comportamento com a finalidade de evitar intercorrências que pudessem comprometer o experimento. Os animais permaneceram nesta condição até que se completasse o período de 30 dias de observação (figura 7).



Figura 7- A e B: Animais acondicionados em gaiolas individuais e acomodados em estante ventilada para observação pós-operatória.

Após o período experimental, os animais foram sacrificados na câmara de CO₂ e as peças foram removidas em bloco e imediatamente fixadas em formol a 10% (figura 8).



Figura 8- **A:** Remoção da calvária dos animais para análise microscópica após 30 dias do procedimento operatório. **B:** Peças acondicionadas em formol a 10%.

Cada grupo foi representado por um tipo de material testado com o tempo experimental de 30 dias composto por 6 indivíduos. Destes, 5 animais foram analisados pelo método histológico sob microscopia óptica, enquanto 1 foi submetido a análise ao microscópio eletrônico de varredura.

Duas semanas após a remoção das peças, os tecidos foram totalmente fixados e preparados para iniciar a fase laboratorial. As peças obtidas foram lavadas para retirar o excesso de formol e imersas em solução descalcificante de EDTA-formol (5,5% de EDTA e 4% de formol, em solução aquosa) para remoção da parte mineral das peças ósseas, sendo essa solução foi trocada semanalmente durante 30 dias. Após a desmineralização, as peças foram lavadas novamente para remoção do excesso de EDTA e submetidas à desidratação em concentrações crescentes de álcool (80%, 90%, 95%, e 100%, consecutivamente) e posteriormente diafanizadas em xilol.

Através de um micrótomo, as peças sofreram cortes axiais com 3 µm de espessura, as fitas obtidas nesse corte foram transferidas para um banho-maria, com auxílio de uma pinça, para serem distendidas e colocadas em lâminas de vidro.

As peças foram cortadas e preparadas antes da inclusão em parafina para que no momento da microtomia, ambos os defeitos, controle e o tratado, fossem

cortados na mesma altura. Os cortes obtidos foram colocados em uma estufa a 60° para a desparafinação por aproximadamente 12 horas e coradas com hematoxilina e eosina.

Os mesmos grupos analisados em microscopia óptica foram processados para análise qualitativa sob microscopia eletrônica de varredura a fim de determinar a relação do osso com o material, avaliando-se também a presença e/ou reabsorção do sulfato de cálcio após os 30 dias da experimentação.

Para tanto, duas calotas cranianas foram reduzidas em tamanho com uma broca cirúrgica carbide 701 montada em peça de mão sob abundante irrigação com soro fisiológico 0,9% e desidratadas em bateria ascendente de álcool etílico até a concentração de 100%, sendo levadas a ponto crítico por meio de câmara de gás carbônico.

Depois de desidratadas, as amostras foram posicionadas em suportes metálicos e fixadas com fita dupla-face de carbono, e uma fina camada de tinta à base de prata foi aplicada para auxiliar na condutividade. As amostras foram metalizadas (Figura 9 e 10), sendo então encaminhadas para análise no microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM-6380LV, Tóquio, Japão, Figura 11).



Figura 9 – A e B: Metalização dos espécimes para análise ao microscópio eletrônico de varredura.



Figura 10- Peças metalizadas e montadas para observação em microscopia eletrônica de varredura.

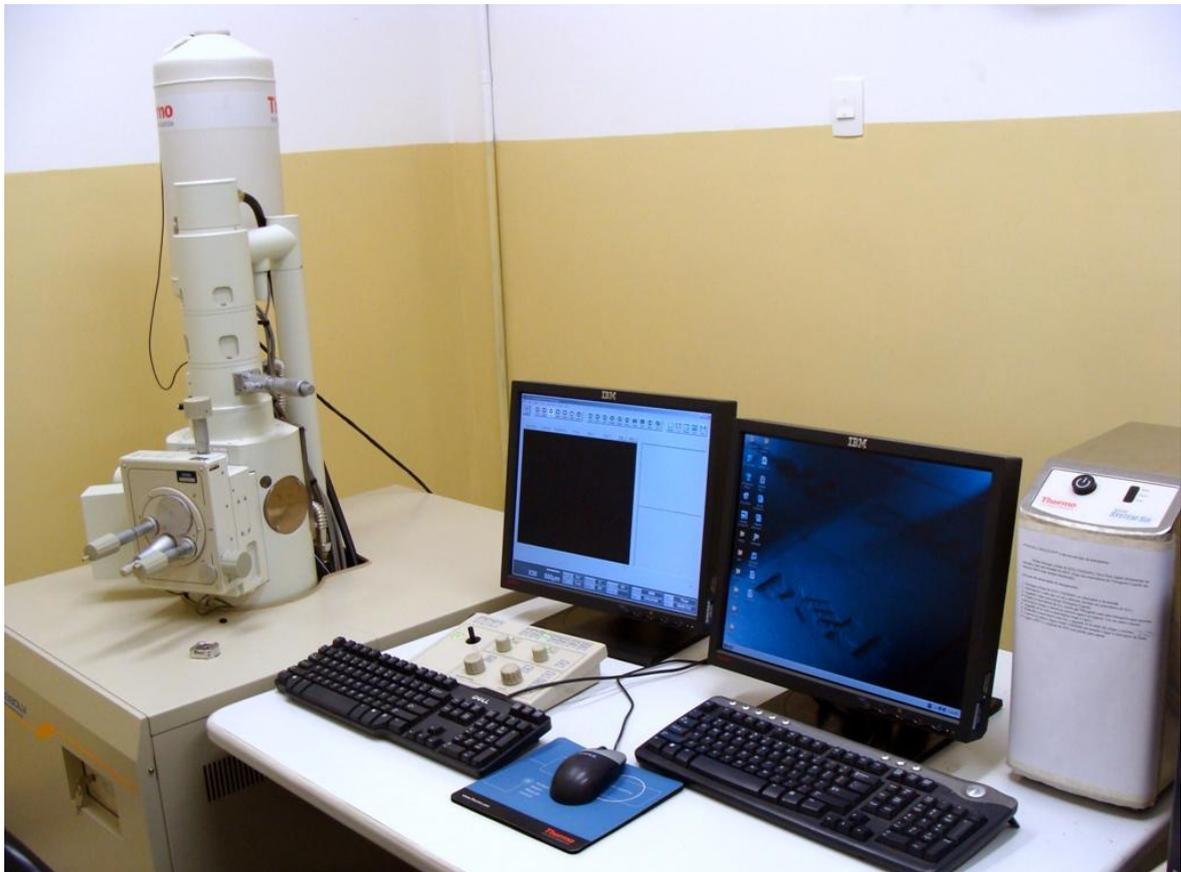


Figura 11 - Análise no microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM-6380LV, Tóquio, Japão da UFMS).

5. RESULTADOS

Tanto para análise qualitativa quanto quantitativa foram utilizadas secções histológicas com 3 μm de espessura, coradas com hematoxilina e eosina. As peças foram cortadas e preparadas antes da inclusão em parafina para que no momento da microtomia, ambos os defeitos, controle e o tratado, fossem cortados na mesma altura.

Análise Histológica Quantitativa

Na análise histomorfométrica as imagens foram capturadas por uma câmera digital MotiC 2.0 acoplada a um microscópio de luz Olympus B45 em um aumento de 50 vezes. Utilizando-se o sistema de análise de imagem MotiC Image Plus 2.0, foi calculada a área de tecido ósseo neoformado nos defeitos controle e tratado dos animais de ambos os grupos experimentais. De acordo com o tempo de experimentação de 30 dias, foi possível observar a diferença entre o tecido ósseo original da calvária e tecido ósseo neoformado com base em características histológicas (figura 12).

O tecido neoformado, na grande maioria dos defeitos, era constituído de tecido ósseo imaturo, com ausência de formação de lamelas e disposição aleatória das lacunas contendo osteócitos jovens, ao passo que o tecido ósseo original era de osso maduro com presença de lamelas, as lacunas contendo os osteócitos estavam organizadas entre as lamelas e eram mais dilatadas do que àquelas do osso neoformado (figura 13).

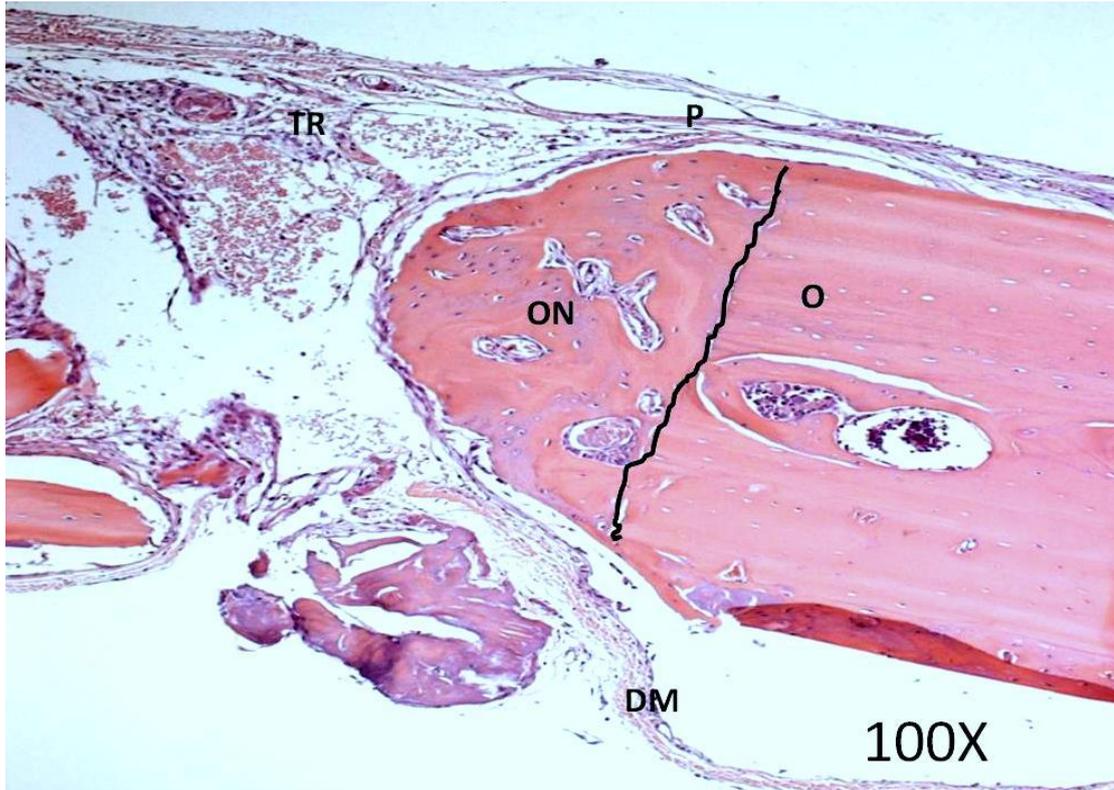


Figura 12- Lâmina histológica do grupo II em aumento de 100x. Linha em negrito demarcando a divisão entre osso antigo (O) e osso neoformado (ON).

