

Luiz Felipe Cardoso Lehman

**AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA E HISTOQUÍMICA DE VIDRO  
BIOATIVO NO PROCESSO DE REPARAÇÃO ÓSSEA**

Faculdade de Odontologia - UFMG

Belo Horizonte

2016

Luiz Felipe Cardoso Lehman

**AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA E HISTOQUÍMICA DE VIDRO  
BIOATIVO NO PROCESSO DE REPARAÇÃO ÓSSEA**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Odontologia – Área de concentração em Estomatologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Alves Mesquita

Co-Orientador: Prof. Dr. Anderson José Ferreira

Faculdade de Odontologia - UFMG

Belo Horizonte

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

L523a  
2016  
T

Lehman, Luiz Felipe Cardoso  
Avaliação histométrica e histoquímica de vidro bioativo  
no processo de reparação óssea / Luiz Felipe Cardoso  
Lehman. – 2016.  
81 f.: il.

Orientador (a): Ricardo Alves Mesquita  
Coorientador (a): Anderson José Ferreira

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas  
Gerais, Faculdade de Odontologia.

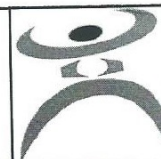
1. Transplante ósseo. 2. Regeneração óssea. 3.  
Materiais biocompatíveis. I. Mesquita, Ricardo Alves. II.  
Ferreira, Anderson José. III. Universidade Federal de  
Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.  
BLACK D047

Biblioteca da Faculdade de Odontologia - UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



## FOLHA DE APROVAÇÃO

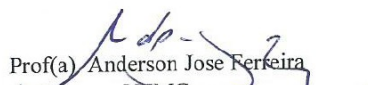
**Avaliação histométrica e histoquímica de vidro bioativo no processo de reparação óssea**

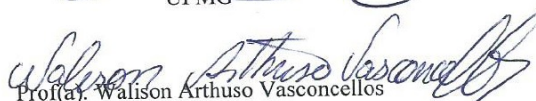
**LUIZ FELIPE CARDOSO LEHMAN**

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Odontologia, área de concentração Estomatologia.

Aprovada em 29 de junho de 2016, pela banca constituída pelos membros:


  
Prof(a). Ricardo Alves de Mesquita - Orientador  
UFMG

  
Prof(a). Anderson Jose Ferreira  
UFMG

  
Prof(a). Walison Arthuro Vasconcelos  
UFMG

  
Prof(a). Rosana Zacarias Domingues  
UFMG

  
Prof(a). Rodrigo Aliprandi Dutra  
Newton Paiva

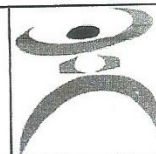
  
Prof(a). Suzana Coulaud da Costa Cruz Miranda  
Centro Universitário Newton Paiva

Belo Horizonte, 30 de junho de 2016.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA




## ATA DA DEFESA DE TESE DO ALUNO LUIZ FELIPE CARDOSO LEHMAN

Aos 29 dias de junho de 2016, às 14:00 horas, na sala 3403 da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, reuniu-se a Comissão Examinadora composta pelos professores Ricardo Alves de Mesquita (Orientador) – FO/UFMG, Anderson José Ferreira – ICB/UFMG, Walison Arthuso Vasconcellos – FO/UFMG, Rosana Zacarias Domingues – ICEX/UFMG, Rodrigo Aliprandi Dutra – Centro Universitário Newton Paiva e Suzana Coulaud da Costa Cruz Miranda – Centro Universitário Newton Paiva, para julgamento da tese intitulada: **Avaliação histométrica e histoquímica de vidro bioativo no processo de reparação óssea**. O Presidente da Banca, abriu os trabalhos e apresentou a Comissão Examinadora. Após a exposição oral do trabalho pelo aluno e arguição pelos membros da banca, a Comissão Examinadora considerou o candidato:

Aprovado


Reprovado

Finalizados os trabalhos, lavrou-se a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão. Belo Horizonte, 29 de junho de 2016.

  
Prof(a). Ricardo Alves de Mesquita

  
Prof(a). Anderson José Ferreira

  
Prof(a). Walison Arthuso Vasconcellos

  
Prof(a). Rosana Zacarias Domingues

  
Prof(a). Rodrigo Aliprandi Dutra

  
Prof(a). Suzana Coulaud da Costa Cruz Miranda

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família.  
Em especial, às minhas filhas, Catarina e Beatriz,  
e meus pais Luiz Felipe e Solange,  
por seu apoio nos momentos difíceis.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Ricardo Alves de Mesquita, por acreditar na idéia e no sonho proposto, pela amizade, estímulo e ensinamentos durante a dura trajetória.

Ao Prof. Dr. Anderson José Ferreira, por abrir as portas de seu laboratório e acreditar e investir nesse projeto.

À Profa. Dr. Rosana Zacarias Domingues, por sua visão e apoio durante este trabalho, sem ela nada seria possível.

À Profa. Tarcília Aparecida da Silva, pelo seu apoio e ajuda imprescindível para a viabilidade da pesquisa.

Aos meus colegas de trabalho Wagner Castro, Felipe Baires e Joanna Farias, por me darem o suporte nas minhas ausências.

Aos meus colegas de doutorado Carlos e Maurício pelo apoio, ajuda estímulo positivo.

Aos funcionários do laboratório de patologia Domênico, Inês e Daniela pela ajuda fundamental.

À minha grande amiga e auxiliar nessa empreitada, Mariana Saturnino que, como bolsista de Iniciação Científica, ajudou a construir esse trabalho.

E finalmente, às pessoas que me ajudaram a terminar minhas análises, como a doutoranda da Química Rosângela M. Ferreira e Joice Correa.

O meu eterno obrigado!

## EPÍGRAFE

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro”. (Albert Einstein)