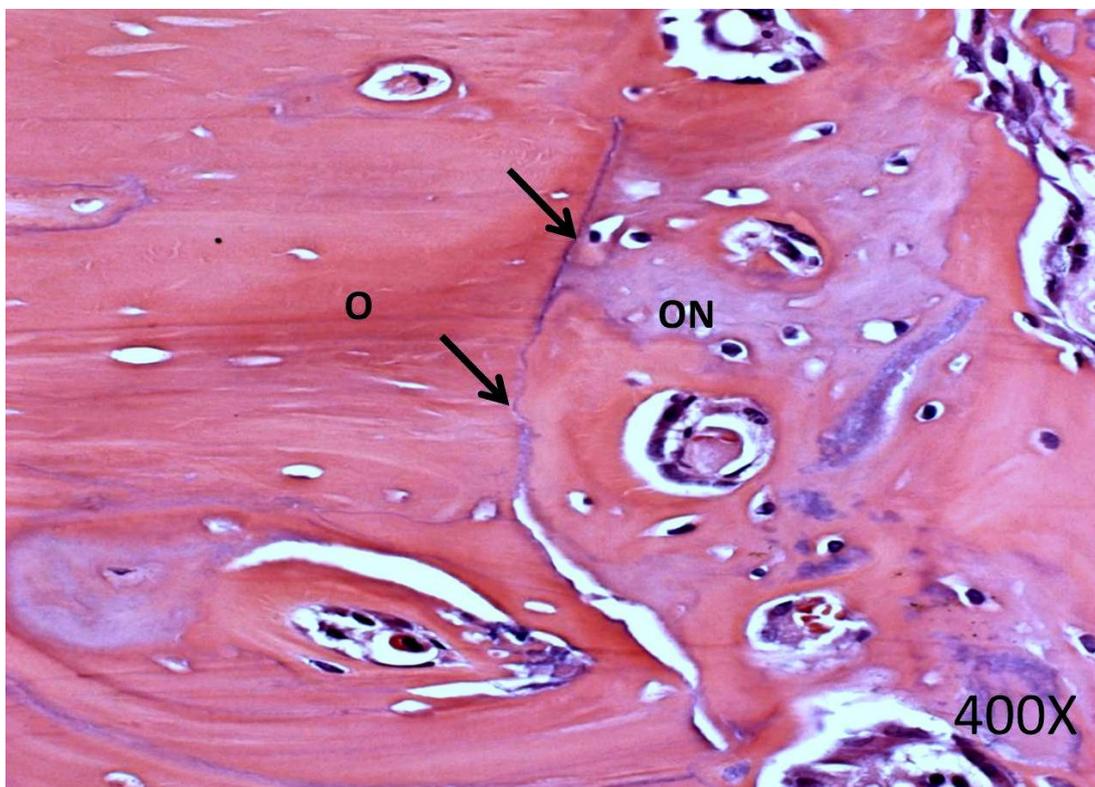


Figura 13- Lâmina histológica do defeito tratado do grupo II com aumento de 400x, onde se pode notar as diferenças entre o osso maduro (O) e o osso neoformado (ON), onde a demarcação está sinalizada (seta).

Além disso, foi observada maior celularidade no osso neoforado do que no osso original, compatível com o maior metabolismo do primeiro em relação ao segundo. Linhas basofílicas cimentantes, que demarcavam a separação entre osso neoforado e osso original também foram consideradas para identificação das áreas a serem demarcadas (figura 14).

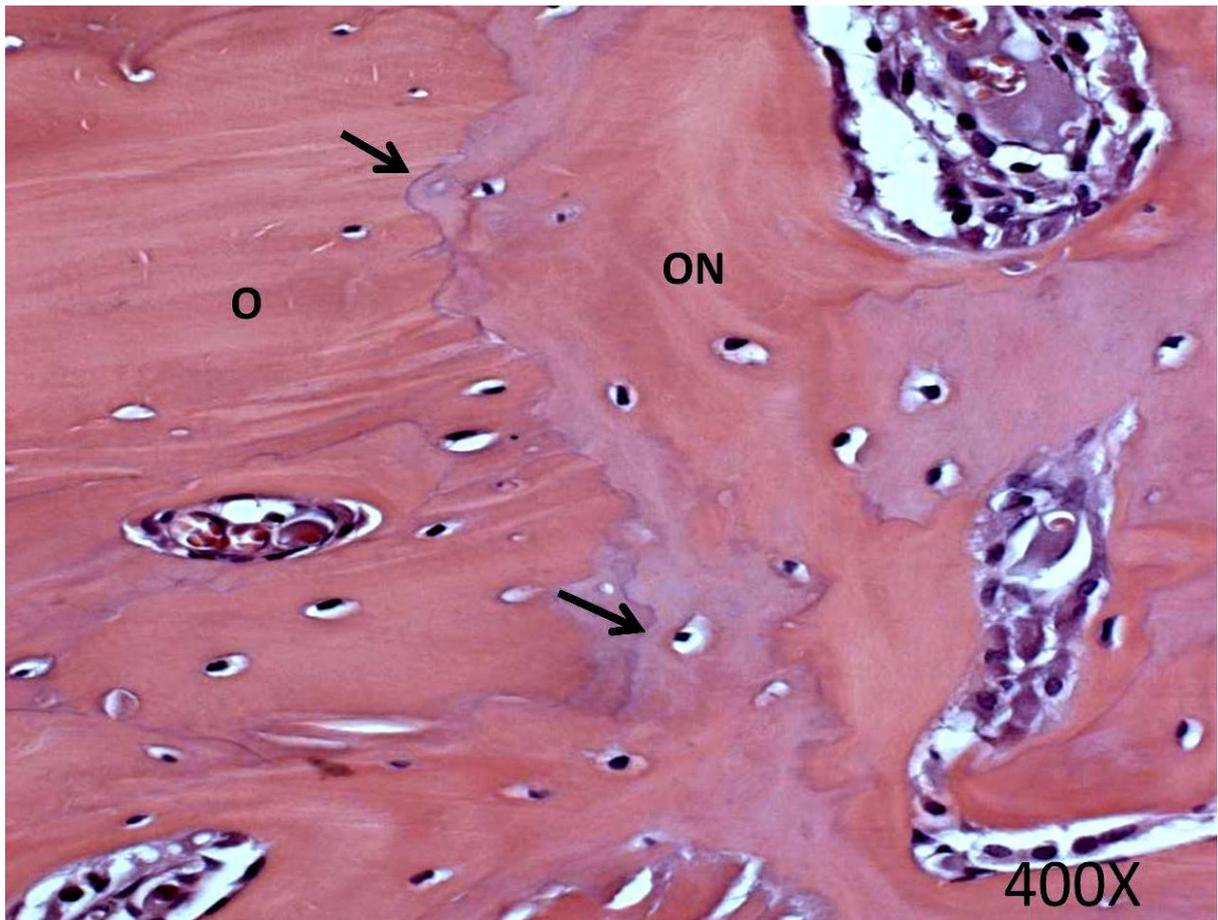


Figura 14- Lâmina histológica do defeito controle do grupo I com aumento de 400x, onde pode-se notar a presença das linhas basofílicas cimentantes (setas).

Para efeitos de padronização da análise histomorfométrica, só foram consideradas as áreas de neoformação óssea que estavam incluídas nas margens dos defeitos e que não ultrapassavam a espessura original da calvária. Isso porque o estímulo inflamatório, induzido pelas manobras cirúrgicas e provavelmente pelos materiais, atinge limites além daqueles da margem cirúrgica, e induz neoformação óssea em outras áreas. Dessa maneira, seria difícil, senão impossível, distinguir as áreas de neoformação óssea originadas em função dos experimentos daquelas que surgiram em função do processo fisiológico de remodelação óssea (figura 15).



Figura 15 – Lâmina histológica do grupo I com aumento de 25x, observe toda a espessura da calvária, local que foi incluído para análise histomorfométrica (setas).

A análise estatística (two-way ANOVA) revelou não haver diferenças significativas entre as áreas de neoformação óssea dos lados controle e experimental ($p=0,522$), bem como entre os tipos de material utilizados no preenchimento do defeito ósseo ($p=0,462$). A Figura 16 apresenta estes resultados sob forma gráfica.

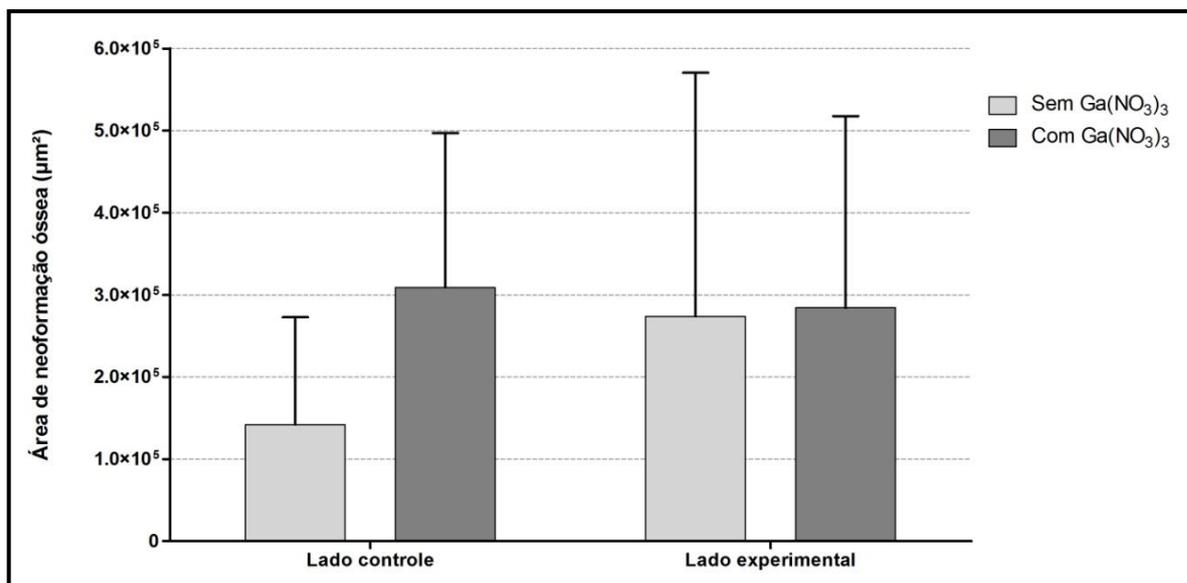


Figura 16- Área média de neoformação óssea dos lados controle e experimental com e sem a utilização de nitrato de gálio.

A análise de poder do teste estatístico utilizado revelou uma probabilidade de detecção de diferenças entre os grupos de apenas 12,5%, sendo que para se obter um valor de poder de 80%, seriam necessários grupos compostos por 40 animais.

Análise histológica qualitativa

Na maioria dos defeitos, tanto tratados quanto controles, de ambos os grupos experimentais, o osso neoformado ficou restrito às margens cirúrgicas (figura 17).

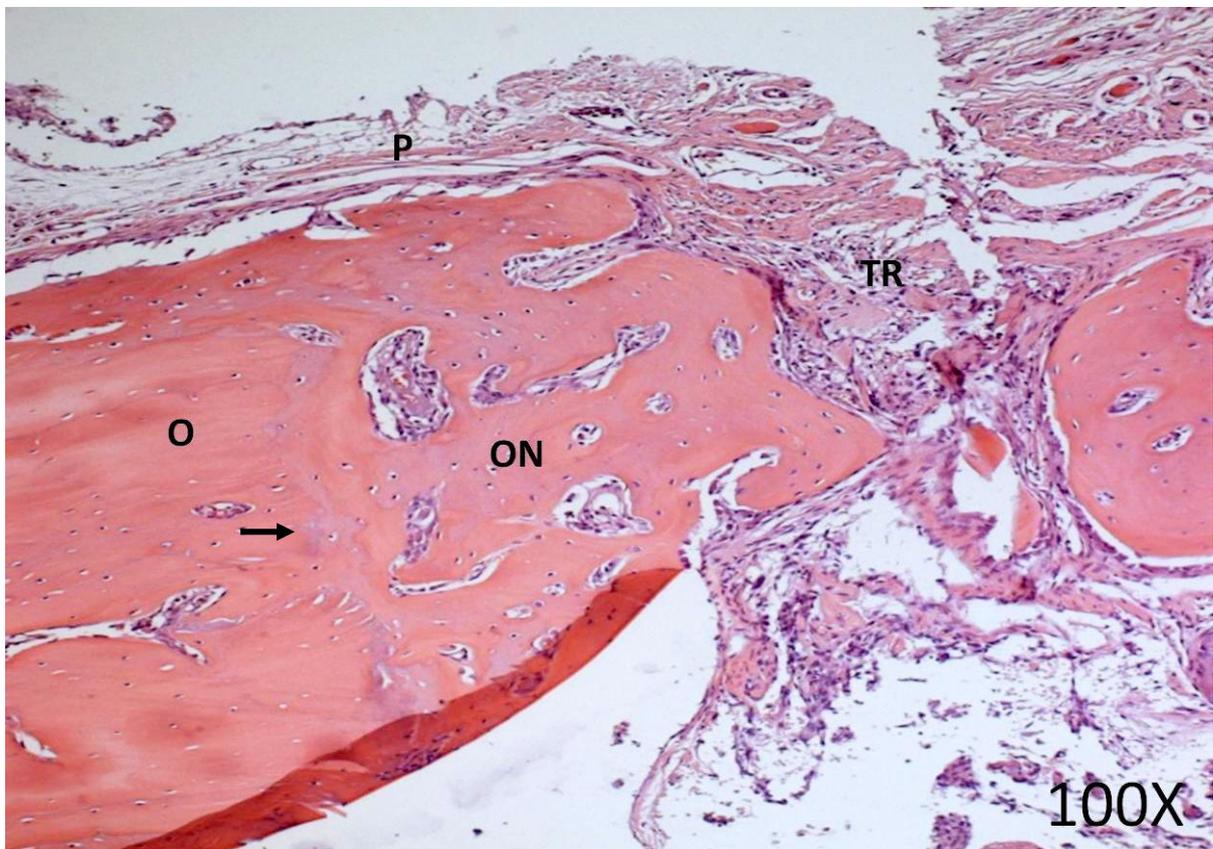


Figura 17 - Lâmina histológica do defeito controle do grupo I em aumento de 100x mostrando osso neoformado restrito às margens cirúrgicas, separação entre osso antigo e osso novo (seta).

Em alguns defeitos foi possível observar trabéculas de osso novas soltas em meio ao tecido mole de reparação que preenchia os defeitos. As áreas de osso neoformado eram representadas por porções de matriz óssea imatura circundadas por osteoblastos e células de revestimento ósseo. Osteoclastos não foram observados de maneira frequente nos cortes histológicos. Somente em um espécime de cada grupo houve grande quantidade de neoformação óssea em

grande parte dos defeitos cirúrgicos, com formação de osso lamelar e haversiano no defeito tratado do grupo dois (figura 18).

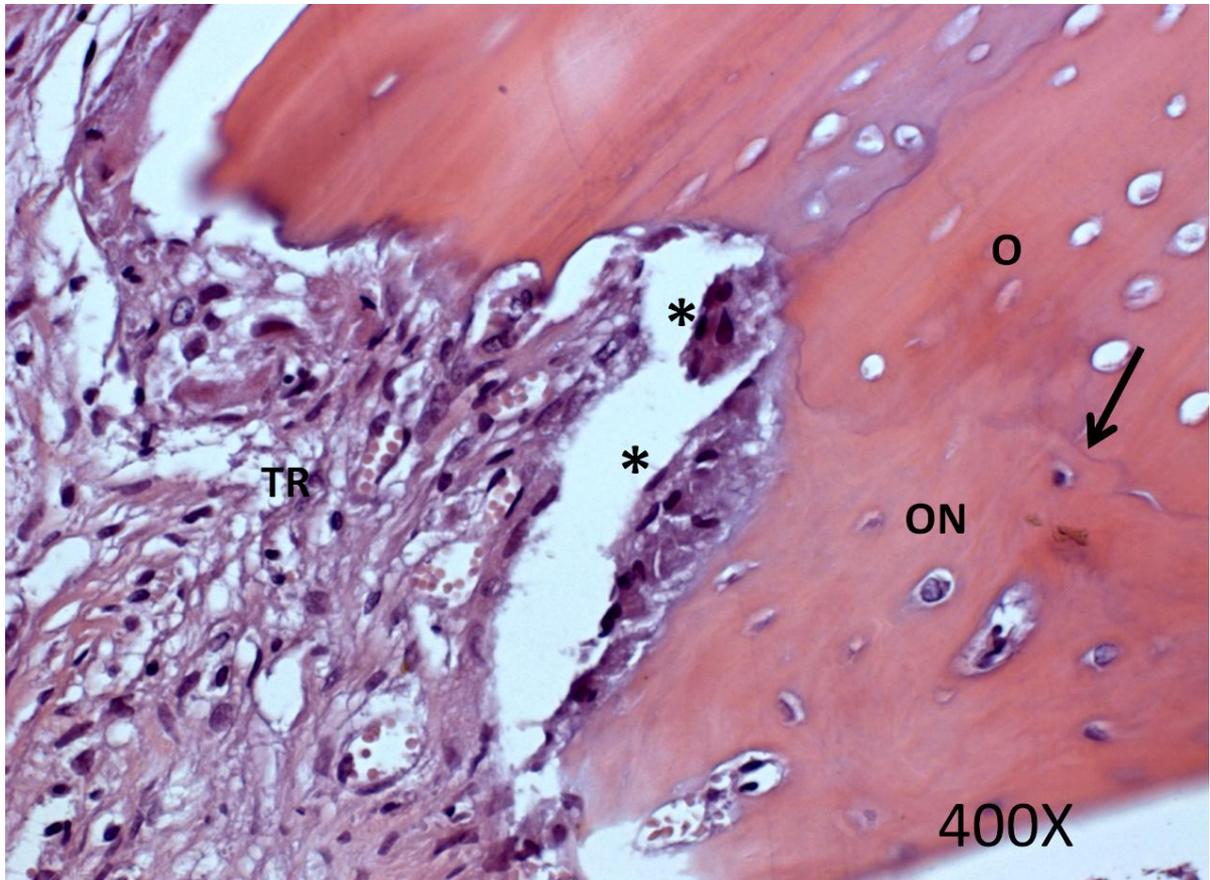


Figura 18- Lâmina histológica do defeito experimental do grupo I em aumento de 400x mostrando tecido de reparação (TR), osteoclastos (asterisco), linha basofílica cimentante (seta), osso antigo (O) e osso neoformado (ON).

O tecido mole de reparação que preenchia a grande maioria dos defeitos, tratados e controles, originava-se tanto do tecido conjuntivo do periósteo quanto daquele constituinte da dura-máter. A constituição e organização deste tecido era a de um tecido de granulação, mostrando grande quantidade de células de núcleo claro e oval compatíveis com fibroblastos e células mesenquimais indiferenciadas; vasos neoformados, muitos deles congestionados; finos feixes colagenosos dispostos frouxamente e discreto infiltrado inflamatório crônico (figura 19).

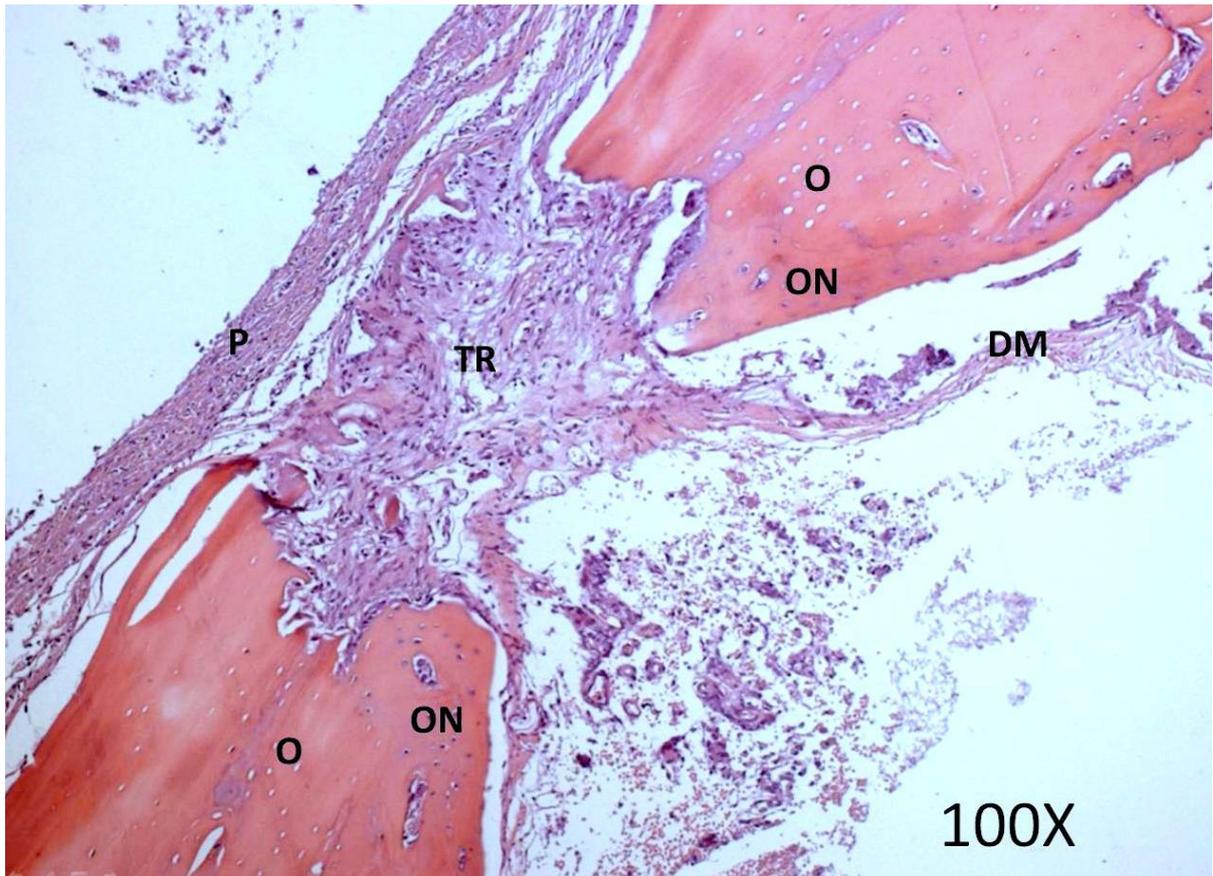


Figura 19- Lâmina histológica do defeito tratado do grupo I em aumento de 100x mostrando periósteo (P), tecido de reparação (TR), osso antigo (O), osso neoformado (ON), dura-máter (DM).

Nos dois espécimes onde houve uma quantidade maior de neoformação óssea, o tecido de granulação era mais maduro, com quantidade reduzida de vasos sanguíneos e maior quantidade de fibras colágenas, que inclusive tinha uma orientação mais definida. Em dois espécimes do grupo um e três do grupo dois foram observadas áreas de hemorragia intersticial nos defeitos cirúrgicos, as vezes relacionadas extravasamento de fibrina (figura 20).

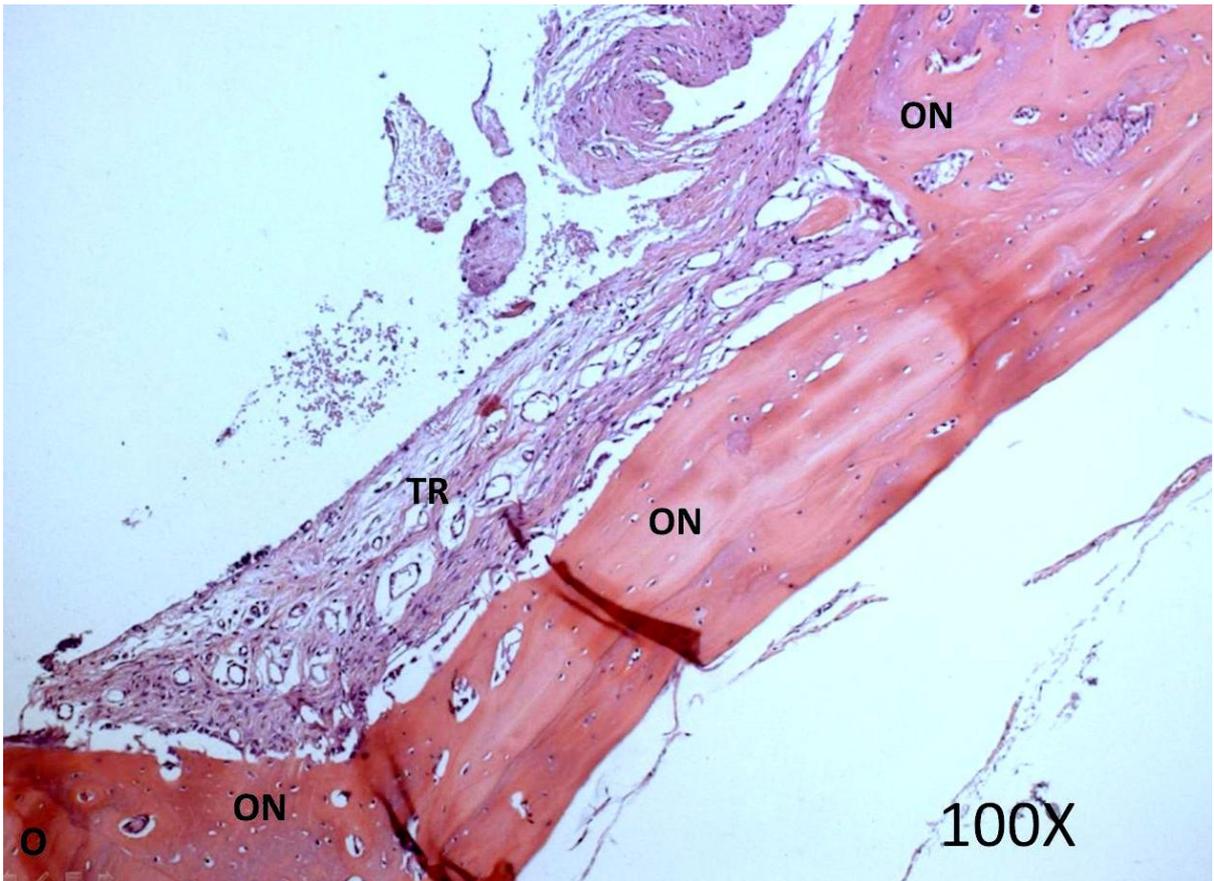


Figura 20- Lâmina histológica do defeito tratado do grupo II mostrando o completo fechamento da loja cirúrgica.