## RESUMO

Os enxertos de origem autógena são osteogênicos e possuem como vantagens a produção de tecido ósseo originário do próprio organismo. A sua limitação é a grande morbidade cirúrgica. O biovidro é uma cerâmica bioativa com disponibilidade ilimitada que leva a uma cirurgia com menor morbidade. O presente estudo teve como objetivo avaliar o biovidro teste durante o reparo ósseo e compará-lo com outros substitutos ósseos, em defeitos cirúrgicos experimentais em tibia de ratos. O biovidro teste (CEELBIO, Belo Horizonte, Brasil), previamente caracterizado foi comparado com o Biogran<sup>®</sup> (Biomet 3i Innovations Inc., Palm Beach Gardens, USA), através de espectroscopia na região do infravermelho, microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de dispersão em energia (EDS) e fluorescência de Rx. Após as análises estruturais, deu-se início ao estudo *in vivo*. Foram utilizados 120 ratos (*rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, com aproximadamente 7 a 8 semanas. Os defeitos ósseos foram realizados na tibia direita dos animais e preenchidos de acordo com a seguinte divisão: Grupo I- controle negativo, sem preenchimento; Grupo II- foi preenchido por Biogran<sup>®</sup>; Grupo III- preenchido por biovidro teste; Grupo IV- controle positivo, com preenchimento com osso autógeno. Nos períodos de 7, 14, 21, 28, 49 e 70 dias pós-operatório, os animais foram eutanasiados e os processos de mineralização óssea e reparo foram analisados através de histomorfometria (% de osso neoformado no sítio do defeito). Níveis de BMP-2 foram mensurados através de ensaio de ELISA. Análise estatística foi realizada utilizando programa SPSS (versão 20.0, SPSS Inc., Chicago, USA). Os resultados da análise histológica demonstraram que, no controle negativo, houve neoformação óssea até os 14 dias (20,40%,  $p < 0,001$ ) e depois houve reabsorção em até 21 dias (6,60%,  $p < 0,001$ ). No grupo de Biogran<sup>®</sup>, houve uma neoformação óssea junto aos grãos em 7 dias (34,20%,  $p = 0,019$ ) e que se manteve enquanto o material estava presente nos defeitos em 70 dias (15,67%,  $p = 0,048$ ). O biovidro teste foi reabsorvido totalmente até 21 dias e os picos de osso neoformado foram observados em 7 (21,00%,  $p = 0,019$ ) e 49 dias (15,60%,  $p = 0,036$ ). Nesse grupo, células semelhantes a macrófagos, dispostas em lençol, foram visualizadas junto a tecido ósseo neoformado. Quanto ao controle positivo, o osso autógeno foi totalmente reabsorvido em até 14 dias e o pico de formação óssea se deu nesse

mesmo momento, em 14 dias, (40,80%,  $p < 0,001$ ), mostrando-se, nos tempos subsequentes, similar ao controle negativo. Células gigantes multinucleadas foram encontradas em áreas de remodelação óssea, junto ao Biogran<sup>®</sup> e ao biovidro teste. Os níveis de BMP-2 no grupo controle negativo se mostraram maiores nos tempos de 7 (418,80pg/mL,  $p = 0,871$ ) e 28 dias (346,36 pg/mL,  $p = 0,035$ ). No grupo Biogran<sup>®</sup> o pico de BMP-2 se deu em 7 dias (471,95 pg/mL,  $p = 0,871$ ). O biovidro teste teve seu pico de liberação de BMP-2 em 7 dias também (471,39 pg/mL,  $p = 0,871$ ). Já o controle positivo apresentou nível de BMP-2 em maior quantidade nos tempos de 7 (346,55 pg/mL,  $p = 0,871$ ) e 21 dias (407,57 pg/mL,  $p = 0,300$ ). O biovidro é um material degradável, e com características biológicas de osteoindução e osteocondução.

**PALAVRAS-CHAVE:** osteocondução, reparação óssea, vidro bioativo.

## ABSTRACT

The autogenous origin grafts are osteogenic and have the advantage of producing bone tissue originated from the body itself. Its limitation is the great surgical morbidity. The bioglass is a bioactive ceramic with unlimited availability that leads to a surgery with less morbidity. This study aimed to evaluate the bioglass test during bone repair and to compare it with other bone substitutes in experimental surgical defects in the tibia of rats. The bioglass test (CEELBIO, Belo Horizonte, Brazil), has been characterized and compared to the Biogran<sup>®</sup> (Biomet 3i Inovations Inc., Palm Beach Gardens, USA) by spectroscopy in the infrared, scanning electron microscopy (SEM), EDS spectroscopy and Rx fluorescence. The study *in vivo* has been started after the structural analysis. 120 rats (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar rats), with approximately 7 to 8 weeks, were used. The bone defects were performed in the right tibia of animals and filled according to the following breakdown: Group I- negative control without filling; Group II- filled by Biogran<sup>®</sup>; Group III- filled with bioglass test; IV- positive control group, with filling of autogenous bone. At 7, 14, 21, 28, 49 and 70 postoperative days, the animals were euthanized and bone mineralization processes and repair were analyzed by histomorphometry (% of newly formed bone in the defect site). BMP-2 levels were measured by ELISA assay. Statistical analysis was performed using SPSS (version 20.0, SPSS Inc., Chicago, USA). The results of the histological analysis showed that in the negative control there was no bone growth up to 14 days (20.40%,  $p < 0.001$ ) and after reabsorption, within 21 days (6.60%,  $p < 0.001$ ). In Biogran<sup>®</sup> group, there was new bone formation along the grain in 7 days (34.20%,  $p = 0.019$ ) and that was maintained as the material was present in shortcomings in 70 days (15.67%,  $p = 0.048$ ). The test bioglass was completely reabsorbed within 21 days; new bone formation and peaks were observed in 7 (21.00%,  $p = 0.019$ ) and 49 days (15.60%,  $p = 0.036$ ). In this group, macrophage-like cells arranged in sheets, were viewed with the newly formed bone. On the positive control, autologous bone was completely reabsorbed within 14 days, and the peak bone formation occurred at the same moment, within 14 days (40.80%,  $p < 0.001$ ), showing, in subsequent occasions, similar to control negative. Multinucleated giant cells were found in areas of bone remodeling, with the Biogran<sup>®</sup> and test bioglass. BMP-2 levels in the negative control group were higher in 7 (418,80pg / ml,  $p =$

0.871) and 28 days (346.36 pg / ml, p = 0.035). In Biogran<sup>®</sup> group peak BMP-2 occurred within 7 days (471.95 pg / ml, p = 0.871). The test bioglass had its peak BMP-2 release in 7 days as well (471.39 pg / ml, p = 0.871). The positive control showed BMP-2 level in greater quantities in 7 (346.55 pg / ml, p = 0.871) and 21 days (407.57 pg / ml, p = 0.300). The test bioglass is a biodegradable material, with biological characteristics of osteoinduction and osteoconduction.

**Key words:** osteoconduction, bone healing, bioglass.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Materiais usados para a reparação óssea (Adaptado de E. García-Gareta et al., 2015)

Tabela 2- Distribuição dos animais de acordo com os grupos experimentais

Tabela 3 – Resultado da fluorescência de Rx do Biogran<sup>®</sup> e do biovidro

Tabela 4- Porcentagens das áreas de osso neoformado com desvio padrão em 7 dias

Tabela 5- Porcentagens das áreas de osso neoformado com desvio padrão em 14 dias

Tabela 6- Porcentagens das áreas de osso neoformado com desvio padrão em 21 dias

Tabela 7- Porcentagens das áreas de osso neoformado com desvio padrão em 28 dias

Tabela 8- Porcentagens das áreas de osso neoformado com desvio padrão em 49 dias

Tabela 9- Porcentagens das áreas de osso neoformado com desvio padrão em 70 dias

Tabela 10- Tabela descritiva das porcentagens de materiais apresentadas em cada grupo referente aos tempos de eutanásia