Análise ao microscópio eletrônico de varredura

As Figuras 20 a 31 ilustram os achados encontrados ao exame qualitativo realizado através de microscopia eletrônica de varredura para os dois grupos testados.

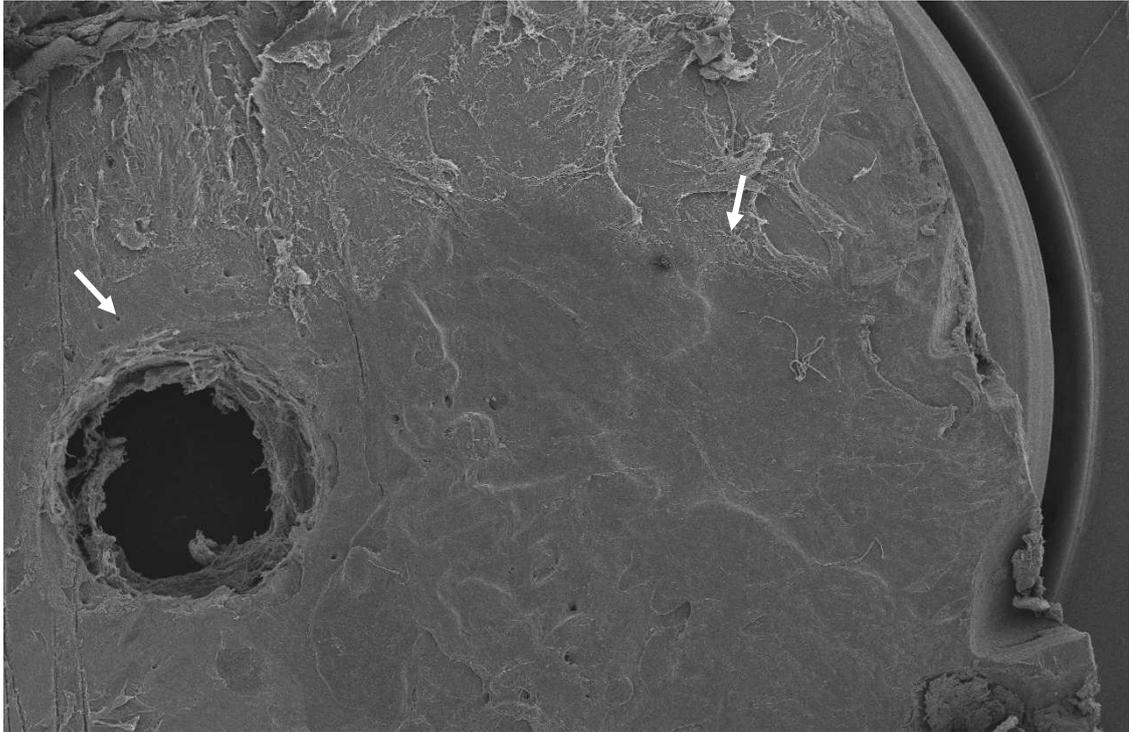


Figura 21- Grupo I observe que enquanto do defeito experimental foi totalmente fechado, o defeito do lado controle apresentava-se aberto (setas). Aumento original de 15x.

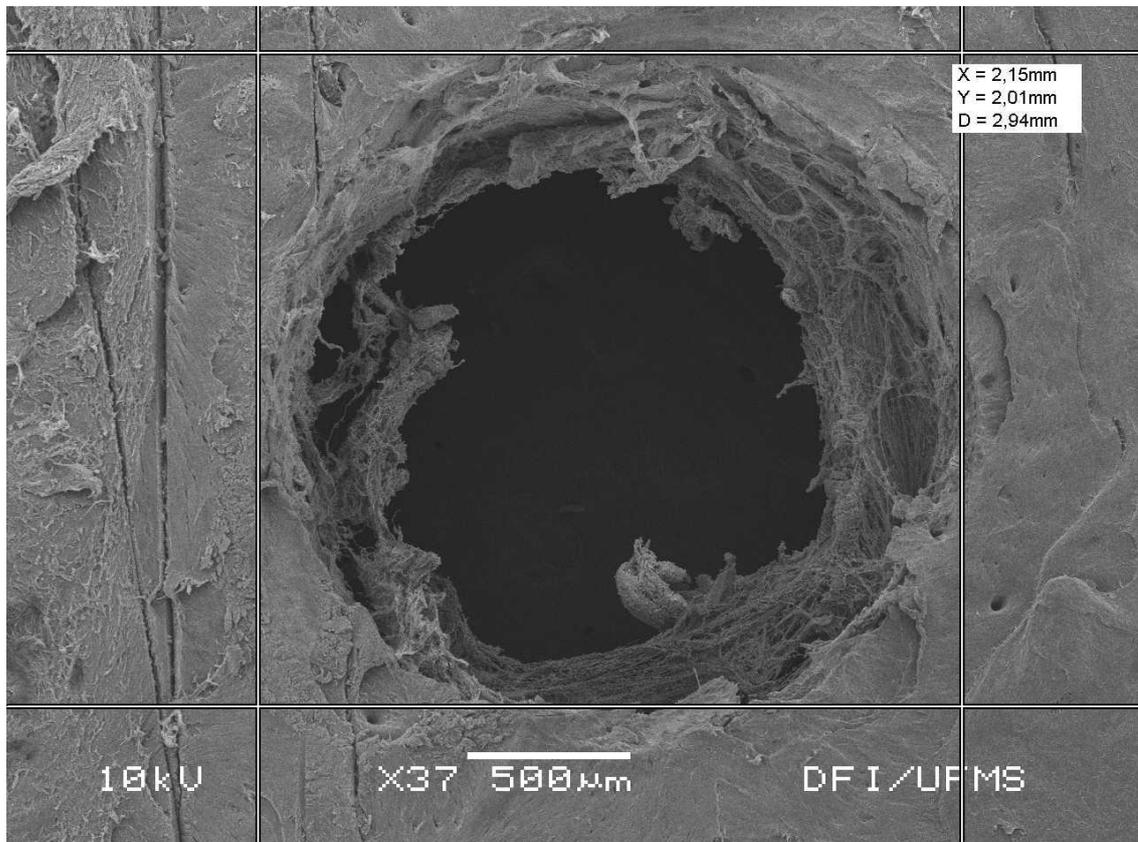


Figura 22- Defeito controle do grupo I, observa-se que o defeito de 2 mm, não apresentava-se cicatrizado. Aumento original de 37x.

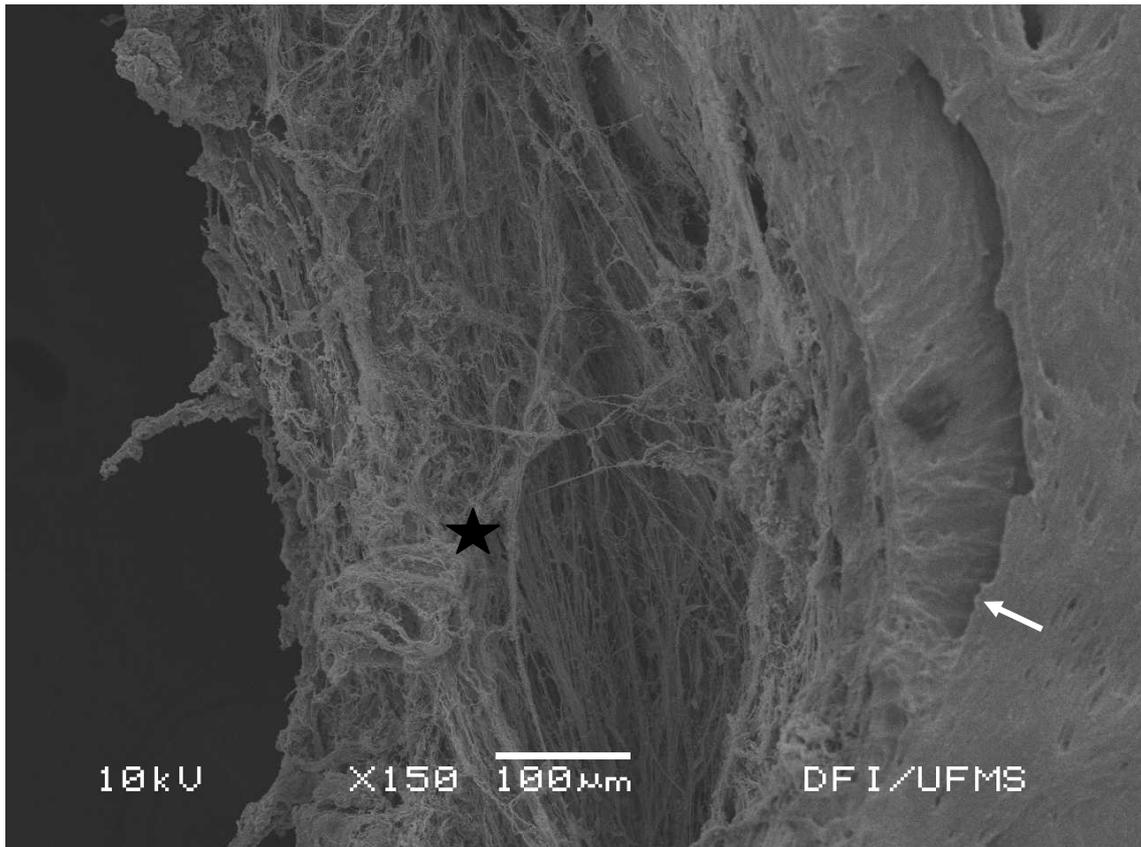


Figura 23- Defeito controle do grupo I. Observa-se a interface entre osso antigo e osso neoformado (seta) e a presença de fibras colágenas (estrela). Aumento original de 150x.

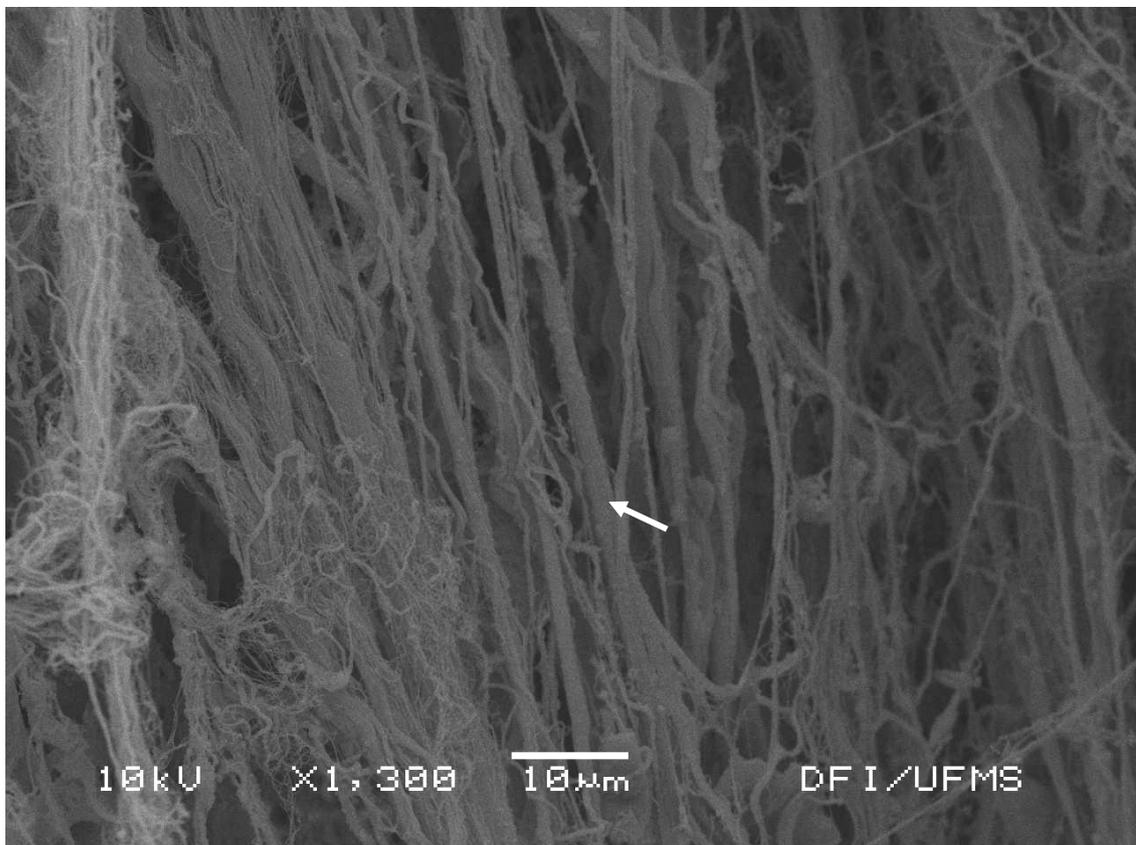


Figura 24- Defeito controle do Grupo I. Observa-se grande quantidade de fibras colágenas participando do processo de reparo ósseo no interior da loja cirúrgica (seta). Aumento original de 1300x.

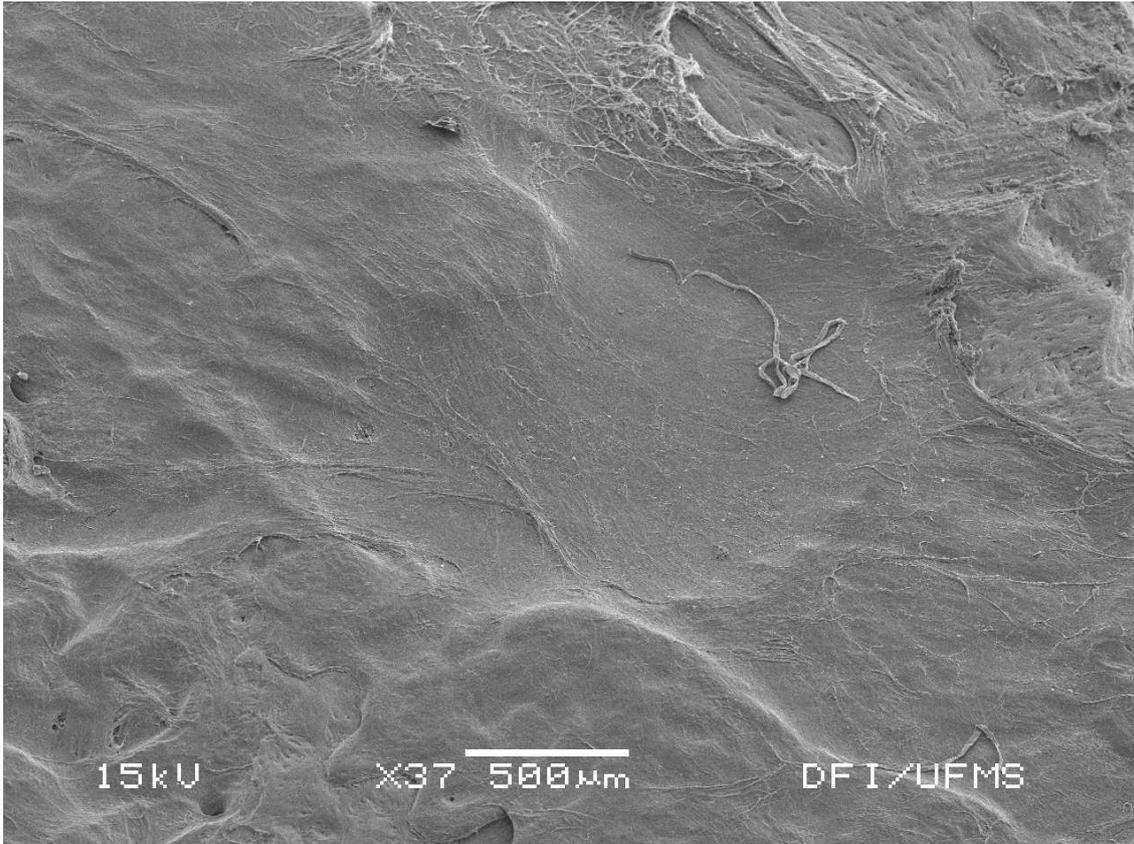


Figura 25- Defeito experimental do grupo I. Observe que o defeito já havia sido totalmente fechado após 30 dias. Aumento original de 37x.

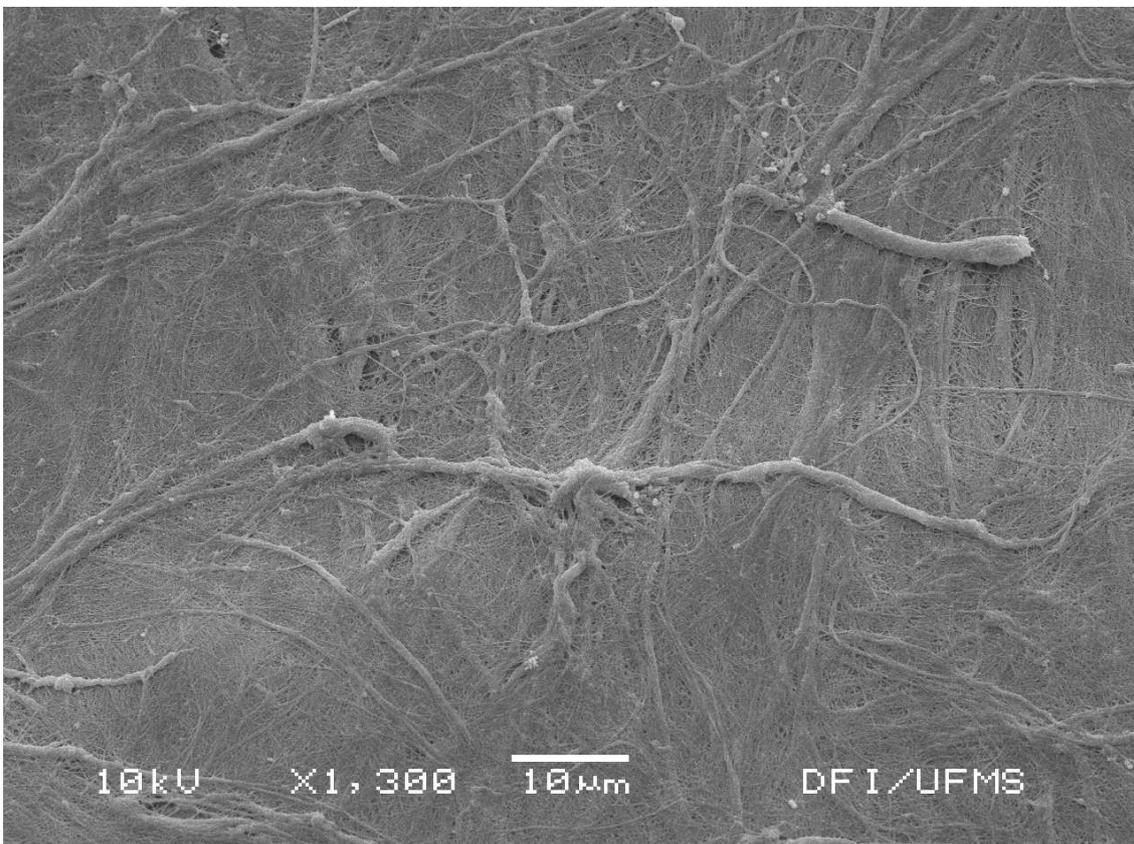


Figura 26- Defeito experimental do grupo I, defeito fechado após 30 dias. Aumento original de 1300x.

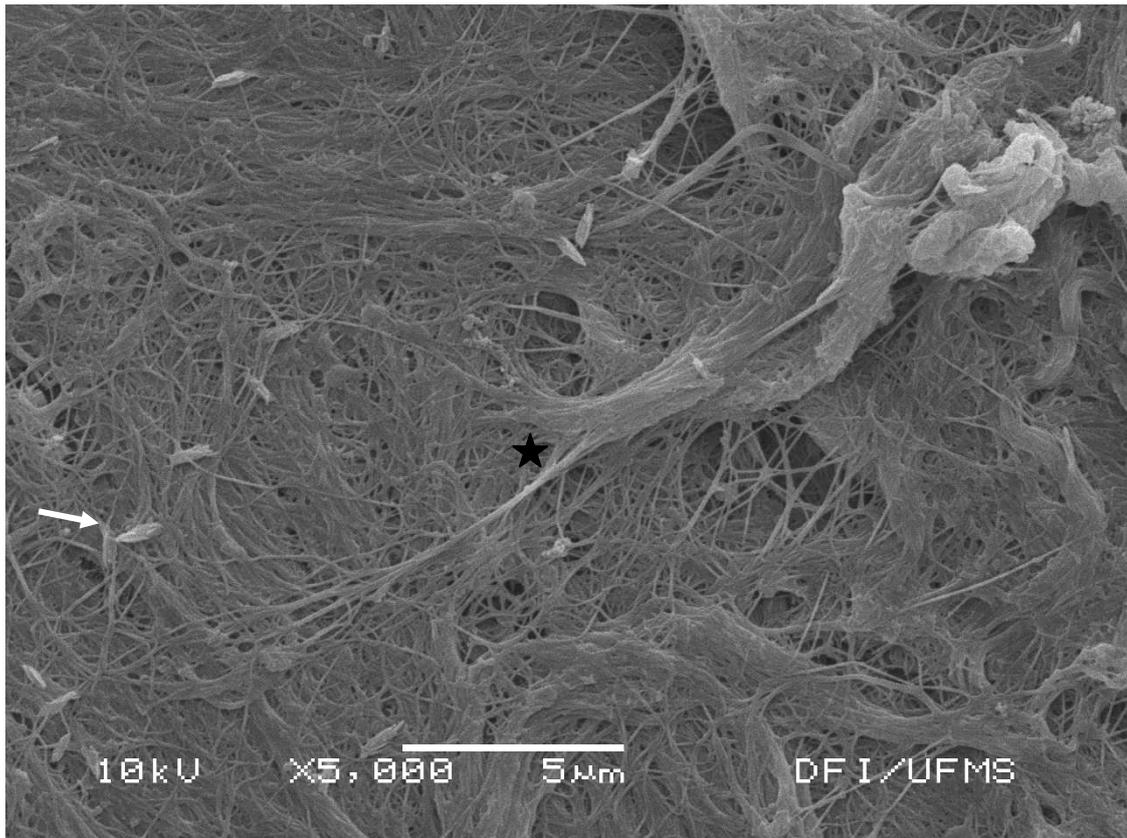


Figura 27- Defeito experimental do grupo I, notar a presença de grânulos de sulfato de cálcio ainda não reabsorvidos (seta), e grande presença de fibras colágenas (estrela). Aumento original de 5000x.

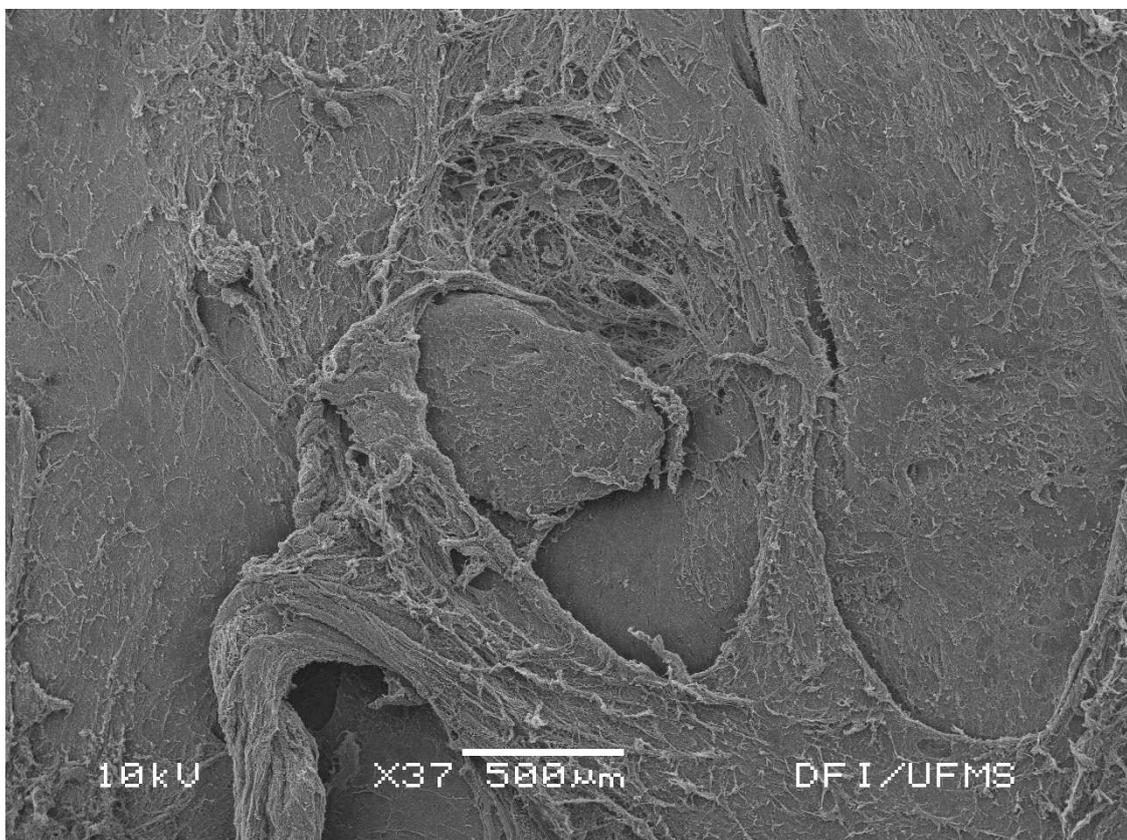


Figura 28- Defeito controle do grupo II apresentando quase totalmente fechado após 30 dias do procedimento cirúrgico. Aumento original de 37x.