Tabela 11- Quantidade de BMP-2 nas amostras com desvio padrão em 7 dias

Tabela 12- Quantidade de BMP-2 nas amostras com desvio padrão em 14 dias

Tabela 13- Quantidade de BMP-2 nas amostras com desvio padrão em 21 dias

Tabela 14- Quantidade de BMP-2 nas amostras com desvio padrão em 28 dias

Tabela 15- Quantidade de BMP-2 nas amostras com desvio padrão em 49 dias

Tabela 16- Quantidade de BMP-2 nas amostras com desvio padrão em 70 dias

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Modulação pela BMP, osteoprotegerina e RANKL, do processo de reabsorção óssea
- Figura 2 – Incisão (A), perfuração dos defeitos ósseos (B), defeitos finalizados (C) e sutura (D)
- Figura 3 – Tela do programa ZEN 2, demonstrando como as áreas de osso neoformado e material foram obtidas
- Figura 4 - Espectroscopia na região do infravermelho, Biogran<sup>®</sup> 72 h, demonstrando a presença de bandas entre 560 a 600 cm<sup>-1</sup>, compatíveis com a presença de hidroxapatita
- Figura 5 – Espectroscopia na região do infravermelho, biovidro 72 h, demonstrando a presença de bandas entre 560 a 600 cm<sup>-1</sup>, compatíveis com a presença de hidroxapatita
- Figura 6 – Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) do biovidro teste (A a D) e do Biogran<sup>®</sup> (E a H)
- Figura 7 – Resultado de EDS do Biogran<sup>®</sup>
- Figura 8 – Resultado EDS do biovidro teste
- Figura 9 – Histologia do defeito ósseo com 7 dias, controle negativo. TEC REP – tecido de reparação e OST – material osteóide. Coloração HE. Aumento A - 50X e B – 100X
- Figura 10 - Histologia do defeito ósseo com 7 dias, Biogran<sup>®</sup>. Setas pretas indicam as fissuras do biomaterial e a seta azul indica o tecido osteóide em contato com o grão do material. Coloração HE. Aumento A - 50X e B – 100X
- Figura 11 - Histologia do defeito ósseo com 7 dias, Biovidro. BIO – biovidro presente no defeito. Seta preta indica células grandes com citoplasma granular. Coloração HE. Aumento A - 100X e B – 400X
- Figura 12 - Histologia do defeito ósseo com 7 dias, Controle positivo (autógeno). Setas pretas indicam osso autógeno enxertado no defeito. Coloração HE. Aumento A - 50X e B – 100X
- Figura 13 - Histologia do defeito ósseo com 14 dias, A - Controle negativo, B - Biogran<sup>®</sup> (seta indicando osso neoformado), C – Biovidro teste ( seta indicando osso neoformado), D – Controle positivo (autógeno). Coloração HE. Aumentos de 50X
- Figura 14 - Histologia do defeito ósseo com 21 dias, A - Controle negativo, B - Biogran<sup>®</sup>, C – Biovidro teste ( seta indicando lençol de células semelhantes a macrófagos), D – Controle positivo (autógeno). Coloração HE. Aumentos de 50X

Figura 15 - Histologia do defeito ósseo com 28 dias, A - Controle negativo, B - Biogran<sup>®</sup>, C – Biovidro teste, D – Controle positivo (autógeno). Coloração HE. Aumentos de 50X

Figura 16 - Histologia do defeito ósseo com 49 dias, A - Controle negativo, B - Biogran<sup>®</sup>, C – Biovidro teste (seta indicando a presença do lençol de células semelhantes a macrófagos), D – Controle positivo (autógeno). Coloração HE. Aumentos de 50X

Figura 17 - Histologia do defeito ósseo com 70 dias, A - Controle negativo, B - Biogran<sup>®</sup>, C – Biovidro teste ( seta indicando lençol de células semelhantes a macrófagos), D – Controle positivo (autógeno). Coloração HE. Aumentos de 50X

Figura 18- Histologia das células multinucleadas (setas) A- Biogran<sup>®</sup>, 49 dias, B- Biovidro 14 dias

Figura 19- Gráfico comparando a formação óssea nos defeitos por porcentagem de osso neoformado, com desvio padrão médio. (\*) representa as curvas que apresentaram significância estatística [Controle negativo, Biogran<sup>®</sup> e Controle positivo]

Figura 20- Gráfico comparando níveis de BMP-2 nos defeitos com desvio padrão médio. (\*) representa as curvas que apresentaram significância estatística. [Biogran<sup>®</sup> e Biovidro teste]

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura  
EDS – Espectroscopia por dispersão de Energia  
BMP-2 – Bone Morphogenetic Protein 2  
ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay  
SPSS – Statistical Package for the Social Sciences  
FDA – Food and Drug Administration  
Mpa – mega pascal  
Gpa – giga pascal  
TGF- $\beta$  - transforming growth factor beta  
RANK - receptor activator of nuclear factor-kappaB  
RANKL - receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand  
MMP – Metaloproteinase de matriz  
M-CSF - fator de estimulação de colônias macrofágicas  
TNF – Tumor Necrosis Factor  
OPG – Osteoprotegerin  
OCIF – Fator inibidor de osteoclastogênese  
PRP – Plasma Rico em Plaquetas  
PDGF- Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas  
IGF- Fator de Crescimento Semelhante a Insulina  
TGF $\beta$ – Fator de Crescimento Transformador Beta  
PRF – plaquetas ricas em fibrina  
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais  
SBF – Simulated Body Fluid  
CEUA - Comitê de Ética em Uso de Animais  
HE – Hematoxilina e Eosina  
ADN - Área disponível para neoformação  
ATD - Área total do defeito  
AOM - Área ocupada pelo material  
AON - Área de osso neoformado  
%ON – porcentagem de osso neoformado  
%Mat – Porcentagem de material remanescente  
DP – Desvio Padrão

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2.REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1 Etapas para o desenvolvimento de novos substitutos ósseos dentais.....	20
2.2 Substitutos ósseos.....	21
2.2.1 Osteogênese.....	21
2.2.2 Osteoindução.....	22
2.2.2.1 Proteínas Morfogenéticas (BMP's).....	22
2.2.2.2 Plasma Rico em Plaquetas.....	24
2.2.2.3 Aloenxertos.....	24
2.2.3 Osteocondução.....	25
2.2.3.1 Materiais aloplásticos.....	25
2.2.3.2 Vidros bioativos.....	26
2.2.3.3 Polímeros.....	27
2.2.3.4 Cerâmicas.....	27
2.2.3.5 Metais.....	28
2.2.3.6 Compósitos.....	28
2.2.3.7 Enxertos xenógenos.....	28
2.2.4 Bioatividade.....	28
2.3 Estudos de biomateriais em animais experimentais.....	28
3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO ESTUDO.....	30
4. OBJETIVOS.....	31
4.1 Geral.....	31
4.2 Específicos.....	31
5. HIPÓTESE.....	32
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
6.1 Biovidro teste (CELLBIO).....	33
6.1.1 Síntese.....	33
6.1.2 Caracterização.....	33
6.1.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho.....	34
6.1.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	34
6.1.2.3 EDS (Energy Dispersive Spectroscopy).....	34

6.1.2.4 Fluorescência de Raios X.....	34
6.2 Animais.....	35
6.3 Grupos experimentais.....	35
6.4 Procedimento cirúrgico.....	36
6.5 Eutanásia e coleta do material.....	38
6.6 ELISA.....	39
6.7 Forma de análise dos resultados.....	39
6.7.1 Análise histológica.....	40
6.7.2 Análise histométrica.....	40
6.8 Análise estatística.....	42
7. RESULTADOS.....	43
7.1 Caracterização.....	43
7.1.1 Espectroscopia na região do infravermelho.....	43
7.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	44
7.1.3 EDS (Energy Dispersive Spectroscopy).....	46
7.1.4 Fluorescência de Raios X.....	47
7.2 Análise histológica.....	48
7.2.1 7 dias.....	48
7.2.2 14 dias.....	50
7.2.3 21 dias.....	51
7.2.4 28 dias.....	52
7.2.5 49 dias.....	53
7.2.6 70 dias.....	54
7.2.7 Análise de infiltrado inflamatório.....	55
7.3 Análise histométrica.....	56
7.3.1 7 dias.....	56
7.3.2 14 dias.....	57
7.3.3 21 dias.....	57
7.3.4 28 dias.....	57
7.3.5 49 dias.....	58
7.3.6 70 dias.....	58
7.3.7 Neoformação óssea por material no decorrer dos tempos de eutanásia.....	59
7.4 Manutenção dos substitutos ósseos nos defeitos.....	59

7.5 Correlação entre osso neoformado e substituto ósseo presente no defeito.....	60
7.6 ELISA.....	61
7.6.1 7dias.....	61
7.6.2 14 dias.....	61
7.6.3 21 dias.....	62
7.6.4 28 dias.....	62
7.6.5 49 dias.....	62
7.6.6 70 dias.....	63
7.6.7 Níveis de BMP-2 no decorrer dos tempos de eutanásia.....	63
8. DISCUSSÃO.....	64
9. CONCLUSÃO.....	68
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
11. ANEXOS E APÊNDICES.....	76
12. PRODUÇÃO INTELECTUAL DESENVOLVIDA DURANTE O CURSO DE DOUTORADO.....	77

## 1. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo tem uma habilidade única de se remodelar e se reparar após uma fratura. Contudo, defeitos segmentares, sequelas de trauma, ressecções, ou presença de patologias, apresentam um grande desafio para os cirurgiões maxilofaciais<sup>1</sup>. Uma atenção considerável tem sido dada a substitutos ósseos sintéticos, tais como hidroxiapatita, tricálcio-fosfato, vidros bioativos<sup>2</sup>.

Existem três processos de formação óssea utilizando substitutos ósseos. O primeiro é a osteocondução, processo no qual o material serve de arcabouço para a neoformação óssea. O segundo seria a osteoindução, que é o processo de indução da diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos. Por fim temos o processo de osteogênese, em que o substituto ósseo carrega células ósseas viáveis dentro de um enxerto<sup>3</sup>.

O enxerto de osso autógeno é o padrão ouro, pois possui capacidade osteogênica, produzindo formação óssea derivada de tecido do próprio organismo<sup>4</sup>. Esse tecido apresenta a capacidade de reabsorção e/ou remodelação, sem provocar reações tipo corpo estranho, podendo ser obtido de fontes intra ou extrabucais. No entanto, há a necessidade de uma segunda área cirúrgica doadora, aumentando a morbidade cirúrgica, limitando a quantidade de substituto ósseo disponível para o uso<sup>5,6</sup>.

Devido às limitações relacionadas aos enxertos biológicos, a engenharia tecidual tem surgido como alternativa para se obter materiais que possuam propriedades capazes de induzir ou auxiliar no processo de neoformação óssea<sup>7</sup>. Nesta busca por alternativas ao enxerto autógeno, surgiram materiais de preenchimento, dentre estes os materiais aloplásticos ou sintéticos<sup>2</sup>.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Etapas para o desenvolvimento de novos substitutos ósseos dentais<sup>8</sup>

O órgão de Estado responsável pela aprovação de novos biomateriais nos Estados Unidos é a Food and Drug Administration – FDA. Esse departamento de estado dita as recomendações para o desenvolvimento de novos biomateriais que serão comercializados naquele país. Dentro dessas normas relevantes temos os seguintes ensaios:

Caracterização dos materiais:

- Composição química:
  - Composição química completa, incluindo todos os aditivos.
  - Descrição da composição, incluindo a análise dos elementos presentes e identificando traços de impurezas.
- Propriedades físicas:
  - Fotos magnificadas, micrografias em MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura), dispositivo que demonstre o tamanho da partícula, forma e porosidade.
  - Um gráfico da reabsorção do material em função do tempo, que demonstre o tempo para a depuração total ou integração no âmbito de um modelo representativo.
  - Tempo de cicatrização e em que momento o implante pode ser carregado com sucesso.
  - Porcentagens de peso relativas às fases cristalinas e amorfas (%).
  - Razão de cálcio e Fósforo.
  - Porosidade Volumétrica (% de espaço vazio).
  - Gráfico de distribuição do tamanho da partícula ( $\mu$ ).
  - Temperatura de sinterização ( $^{\circ}\text{C}$ ).
  - Resistência à compressão (Mpa).
  - Módulo de elasticidade (Gpa).
  - Módulo de Cisalhamento.
  - pH.
  - Solubilidade em água a  $20^{\circ}\text{C}$  ( $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ ).
- Desempenho *in vivo*, estudos em animais:

- Um modelo animal representativo das indicações e do uso que envolvem sítios anatômicos propostos para o uso do material.
- Uso de animais com esqueletos maduros.
- Uso de osso autógeno como controle positivo e um defeito vazio como controle negativo.
- Uso de radiografia, histologia, histomorfometria para avaliar formação óssea, reabsorção do material e geração de material residual, se presente, a intervalos relevantes ao longo do período de cicatrização.
- Testes biomecânicos de apoio para demonstrar a qualidade do osso recém-formado.
- Biocompatibilidade:
  - Citotoxicidade.
  - Sensibilidade.
  - Genotoxicidade.
  - Toxicidade crônica.
  - Carcinogenicidade.

## **2.2 Substitutos ósseos**

Substitutos ósseos têm três mecanismos de ação, a osteogênese, osteoindução e a osteocondução. A compreensão desses mecanismos ajuda no desenvolvimento de novos materiais. Esses, por sua vez, têm como vantagens diminuir ou eliminar o uso de osso autógeno e alógeno<sup>3</sup>.