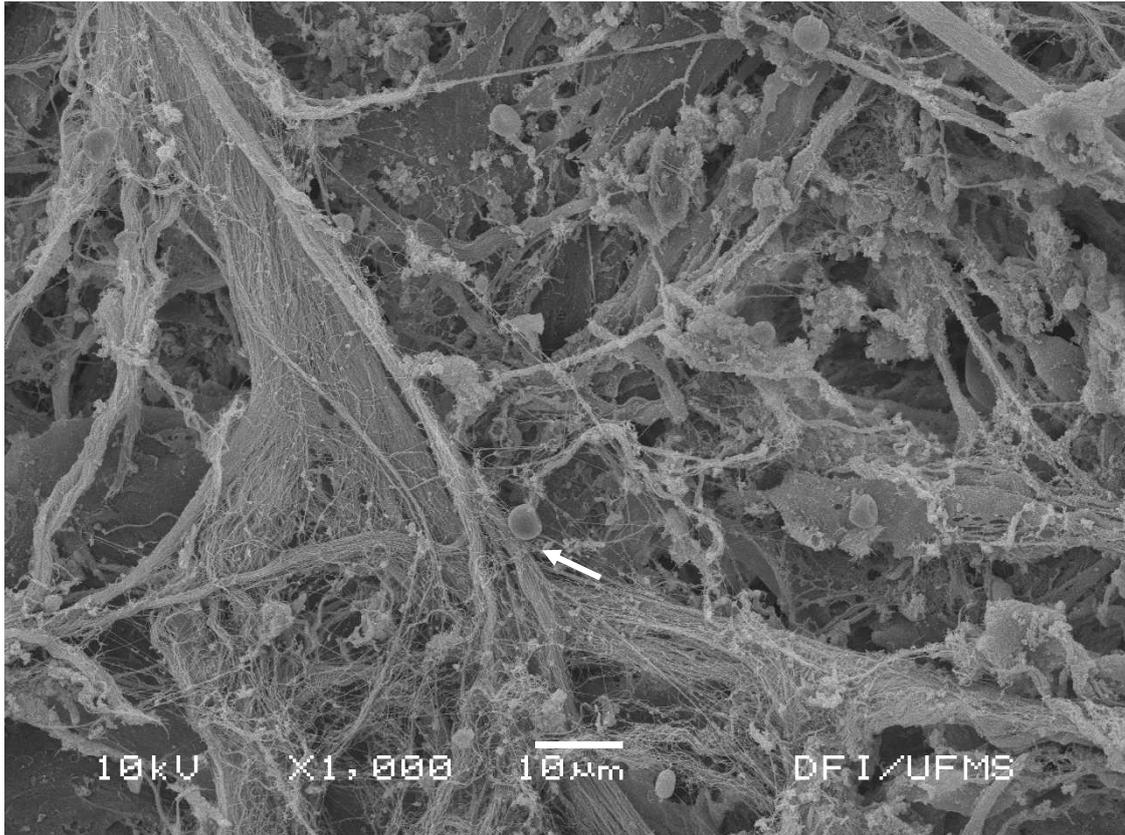


Figura 29- Defeito controle do grupo II, com presença de fibras colágenas e células (seta). Aumento original de 1000x.

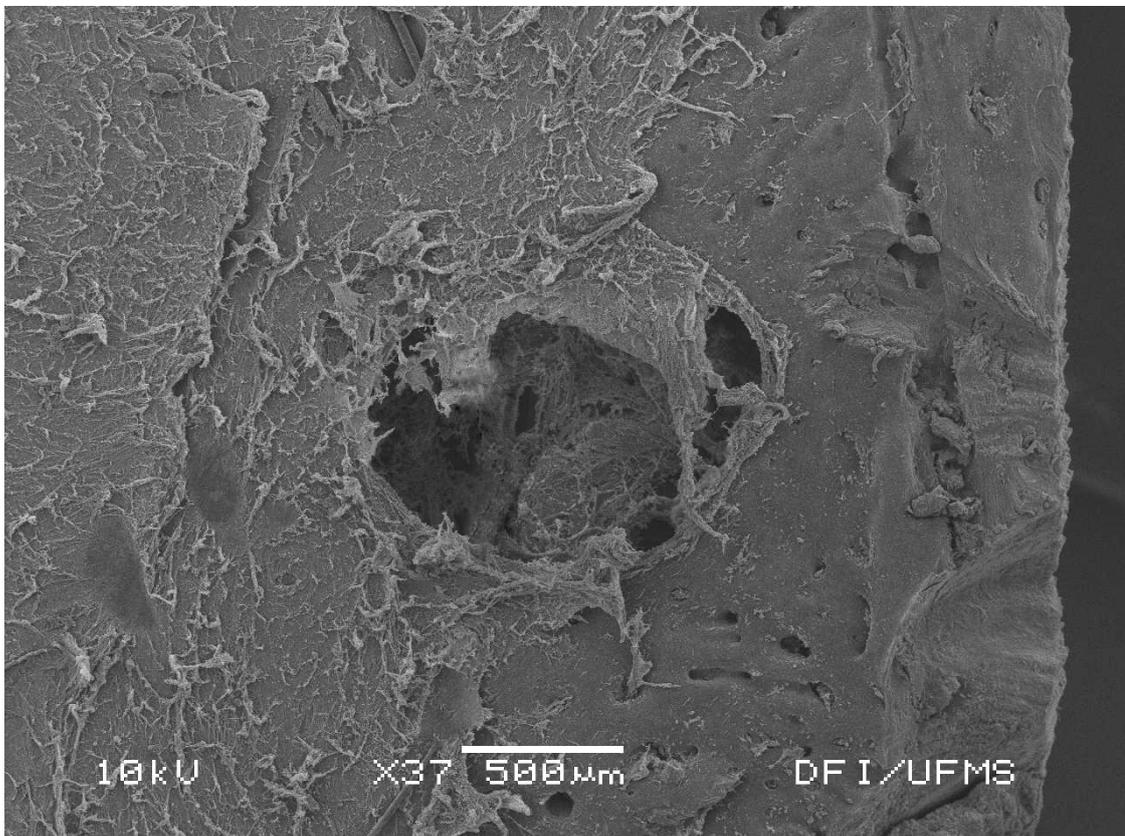


Figura 30- Defeito experimental do grupo II, defeito havia sido parcialmente fechado após 30 dias do procedimento operatório. Aumento original de 37x.

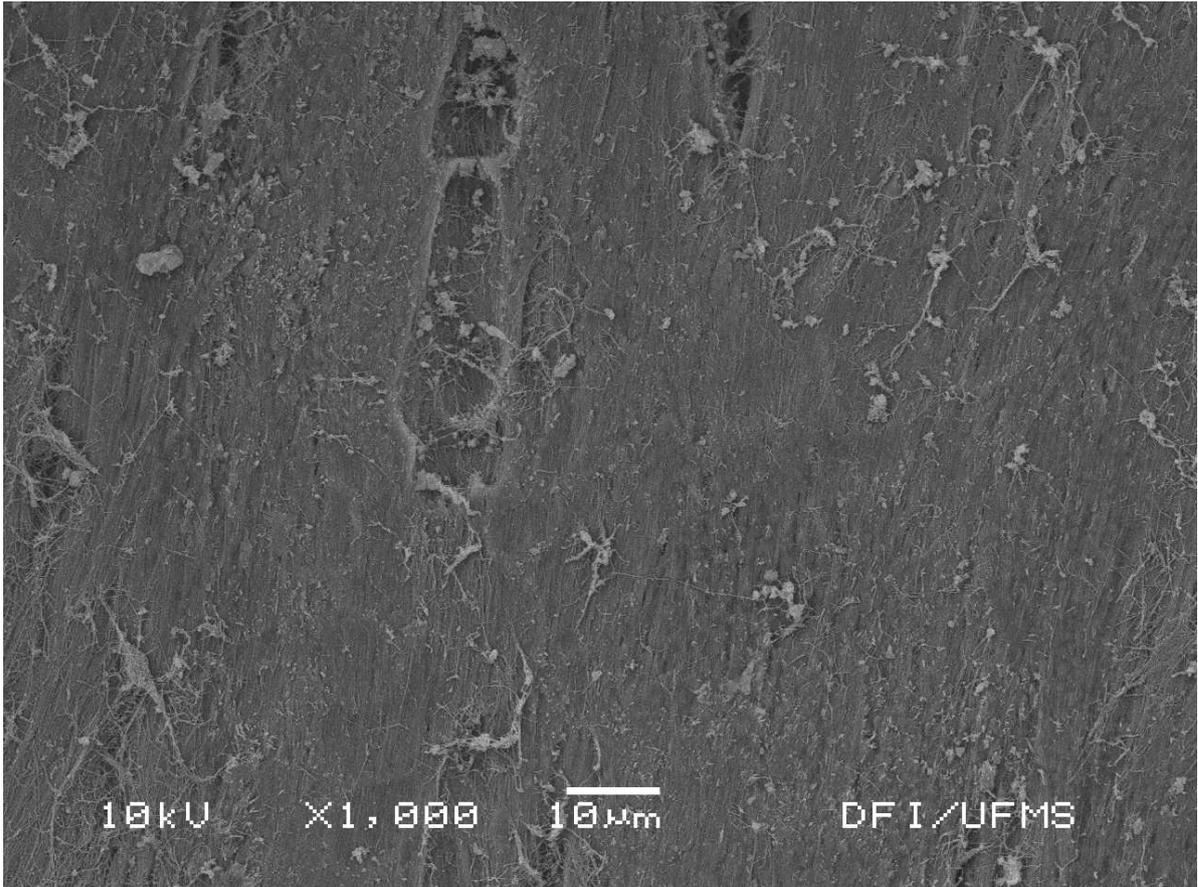


Figura 31- Defeito experimental do grupo II, região onde foi constatada a presença de neoformação óssea. Aumento original de 1000x.

6. DISCUSSÃO

Atualmente inúmeras pesquisas em todo o mundo estão evoluindo e investigando os componentes celulares que influenciam diretamente na osseointegração e na regeneração óssea (CARVALHO, 2009). Muitos materiais orgânicos e sintéticos já foram testados para a substituição óssea, com variado grau de sucesso (ZABEU & MERCADANTE, 2008), polímero de mamona (LEONEL *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2010), calcitonina (SASSIOTO *et al.*, 2004), vidro bioativo (CARLO *et al.*, 2007), hidroxiapatita com nitrato de gálio (MALZAC, 2008), entre outros.

As propriedades desejadas desses biomateriais são a osteocondução, a osteoindução e osteogênese (CHIAPASCO & ROMEU, 2008). Somente o enxerto ósseo autógeno possui tais propriedades, porém a sua principal desvantagem é a necessidade de coleta das áreas doadoras, com aumento de morbidade pós-operatória, ampliação do tempo operatório e de recuperação, sendo por essa razão que as pesquisas clínicas e experimentais têm sido dirigidas para o uso de biomateriais que o substituam (MASTROCINQUE *et al.*, 2006; CHIAPASCO & ROMEU, 2008; CARVALHO, 2009).

O presente estudo avaliou os potenciais osteoindutor e osteocondutor do sulfato de cálcio e do nitrato de gálio *in vivo*.