### **2.2.1 Osteogênese**

Osteogênese é a formação de osso mineralizado pelos osteoblastos transplantados, carregados por enxertos autógenos<sup>9</sup>.

Enxertos ósseos osteogênicos têm a capacidade intrínseca de estimular a cicatrização óssea pela presença de células. Em geral essas células são mesenquimais indiferenciadas, ou osteoprogenitoras<sup>10</sup>.

A vantagem do enxerto autógeno é que desencadeia baixa resposta imune, mas têm como desvantagem a morbidade cirúrgica e quantidade óssea disponível<sup>3</sup>. O ramo e o mento mandibular, a crista ilíaca, a calota craniana e até o osso ulnar podem ser utilizados como possíveis áreas doadoras para um enxerto

autógeno<sup>6,11,12</sup>. Os sítios extra bucais fornecem considerável quantidade óssea, mas a morbidade cirúrgica é grande devido ao sítio doador e à presença de duas áreas operadas. Um acompanhamento de 6 anos demonstrou que houve, em média, 87% de perda do volume enxertado de osso autógeno proveniente de crista ilíaca<sup>11</sup>.

Estudos realizados em modelos animais, utilizando-se defeitos em tíbia de ratos, sem a utilização de barreiras mecânicas, obtiveram um resultado no qual o osso autógeno já era totalmente reabsorvido e substituído em 10 dias<sup>13</sup>.

## **2.2.2 Osteoindução**

A osteoindução é definida como o mecanismo pelo qual o tecido mesenquimal é induzido a alterar sua estrutura celular para se tornar osteogênico, ou seja, formar osso. Após a identificação das proteínas morfogenéticas (BMP's), esse processo vem sendo largamente elucidado<sup>10</sup>.

### **2.2.2.1 Proteínas Morfogenéticas (BMP's)**

As proteínas morfogenéticas (BMP's) são citocinas da família do fator de crescimento transformador beta TGF- $\beta$ . Algumas BMP's, tais como a BMP-2 e BMP-7, são responsáveis pela maior parte do crescimento do esqueleto e a manutenção da homeostase no processo de remodelação óssea<sup>14</sup>.

Proteínas morfogenéticas (BMP's) estão associadas à diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, que têm papel fundamental no processo de neoformação óssea. Essas mesmas proteínas têm ação direta e indireta (RANKL e osteoprotegerina) nas células osteoclásticas, modulando o processo de reabsorção óssea<sup>14</sup>.

Osteoclastos são células multinucleadas originárias do tecido hematopoético. Essas células ativas produzem uma acidificação da superfície óssea através de bombas H<sup>+</sup>-ATPase, que dissolvem os cristais de apatita. Enzimas proteolíticas, tais como a catepsina K e metaloproteases (MMP's), são secretadas no compartimento de reabsorção para quebrar a fase orgânica da matriz óssea. Duas citocinas são necessárias para induzir a diferenciação osteoclástica através de seus precursores: o fator de estimulação de colônias macrofágicas (M-CSF), e o receptor ativador NF- $\kappa$ B ligante (RANKL). RANKL está relacionado com o fator tumoral de necrose (TNF), expresso pelos osteoblastos e

células estromais que se liga em seu receptor ligante, RANK, expresso pelos precursores osteoclásticos de osteoclastos maduros. A osteoprotegerina (OPG) é conhecida também como fator inibidor de osteoclastogênese (OCIF), é um membro da família do receptor TNF com nenhum domínio transmembrânico. É como se fosse um receptor chamariz expresso pelo osteoblasto/células estromáticas que reorganiza o RANKL, e com isso bloqueia a interação entre RANK e RANKL, levando a uma inibição de diferenciação e ativação de osteoclastos (Figura 1)

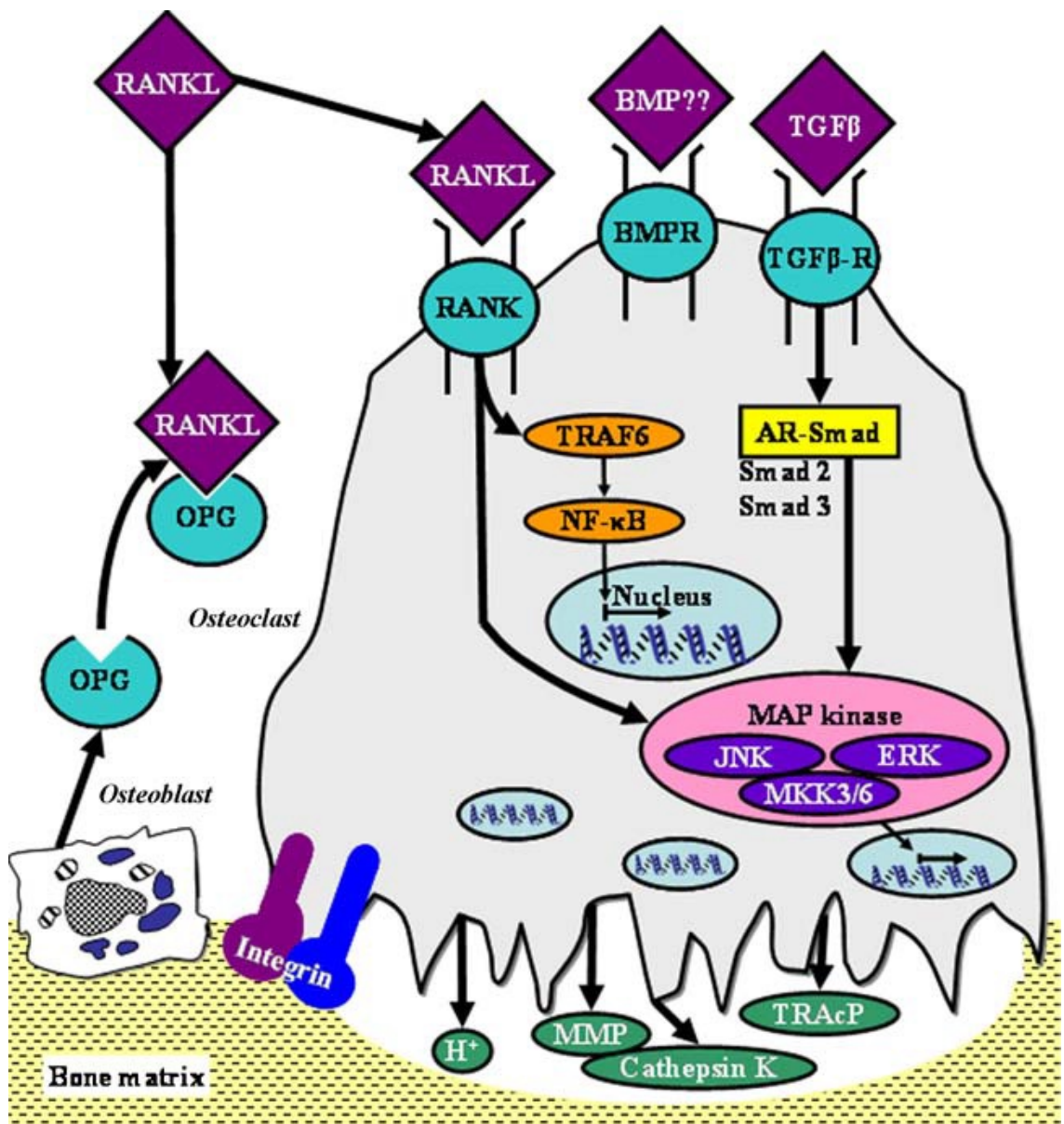


Figura 1 – Modulação pela BMP, osteoprotegerina e RANKL, do processo de reabsorção óssea<sup>14</sup>.

### **2.2.2.2 Plasma Rico em Plaquetas (PRP)**

O plasma rico em plaquetas (PRP) foi usado na implantodontia com o intuito de potencializar a osteoindução, através de fatores de crescimento presentes em sua composição, tais como:

- PDGF- Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas,
- IGF- Fator de Crescimento Semelhante a Insulina,
- TGF $\beta$ - Fator de Crescimento Transformador Beta.

Com a avaliação clínica mais criteriosa, notou-se que a presença ou ausência desse preparado não modificava a resposta final da formação óssea<sup>15</sup>.

A evolução da técnica que se utilizava de PRP acarretou a utilização de um preparado de plaquetas ricas em fibrina (PRF) associado ao osso alógeno congelado. Esse material, que foi usado para enxertos em seio maxilar, demonstrou, em análise histológica, um tempo menor de maturação óssea, podendo diminuir o tempo de instalação de implantes no local<sup>16</sup>.

Concentrações de fatores de crescimento exógenos, acima das fisiológicas, são necessárias para um resultado de reparação óssea mais eficaz. Matrizes cultivadas com células mesenquimais indiferenciadas embebidas em fatores de crescimento, podem levar a processos de formação óssea mais efetivos<sup>17</sup>.

Questionamentos sobre os fatores de crescimento ósseo incluem acompanhamento a longo prazo e possível carcinogênese provocada por esses materiais através do estímulo de proliferação celular, em indivíduos susceptíveis a neoplasias malignas. Basicamente a imprevisibilidade desses mecanismos ainda é o maior fator contrário ao seu uso clínico<sup>18</sup>.

### **2.2.2.3 Aloenxertos**

Bancos de ossos humanos também são uma alternativa para enxertos ósseos na implantodontia. Esse material apresenta três formas básicas: aloenxerto fresco congelado, aloenxerto seco congelado e osso desmineralizado. As vantagens desse substituto é possuir os fatores de crescimento presentes em seu interior e seu uso não necessitar de outro sítio doador cirúrgico, como no uso de osso autógeno, e com quantidade ilimitada de material. Mas, por outro lado, por não ser passível de esterilização, pode carrear certas doenças como hepatite,

Síndrome da Imunodeficiência Humana e outras doenças ainda não conhecidas<sup>19,20</sup>.

Comparando-se enxertos alógenos frescos e congelados com enxertos autógenos, nota-se uma maior reabsorção no grupo do osso alógeno. Isso ocorre possivelmente por causa da menor vascularização e celularização dos blocos alógenos<sup>21</sup>.

### 2.2.3 Osteocondução

Osteocondução pode ser definida como a habilidade de um material servir como arcabouço, mantendo as dimensões dos espaços para que haja a formação óssea nos espaços adjacentes a esse material<sup>3</sup>. Muitos materiais são passíveis de serem usados como substitutos ósseos, com vantagens e desvantagens conforme mostrado na tabela 1<sup>18</sup>.

Tabela 1- Materiais usados para a reparação óssea

Material de enxerto ósseo	Exemplos	Vantagens	Desvantagens	
Polímeros	Naturais	-Proteína: colágeno, fibrina, gelatina, fibra de seda -Polissacarídeos: ácido hialurônico, sulfato de condroitina, celulose, amido, alginato, agarose, quitosana, pulano, dextrano.	-Biodegradação -Biocompatibilidade -Bioatividade -Fonte inesgotável (alguns deles)	-Baixa resistência mecânica -Grandes taxas de degradação -Grandes variações de lotes fabricados.
	Sintéticos	-Ácido poliglicólico (PGA) -Ácido poliático (PLA) -Poli ε-caprolactona (PCL) -Poli-hidroximetilmetacrilato (poli-HEMA)	-Biodegradação -Biocompatibilidade -Versatilidade	- Baixa resistência mecânica -Grande concentração de produtos ácidos da degradação.
Cerâmicas	Fosfato de cálcio	-Coralina ou hidroxiapatita sintética (HA) -Silicato-substituto de HA -β-tricálcio fosfato (β-TCP) -Dicálcio fosfato diidratado (DCPD)	-Biocompatibilidade -Biodegradação -Bioatividade Osteocondutividade	-Fragilidade -Baixa resistência à fratura -Difícil previsão das taxas de degradação
	Biovidros e cerâmicas de vidro	-Vidros bioativos silicatos (45S5, 13-93) -Borato/borosilicato vidros bioativos (13-93B2, 13-93B3, Pyrex®) -Cerâmica alumina (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	-Osteocondutividade (sujeito a estrutura e propriedades químicas)	
Metais	-Titânio e suas ligas -Tântalo -Aço inoxidável -Magnésio e suas ligas	-Excelentes propriedades mecânicas (alta resistência e resistência ao desgaste, ductilidade) -Biocompatibilidade	-Grande quantidade de adesão de tecido -Corrosão Risco de toxicidade devido a liberação de íons metálicos	
Compósitos	-Coberturas de cálcio fosfato nos metais -HA/poli (D.L. lático) -HA/Quitosan-gelatina	-Combinação dos acima.	- Combinação dos acima.	

Adaptado de García-Gareta *et al.*, 2015<sup>18</sup>

#### 2.2.3.1 Materiais aloplásticos

Os materiais aloplásticos têm origem sintética, são biocompatíveis, bioinertes e apresentam-se como alternativas promissoras frente à eminente necessidade de se encontrar um composto com todas as características ideais para um substituto ósseo<sup>22</sup>. As vantagens do uso desses materiais é que se apresentam disponíveis

em quantidade, além de dispensarem a necessidade de um sítio doador. Dentre estes compostos encontram-se os vidros bioativos, os polímeros e as cerâmicas<sup>22</sup>.

### **2.2.3.2 Vidros bioativos**

Os vidros bioativos ou biovidros foram desenvolvidos por Hench (1969) e a composição de 45% SiO<sub>2</sub>, 24,5% Na<sub>2</sub>O, 24,5% CaO, 6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, chamada 45S5 foi a que melhor reagiu ao ser implantada ao tecido ósseo<sup>23,24,25,26</sup>.