De acordo com os padrões aceitos para materiais biocompatíveis relatados por Chiapasco & Romeu (2008), deve haver discreta ou nenhuma reação tecidual durante o experimento. Segundo Strocchi *et al.* (2002) entre os substitutos ósseos, o sulfato de cálcio é um biomaterial bem tolerado, biodegradável e osteocondutor. López & Alarcón (2011) relataram que o sulfato de cálcio tem se distinguido de outros biomateriais por ser um dos materiais aloplásticos mais simples e com uma história de mais de cem anos como material sintético, tendo entre suas principais características a capacidade de osteocondução, total absorção e não causar inflamação ou reações antigênicas. Os resultados encontrados no presente estudo corroboram o relato destes autores, com ausência de reação de corpo estranho em todos os grupos testados, tanto do ponto de vista clínico como histológico. No entanto, López & Alarcón (2001) relatam também que diferenças na morfologia e na estrutura dos cristais, porosidade, propriedades mecânicas e de constituição química

de sulfato de cálcio podem alterar significativamente as suas propriedades biológicas.

De acordo com Frota (2006), resultados de reação a corpo estranho podem ser evidenciados histologicamente devido à permeabilidade do tecido conjuntivo entre os grânulos do material implantado, o que confere um aspecto reticular, menos evidente aos 30 dias, sem que isto tenha promovido algum tipo de reação tecidual. O tecido neoformado após 30 dias, na grande maioria dos defeitos ósseos experimentais produzidos neste estudo, era constituído de tecido ósseo imaturo, com ausência de formação de lamelas e disposição aleatória das lacunas contendo osteócitos jovens, sem presença de infiltrado inflamatório extenso ou reações de corpo estranho que pudessem interferir no reparo tecidual.

O osso parietal é formado por uma placa que apresenta corticais externa e interna compactas, relativamente espessas, com faixa intermediária estreita de osso medular e ossificação intramembranosa (FROTA, 2006). No presente estudo utilizou-se a calota craniana de ratos adultos da linhagem Wistar, visando um modelo experimental pareado, sem efeitos indesejáveis entre os grupos experimentais e o controle. O osso e a área operada são de fácil manuseio e acesso, agregando os benefícios de possuírem osso com reparo semelhante aos maxilares.

De acordo com Strocchi *et al.* (2002), os sítios cirúrgicos tratados com sulfato de cálcio apresentam maior formação de vasos sanguíneos quando comparado a outros tratamentos experimentais, o que pode ajudar a esclarecer os bons resultados encontrados neste experimento e corroborados pela literatura.

Do ponto de vista clínico, Trevisan-Júnior *et al.* (2006) relataram que a combinação de membrana não reabsorvível recobrimo sulfato de cálcio associado ao enxerto ósseo é uma alternativa altamente efetiva e viável para correção de defeitos ósseos periodontais. Dasmah, *et al.* (2012) realizaram um estudo onde demonstraram que após a elevação do seio maxilar com sulfato de cálcio, ocorreu uma neoformação óssea satisfatória para reabilitação com implantes dentários e após a instalação de 40 implantes, houve um índice de sucesso clínico em 97,5% dos casos após um ano de controle pós-operatório. Já Pettinicchio *et al.* (2012) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar histológica e ultra-estruturalmente o osso formado no seio maxilar humano em procedimentos de elevação de assoalho com sulfato de cálcio, concluindo a elevada biocompatibilidade e taxa de reabsorção

rápida do sulfato de cálcio. Nesse estudo também foi confirmada a rápida reabsorção do sulfato de cálcio analisada ao MEV após trinta dias da realização do experimento. Toloue *et al.* (2011) realizaram um estudo demonstrando que o sulfato de cálcio é tão eficiente quanto o osso bovino liofilizado na manutenção do alvéolo dentário após exodontias em regiões não-molares, confirmando que clinicamente o sulfato de cálcio pode ser usado em humanos com resultados clínicos satisfatórios. Corroborando com os estudos mencionados, no grupo I do presente estudo, notou-se uma tendência à maior neoformação óssea no lado tratado com sulfato de cálcio em comparação ao lado controle (com coágulo sanguíneo), porém a diferença não se mostrou estatisticamente significativa devido ao número reduzido de animais utilizados neste estudo (5 por grupo), que determinou um poder de apenas 12,5% da análise estatística.

Furlaneto *et al.* (2007) realizaram um estudo com o objetivo de analisar histologicamente a influência sobre a cicatrização óssea do vidro bioativo com ou sem barreira de sulfato de cálcio em defeitos de tamanho crítico criados cirurgicamente na calvária de 48 ratos. Concluíram que nenhum defeito foi regenerado completamente com osso, sendo que foram observadas partículas de vidro bioativo em ambos os períodos da análise, não havendo diferença significativa na quantidade de formação óssea observada entre os diferentes grupos. Igualmente o que ocorreu no trabalho de Furlaneto *et al.* (2007), no presente estudo também não houve regeneração completa em nenhuma lâmina histológica analisada ao microscópio óptico após 30 dias do procedimento cirúrgico e também não houve diferença estatisticamente significativa na quantidade de osso neoformado comparando os diferentes grupos experimentais .

Após 30 dias do procedimento cirúrgico, o sulfato de cálcio apresentou uma reabsorção quase completa, observando-se apenas alguns cristais desse material na análise ao MEV. A literatura traz relatos semelhantes, confirmando a natureza biodegradável deste material e sua substituição por osso (ALEXANDER *et al.*, 2001; STROCCHI *et al.*, 2002; ZABEU & MERCADANTE, 2008; LÓPEZ & ALARCÓN, 2011; DASMAH *et al.*, 2012; PETTINICCHIO *et al.*, 2012). Esta característica, teoricamente, poderia ser utilizada em favor de uma liberação lenta e controlada de um agente anti-reabsortivo e osteindutor que favorecesse o reparo da loja cirúrgica, no presente experimento, utilizamos como este agente o nitrato de gálio.

O gálio foi utilizado na medicina como agente anti-neoplásico sendo descoberto acidentalmente. Sua administração diminuía a reabsorção óssea em casos de hipercalcemias decorrentes de câncer e doença de Paget. Segundo as teorias mais aceitas, isto se dá devido à sua ação da inibição osteoclástica e estimulação de osteoblastos, favorecendo a neoformação óssea. Em 1999, Bernstein relatou que o gálio concentra-se principalmente em lugares onde exista a presença de inflamação e/ou infecção com alta atividade osteoblástica. Esse efeito anti-reabsortivo e osteoindutor do gálio associado as propriedades osteocondutoras do sulfato de cálcio seriam interessantes para a cicatrização óssea de feridas cirúrgicas e patológicas, pois tratam-se de locais com alta atividade osteoblástica, o que poderia favorecer o efeito osteoindutor do gálio.

O mecanismo pelo qual o gálio corrige a hipercalcemia ainda não está totalmente compreendido. Para investigar tal mecanismo, Rokita *et al.* (2001) realizaram em estudo usando fluorescência de raios-x e relataram que o gálio está depositado em componentes orgânico e inorgânico da célula. O acúmulo do elemento na matriz orgânica indicou que o mecanismo de ação do gálio é provavelmente mais complexo do que sugerido pela mera incorporação do íon dentro da rede cristalina. Outros estudos demonstraram inúmeros efeitos do gálio, como a inibição dos osteoclastos, estimulação da neoformação óssea e alteração das propriedades e composição mineral do osso e, além disso, o nitrato de gálio não é uma substância citotóxica para as células ósseas (MALZAC, 2008). No presente estudo, o nitrato de gálio apresentou-se histologicamente biocompatível sem induzir reação inflamatória extensa que comprometesse o processo de cicatrização.

Dentre os compostos moleculares com gálio tem se destacado a sua forma em nitrato, sendo que para alguns autores, o tratamento com nitrato de gálio, mesmo em curto prazo, causa aumento nos teores de cálcio e fósforo nos ossos, gerando uma resposta óssea favorecendo a sua densidade, dificultando assim sua reabsorção (MELNIKOV *et al.*, 2008) acumulando-se principalmente em regiões com alta atividade osteoblástica (JENIS *et al.*, 1993). Optamos pelo nitrato de gálio a 1% em peso como agente osteoindutor e anti-reabsortivo pelos ótimos resultados desse biomaterial relatados na literatura.

O uso do nitrato de gálio também vem sendo estudado quanto a diminuição da reabsorção dentinária. De acordo com Liewehr *et al.* (1995) o tratamento com bisfosfonatos ou nitrato de gálio pode ser útil para evitar ou pelo menos adiar a

reabsorção por substituição em dentes avulsionados. Porém Mori *et al.* (2007) relataram que o nitrato de gálio diminui a reabsorção dentinária mas não impede sua ocorrência, fato este semelhante ao que ocorre com a pasta de hidróxido de cálcio. Essa propriedade anti-reabsortiva seria extremamente interessante para o reparo ósseo em regiões dênulas, como cistos periapicais, bolsas periodontais extensas e em reabilitações orais com implantes dentários. Contudo, Mori *et al.* (2006) relataram após um estudo com 20 incisivos de ratos que tiveram os dentes reimplantados tardiamente, que houve a formação de bolsa periodontal em todos os espécimes aos 60 dias, indicando a ausência de reparo, desaconselhando então, o uso do nitrato de gálio para o tratamento de superfície de dentes reimplantados tardiamente, fato semelhante ocorre com todos os biomateriais disponíveis no mercado atualmente.

Malzac (2008) realizou um estudo onde foi incorporado o nitrato de gálio em cristais de hidroxiapatita com o intuito de avaliar sua utilidade *in vivo* nas áreas de ortopedia e traumatologia e concluíram que a hidroxiapatita dopada pelo gálio não apresenta citotoxicidade e relatou sua possível utilização para melhorar a osteossíntese e retenção de cálcio *in loco*. O presente trabalho avaliou o gálio do ponto de vista experimental como auxiliar no reparo ósseo, e os resultados demonstraram que o lado controle do grupo II (sulfato de cálcio associado ao nitrato de gálio), apresentou uma área de neoformação óssea maior quando comparado ao lado controle do grupo I (sulfato de cálcio), porém essa diferença não foi estatisticamente significante devido ao número de animais utilizados na pesquisa. Essa diferença na neoformação óssea poderia ser explicada por um efeito sistêmico de osteoindução em áreas de alta atividade osteoblástica, mediada pela atividade do nitrato de gálio, contudo estudos adicionais devem ser realizados para melhor demonstrar e/ou confirmar essa observação.

7. CONCLUSÕES

Dentro dos propósitos desse trabalho podemos concluir que:

- 1- O sulfato de cálcio foi quase totalmente reabsorvido após o período de 30 dias em ambos os grupos experimentais, sendo considerado um bom veículo para a implantação *in loco* do nitrato de gálio;
- 2- Histologicamente pode ser constatado que ambos os biomateriais mostraram-se biocompatíveis, sem induzir reação inflamatória extensa que compromettesse o processo de cicatrização;
- 3- O nitrato de gálio apresentou indícios de ação sistêmica mesmo em uso local, contudo mais estudos devem ser realizados para melhor demonstrar o poder anti-reabsortivo e osteoindutor do nitrato de gálio associado a biomateriais para preenchimento ósseo.

REFERÊNCIAS

1. Alexander DI, Manson NA, Mitchell MJ. Efficacy of calcium sulfate plus decompression bone in lumbar and lumbosacral spinal fusion: preliminary results in 40 patients. *Can J Surg.* 2001; 44(4): 262-6.
2. Almeida JM, Santos MR, Fernandes LA, Theodoro LH, Garcia VG. Estudo histomorfométrico do processo de cicatrização óssea em defeitos cirúrgicos de tamanho crítico em calvárias de ratos preenchidos com polímero de mamona. *Rev Odontol Araçatuba.* 2010; 31(01): 22-27.
3. Arisawa EAL, Rocha RF, Carvalho YR, Moraes E, Almeida JD. Influência da calcitonina na reparação óssea de tíbias de ratas ovariectomizadas. Pós-Grad *Rev Fac Odontol São José dos Campos.* 2000; 3(1): 54-59.
4. Bauer T, Muschler GF. Bone Graft Materials. *Clinical Orthopedics and Related Research.* 2000; 371: 10-27.
5. Bernstein LR. Mechanisms of therapeutic activity for gallium. *Pharmacol Rev.* 1998; 50: 665-72.
6. Bockman RS, Repo MA, Warrell RP Jr., Pounds J G, Schidlovsky G, Gordon B M, Jones KW. Distribution of trace levels of therapeutic gallium in bone as mapped by synchrotron x-ray microscopy. *Proc Nati Acad Sci.* 1990; 87: 149-53.
7. Bockman RS, Wilhelm F, Siris E, Singer F, Chausmer A, Bitton R, Kotler J, Bosco BJ, Eyre DR, Levenson D. A multicenter trial of low dose gallium nitrate in patients with advanced Paget's disease of bone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80(2): 595-602.
8. Bockman R. The effects of gallium nitrate on bone resorption. *Semin Oncol.* 2003; 30: 5-12.