O vidro bioativo teve seus potenciais de neoformação óssea e resistência mecânica testados em vários estudos animais, comprovando o potencial promissor como substituto ósseo, pelas propriedades bioativas e osteocondutivas<sup>27,28</sup>.

Além de serem altamente osteocondutivas, as partículas de vidro bioativo possuem propriedades de osteoestimulação. Este efeito estimulatório é visto como uma erosão interna das partículas de vidro bioativo. Células mesenquimais indiferenciadas penetram nas partículas de vidro erodidas e são estimuladas pelo meio interno a diferenciarem-se em osteoblastos. Essas ilhas de tecido ósseo recentemente formadas funcionariam como áreas de nucleação para reparo ósseo subsequente<sup>27</sup>.

Estudos em alvéolos de cães foram realizados e demonstraram a grande capacidade de osteocondução dos vidros bioativos e cerâmicas bioativas. As partículas desses materiais foram envolvidas por matriz óssea calcificada e juntamente com o implante instalado nesses alvéolos, houve um bom contato entre osso neoformado e o implante<sup>29</sup>.

A capacidade de se conduzir a formação óssea utilizando biovidro, levou alguns pesquisadores a utilizá-lo como veículo de substâncias que pudessem melhorar ou estimular a neoformação óssea<sup>30</sup>. Dessa maneira, novos materiais podem ser desenvolvidos com características osteocondutoras e osteoindutoras. Um trabalho associou o biovidro Biogran<sup>®</sup> (Biomet3i Inovattions Inc., Palm Beach Gardens, USA) com o alendronato para reparo de defeitos de bordo inferior de mandíbula de ratos. Os resultados mostraram que uma dose única local de alendronato melhorou a formação óssea local<sup>31</sup>.

O material Fiber Max FM<sup>®</sup> (fibra de vidro) produzido sob baixas temperaturas foi tratado em solução de tetraetoxisilano e depois submerso em

um meio simulado de fluido corpóreo (SBF). A fibra, após esse tratamento, demonstrou baixa citotoxicidade em meio de cultura de células fibroblásticas<sup>32</sup>.

Matrizes de vidro bioativo se mostraram eficazes para deposição de hidroxiapatita quando submergidas em meio SBF, e depois, expostas à substância Tris-HCl, foram parcialmente reabsorvidas. Isso abre uma possibilidade de fabricação de matrizes de biovidro reabsorvíveis úteis para o processo de osteocondução<sup>33</sup>.

Na periodontia o uso de biovidro juntamente com osso autógeno e membrana de colágeno em regenerações teciduais guiadas, demonstrou a mesma efetividade do uso do osso autógeno e membrana. Dessa forma, pode-se usar menos osso autógeno se for adicionado o biovidro ao sistema<sup>34</sup>.

Alguns estudos *in vitro* já apresentam a associação do biovidro sendo utilizado como veículo de algumas substâncias. Foi testada na endodontia, a associação desse material com a hidrocortisona e tetraciclina, com o objetivo de ser um capeador pulpar<sup>35</sup>.

Em outro estudo *in vitro* com a mesma associação, utilizou-se de cepas bacterianas para analisar a efetividade da liberação de antibiótico pelo biovidro, tendo-se conseguido a inibição de crescimento bacteriano<sup>36</sup>.

### **2.2.3.3 Polímeros**

Polímeros naturais têm como grande vantagem a biocompatibilidade e bioatividade, mas, em contrapartida, não possuem grande resistência mecânica e se degradam muito rapidamente. Já os polímeros sintéticos são versáteis e biocompatíveis, mas, como os polímeros naturais, não têm resistência mecânica e seus produtos, após degradação, são ácidos o que prejudica o meio em que estão presentes pelo baixo pH<sup>18</sup>.

### **2.2.3.4 Cerâmicas**

As cerâmicas se apresentam como uma opção viável de substitutos ósseos sintéticos de fonte inesgotável. Como vantagens são biocompatíveis, bioativas como materiais osteocondutores, embora tenham a sua degradação demorada além de serem consideradas frágeis<sup>18</sup>.

### **2.2.3.5 Metais**

Os metais podem ser usados como substitutos ósseos porque são biocompatíveis e resistentes. Há que se considerar, no entanto, como desvantagens, a grande aderência aos tecidos adjacentes, o que pode dificultar a função do osso associado, e também a corrosão, que pode levar à liberação de íons tóxicos aos tecidos adjacentes<sup>18</sup>.

### **2.2.3.6 Compósitos**

Os compósitos são a conjugação dos materiais supracitados. Como eles, carregam em si as mesmas vantagens e desvantagens de cada grupo<sup>18</sup>.

### **2.2.3.7 Enxertos Xenógenos**

Enxertos xenógenos de origem bovina são muito usados na implantodontia. A associação de blocos autógenos com osso bovino particulado, desproteínizado, ajuda a manter o volume inicial do bloco<sup>37</sup>. Esse mesmo material, quando usado em cirurgias de enxertia de seio maxilar, se assemelha ao resultado do osso autógeno<sup>38</sup>. O osso bovino desmineralizado usado juntamente com uma membrana de colágeno, ajuda a preservar as dimensões de alvéolos após exodontias<sup>39</sup>.

### **2.2.4 Bioatividade**

Bioatividade pode ser descrita como a ocorrência de uma interação entre o biomaterial e o tecido circundante. Nos substitutos ósseos, bioatividade descreve a influência de um material na formação óssea. Em uma perspectiva celular, bioatividade reflete a adesão e diferenciação das células osteogênicas nas superfícies cerâmicas<sup>10</sup>.

## **2.3 Estudos de biomaterias em animais experimentais**

O uso de animais para o desenvolvimento de novos materiais ainda é o principal método científico para a sua validação antes do seu uso em humanos. Alguns modelos de estudo, para se avaliar tecido ósseo, têm sido descritos na literatura. Eles podem ser divididos em defeitos críticos e não críticos. O defeito crítico foi definido como tendo um tamanho tal que seria impossível sua total regeneração

durante a vida do animal. Já o defeito não crítico permite a regeneração total do mesmo durante a vida do animal <sup>40</sup>. O modelo crítico para ratos, bem descrito na literatura, seria o de calota <sup>1,41,42</sup>. Quando o defeito é realizado na tíbia <sup>18,40,43</sup>, ele pode ser considerado não crítico, e dessa maneira pode ser reparado no período de vida do animal.

García-Gaeta *et al.* <sup>18</sup> descreveram certas vantagens em se usar a tíbia frente à calota, porque o modelo de calota propicia a formação de tecido epitelial, o que pode atrapalhar a formação óssea por processo de competição. Outra vantagem levantada seria a quantidade de células osteoprogenitoras presentes nesse sítio, que inclui medula óssea, e leva a uma facilidade de se ter a diferenciação das mesmas em células da linhagem óssea (osteoidução).