9. Carlo EC, Borges APB, Rezende CMF, Moreira JCL, Fonseca CC, Pontes KCS, Duarte TS. Avaliação do efeito osteoindutor da hidroxiapatita e do biovidro implantados em tecido subcutâneo de cão. *Rev Ceres*. 2007; 54(316): 492-500.
10. Carvalho PSP. Osseointegração - 20 anos Visão contemporânea da implantodontia. São Paulo: Editora Quintessence; 2009.
11. Chiapasco M, Romeo E. Reabilitação com prótese implantossuportada para casos complexos. São Paulo: Editora Santos; 2008.
12. Costa AM, Kobayashi GS, Bueno DF, Martins MT, Ferreira MC, Passos-Bueno Alonso N. An experimental model for the study of craniofacial deformities. *Act Cir Bras*. 2010; 25 (3): 264-268.
13. Cruz GA, Sallum EA, Toledo S. Estudo da morfologia de diferentes substitutos ósseos por meio de microscopia eletrônica de varredura. *Rev Periodontia*. 2005; 3(15): 21-28.
14. Dasmah A, Hallman M, Sennerby L, Rasmusson L. A clinical and histological case series study on calcium sulfate for maxillary sinus floor augmentation and delayed placement of dental implants. *Clinical implant dentistry and related research*. 2012; 14(2): 259-265.
15. Davies JE, Hosseini MM, Oprea WE, Karp JM. Effect of platelet releasate on bone cell migration and recruitment in vitro. *J Craniofac Surg*. 2003; 14(3): 292-300.
16. Duarte da Silva AB, Rodrigues L, Jorgetti W, Besteiro JM, Ferreira MC, Gonçalves CG, dos Reis LM. Histological alterations in homogenous bone graft with two techniques of preparation and storage. *Acta Cir Bras*. 2000; 15 (3): 74-77.
17. Enlow DH, Hans MG. Noções básicas sobre crescimento facial. São Paulo: Editora Santos; 1998.
18. Freitas Leonel EC, Andrade Sobrinho J, Oliveira Ramalho LT, Porciúncula HF, Mangilli PD, A Rapoport. A ação do polímero de mamona durante a neoformação óssea. *Acta Cir Bras [serial online]*. 2004;19(4).

19. Frota R. Estudo da radiopacidade e avaliação morfológica da reparação óssea utilizando-se β -tricálcio fosfato e polímero de mamona como implantes [Tese]. Camaragibe: Universidade de Pernambuco; 2006.
20. Furlaneto FAC, Nagata MJH, Fucini SE, Deliberador TM, Okamoto T, Messoria MR. Bone healing in critical-size defects treated with bioactive glass/calcium sulfate: A histologic and histometric study in rat calvaria. Clin Oral Impl Res. 2007; 18: 311-318.
21. Guimarães KB, Vasconcelos BCE, Júnior FAL, Sousa FC, Andrade ESS, Vasconcelos RJH. Histomorphometric evaluation of calcium phosphate bone grafts on bone repair. Braz J Otorhinolaryngol. 2011; 77(4): 447-454.
22. Jenis LG, Waud CE, Stein GS. Effect of gallium nitrate *in vitro* and in normal rats. J Cell. Biochem. 1993; 52: 330-336.
23. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica, 10.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2004.
24. Kuabara MR, Vasconcelos RW, Carvalho PSP. Técnicas Cirúrgicas para obtenção de enxerto ósseo autógeno. Rev Fac de Odonto de Lins. 2000; 12(2): 44-51.
25. Kussano LS, Furlaneto FAC, Messoria MR, Deliberador TM, Nagata MJH. Cicatrização óssea em calvária de ratos com faixas etárias distintas: estudo histomorfométrico. Rev Odontol Unesp. 2007; 36 (1): 70-7.
26. Laureano-Filho JR, Branco BLC, Andrade ESS, Barbosa JRA. Comparação histológica entre o osso desmineralizado e polímero de mamona sobre a regeneração óssea. Rev Bras Otorrinol. 2007; 73(2): 186-192.
27. Lindhe J, Karring T, Lang NP. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral, 4. Edição. São Paulo: Guanabara Koogan; 2005.
28. López J Alarcón M. Sulfato de calcio: propiedades y aplicaciones clínicas. Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral. 2011; 4(3): 138-141.

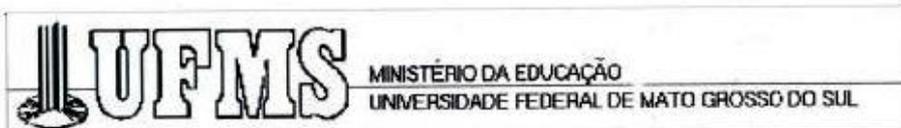
29. Lynch SE, Genko R, Marx R. Grafting materials in repair and restorations. Tissue engineering application in maxillofacial surgery and periodontics. Quintessence. 1999; 5: 93-112.
30. Macedo NL, Macedo LGS, Monteiro ASF. Calcium and PTFE nonporous barrier for regeneration of experimental bone defects. Med Oral Patol Cir Bucal. 2008; 13(6): 375-379.
31. Magini RS. Enxerto ósseo do seio maxilar- estética e função. São Paulo: Ed Santos; 2006.
32. Malzac A. Hidroxiapatita dopada pelo gálio para potencial uso em ortopedia [Tese]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2008.
33. Mastrocinque S, Tatarunas AC, Zerwes MBC, Queiroz GF, Schmaedecke A, Aceto M, Ferrigno CRA. Proteínas ósseas morfogenéticas e outros fatores de crescimento ósseo. S Cien Agrárias. 2002; 25(2): 139-150.
34. Melnikov P, Malzac A, Coelho MB. O gálio e a patologia óssea. Acta Ortop Bras. 2008; 16(1): 54-57.
35. Mendonça RG, Freitas AC, Ramalho LP, Farias JG, Ribeiro MMB. Avaliação histológica do processo de reparo ósseo após implantação de BMPs. Pesq Bras Odontoped Clin Integr João Pessoa. 2007; 7(3): 291-296.
36. Miloro M, Ghali GE, Peter EL, Peter DW. Princípios de cirurgia bucomaxilofacial de Peterson. São Paulo: Editora Santos; 2008.
37. Miranda ES, Cardoso FTS, Filho JFM, Barreto MDR, Teixeira RMM, Wanderley AL, Fernandes KE. Estudo experimental comparativo no uso de enxerto ósseo orgânico e inorgânico no reparo de fraturas cirúrgicas em rádio de coelhos. Acta Ortop Bras. 2005; 13(5): 245-248.
38. Misch CE. Biomateriais utilizados em implantes dentários. In: Misch CE, editor. Implantes dentários contemporâneos. 2ª Ed. São Paulo: Ed. Santos; 2000: 271-302.

39. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *Anz J Surg.* 2001; 71(6): 354–361.
40. Mori GG, Garcia RB, Moraes IG, Bramante CM, Bernardineli N. Morphometric and microscopic evaluation of the effect of gallium nitrate as a root canal dressing in rat teeth submitted to late replantation. *J Appl Oral Sci.* 2006; 14(6): 405-9.
41. Mori GG, Moraes IG, Garcia RB, Borro LCB, Purificação BR. Microscopic investigation of the use of gallium nitrate for root surface treatment in rat teeth submitted to delayed replantation. *Braz Dent J.* 2007; 18(3): 198-201.
42. Oliveira RB, Silveira RL, Machado RA. Uso do enxerto desmineralizado homogêneo em alvéolo pós-extração: relato de casos. *Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac.* 2005 ;5(4): 31- 36.
43. Pereira SLS, Toledo S, Okamoto T, Sallum EA, Nociti-Júnior FH. Efeito da calcitonina de salmão sobre a cicatrização de defeitos ósseos. Estudo radiográfico e histológico em coelhos. *Rev Odontol UNESP.* 1997; 26(2): 471-488.
44. Peterson LJ, Ellis E, Hupp JR, Turcker MR. *Cirurgia oral e maxilofacial contemporânea*, 4ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
45. Pettinicchio M, Sammons R, Caputi S, Piattelli A. Bone regeneration in sinus augmentation procedures with calcium sulphate. Microstructure and microanalytical investigations. *Australian Dental J.* 2012; 57:200-206.
46. Prado FA, Anbinder AL, Jaime APG, Lima AP, Balduci I, Rocha RF. Defeitos ósseos em tíbias de ratos: Padronização do modelo experimental. *Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo.* 2006; 18(1): 7-13.
47. Rokita E, Korbas M, Mutsaers PHA, Taton G, Voigt MJA. Micro-PIXE studies of gallium incorporation in mineralized tissue. *Nucl Inst Methods in Physics Research, Section B: Beam interactions with materials and atoms.* 2001; 181:529-32.

48. Sassioto MCP, Inouye CM, Aydos RD, Figueiredo AS, Pontes ERJC, Takita LC. Estudo do reparo ósseo com matriz óssea bovina desvitalizada e calcitonina em ratos. *Acta Cir Bras.* 2004; 19(5): 495-503.
49. Sousa CFS. Estudo histomorfométrico da reparação óssea em ratos após o uso de biomaterial de origem sintética (hidroxiapatita + beta-tricolcofostato) [Monografia]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2010.
50. Souza DO, Almeida-Júnior E, Barreto IC, Oliveira TF, Araújo RCA. Aplicações de enxertos de bancos de osso em odontologia. *Rev Cir Med Biol.* 2010; 9(1): 45-48.
51. Strocchi R, Orsini G, Lezzi G, Scarano A, Rubini C, Pecora G, Pattelli A. Bone regeneration with calcium sulfate: evidence for increased angionogenesis in rabbits. *J of Oral Implantol.* 2002; 18(5): 43-48.
52. Ten Cate AR. *Histologia Bucal.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
53. Teixeira LJC. Potencial osteocondutor de grânulos de hidroxiapatita em defeitos críticos na calvária de ratos [Dissertação]. Duque de Caxias: Universidade do Grande Rio; 2009.
54. Toloue SM, Chesnoiu-Matei I, Blanchard SB. A clinical and histomorphometric study of calcium sulfate compared with freeze-dried bone allograft for alveolar ridge preservation. *J Periodontol.* 2011; 83(7): 847-855.
55. Trevisan Jr W, Rodrigues MR, Silva TB, Simione JC. Sulfato de Cálcio como barreira e material de preenchimento associado ao osso autógeno no tratamento de defeito ósseo periodontal - Proposta de tratamento e relato clínico. *Innovations Implant J.* 2006; 01(01): 54- 61
56. Tulasne JF, Andréani JF. *Enxertos ósseos em implantodontia.* São Paulo: Editora Quintessence. 2010.
57. Warrel RP Jr. Gallium nitrate for the treatment of bone metastases. *American cancer society.* 1997; 80(8):1680-85.

58. Warrell RP Jr, Bockman RS, Coonley CJ, Isaacs M, Staszewski H. Gallium Nitrate Inhibits Calcium Resorption from Bone and Is Effective Treatment for Cancer-related Hypercalcemia. *J Clin Invest.* 1984; 73: 1487-90.
59. Warrell RP, Jr, Skelos A, Alcock N W, Bockman R S. Gallium Nitrate for Acute Treatment of Cancer-related Hypercalcemia: Clinicopharmacological and Dose Response Analysis. *Cancer Research.* 1986; 46: 4208-12.
60. Warrel RP Jr. Gallium for treatment of bone diseases. In: *Handbook of metal-ligand interactions in biological fluids.* Bioinorganic med NY. 1995; 253-65.
61. Zabeu JLZ, Mercadante MT. Substitutos ósseos comparados ao enxerto ósseo autólogo em cirurgia ortopédica- Revisão sistemática da literatura. *Rev Bras Ortop.* 2008; 43(3): 59-68

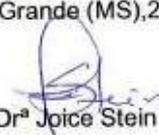
ANEXO



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 290 do Mestrando Arthur Azambuja Santos, sob a orientação do Prof. Danilo Mathias Zanello Guerisoli, referente ao projeto de pesquisa, "Avaliação da biocompatibilidade e capacidade osteoindutora do osso bovino liofilizado associado a vidro bioativo e ao nitrato de gálio", está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião de 29 de junho de 2011.

Campo Grande (MS), 29 de junho de 2011.


Dr^a Joice Stein

Coordenadora da CEUA

Segunda via solicitada pelo mestrando e emitida em 11 de dezembro de 2012.