### **3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO ESTUDO**

A utilização de um biomaterial capaz de ser biocompatível e ser sintetizado a temperatura ambiente, pode trazer benefícios reais para o desenvolvimento da substituição óssea na área médico-odontológica. Primeiramente, a síntese em temperatura ambiente pode propiciar a adição de substâncias diversas, para melhorar a neoformação óssea, sem que elas sofram modificações estruturais pela temperatura. O segundo fator a ser considerado é o custo da síntese ser menor do que a dos biovidros sintetizados em altas temperaturas.

O Departamento de Química da UFMG (CEELBIO), desenvolveu um biovidro com essas características, sendo primordial o estudo do seu comportamento *in vivo*. Daí o ineditismo desse estudo.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Geral**

Avaliar, *in vivo*, um biovidro teste sintetizado em baixas temperaturas (CEELBIO, Belo Horizonte, Brasil). O mesmo foi comparado com um grupo controle negativo, controle positivo (osso autógeno) e um biovidro já comercializado para uso na implantodontia (Biogran<sup>®</sup>, Biomet3i Inovattions Inc., Palm Beach Gardens, USA).

### **4.2. Específicos**

- Avaliar por histologia e em defeitos ósseos realizados em tibia de ratos, os grupos: controle negativo, grupo Biogran<sup>®</sup>, grupo biovidro teste e controle positivo;
- Quantificar o osso neoformado nos quatro grupos;
- Quantificar a manutenção dos substitutos ósseos;
- Quantificar BMP-2 nos quatro grupos avaliados.

## **5. HIPÓTESE**

A hipótese levantada foi a de que esse biomaterial não provoca acentuadas reações inflamatórias nos tecidos vivos dos animais, sendo indicado para o uso em seres humanos. A grande vantagem do biovidro teste seria a de que, por ser sintetizado a temperatura ambiente, certas substâncias poderiam ser incorporadas a ele no processo de síntese. A liberação dessas substâncias poderia ser constante durante a degradação do biovidro. Dessa maneira além de ser um material osteocondutor, o mesmo poderia carrear e apresentar uma característica de osteoindução, dependendo dos níveis de BMP-2 encontrados nas amostras.

## **6. MATERIAIS E MÉTODOS**

O tipo de estudo foi classificado como experimental laboratorial, com utilização de animais experimentais.

### **6.1 Biovidro teste (CELLBIO)**

O material testado no experimento foi o biovidro Ceelbio UFMG.

#### **6.1.1 Síntese**

Em um béquer de plástico polietileno de 2000 mL, foram adicionados respectivamente, 51,25 mL de solução de HCl q.s.p até atingir pH 1,50, 390 mL de álcool etílico 99,5% (Synth, São Paulo, Brasil) e 375 mL de Tetraethylorthosilicate (TEOS, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). A solução foi agitada por 2 horas. Posteriormente foram adicionados 38,25 mL de triethyl phosphate (PACK, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), agitados por mais 2 horas, seguido pela adição de 145 g de cloreto de cálcio dihidratado (Vetec, São Paulo, Brasil). A solução foi agitada até completa formação da fase gel. O gel foi colocado em uma bandeja de plástico e deixado a temperatura ambiente para secagem por 24 horas. Após o período a amostra foi lavada por 3x com acetona, em seguida com solução tampão TRIS e deixada secar novamente a temperatura ambiente, para completa secagem. A amostra foi fracionada e acondicionada.

#### **6.1.2 Caracterização**

As caracterizações do biovidro e do Biogran<sup>®</sup> foram realizadas pelo departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais.

As análises foram realizadas em presença de líquido corporal simulado (SBF), somente para os ensaios de espectroscopia para a região do infravermelho e de fluorescência de Rx. Esse líquido foi sintetizado da seguinte maneira:

Em um béquer de 2000 mL foram adicionados sequencialmente 800,00 mL de água destilada, 7,996 g de NaCl; 0,350 g de NaHCO<sub>3</sub>; 0,224 g de KCl, 0,288 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,305 g de MgCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 20,00 mL de solução de HCl 1,00 mol/L; 0,376 g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,071 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 6,057 g de Trishidroxiaminometano. O pH da solução foi acertado com solução de HCl 1,00 mol/L para 7,40 a

temperatura de 37°C. A solução foi adicionada a um balão volumétrico de 1000,00 mL e o volume completado.

As amostras foram pesadas nas proporções 0,1000 g de amostra para cada 50,00 mL de solução Tris pH 7,40 e adicionadas a tubos Falcon por período de 72 horas. Após o período desejado, a amostra foi retirada da solução e seca a temperatura ambiente.

Os testes realizados foram os seguintes:

#### **6.1.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho**

Espectros de IV com transformada de Fourier foram obtidos em um espectrômetro (Perkin Elmer FTIR GX, Wellesley, MA, USA). Os sólidos foram homogeneizados em KBr (2% m/m) e prensados em discos. Os espectros foram obtidos com resolução de 4 cm<sup>-1</sup> com 16 scans por espectro no intervalo de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>.

#### **6.1.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A amostra foi colocada em um porta amostra de alumínio e foi depositada uma fina camada de ouro de aproximadamente 45 µm por técnica de sputtering sobre as mesmas para análise por MEV em Microscópio Eletrônico de Varredura (FEG - Quanta 200 FEI, Hillsboro, Oregon, USA).

#### **6.1.2.3 EDS (Energy Dispersive Spectroscopy)**

A espectroscopia por dispersão de energia foi realizada nas amostras do MEV no mesmo momento da aquisição das imagens utilizando-se o mesmo equipamento.

#### **6.1.2.4 Fluorescência de Raios X**

As análises de fluorescência de Raios X foram feitas em um equipamento (SHIMADZU, Modelo XRD-7000 X-RAY difractometer, Kyoto, Japan) com tubo de cobre.

## 6.2 Animais

O presente estudo utilizou 120 ratos (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar) adultos machos, com 7 a 8 semanas de idade aproximadamente e em bom estado de saúde.

Os animais foram provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/ICB/UFMG). Os animais foram acondicionados em gaiolas separadas com no máximo 5 animais, com luminosidade e temperatura controladas e com acesso *ad libitum* à água e ração para animais de laboratório. O experimento foi realizado em conformidade com o Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da UFMG. (CEUA, protocolo nº 103/2014).

## 6.3 Grupos experimentais

Os animais foram divididas da seguinte maneira:

Grupo I: Controle negativo – sem preenchimento,

Grupo II: Defeito preenchido com Biogran® (Biomet3i Inovattions Inc., Palm Beach Gardens, USA),

Grupo III: Defeito preenchido com Biovidro teste (CEELBIO, Belo Horizonte, Brasil),

Grupo IV: Controle positivo – preenchimento com osso autógeno coletado da tíbia direita da própria cobaia (tabela 2).

Tabela 2- Distribuição dos animais de acordo com os grupos experimentais

Tempo de eutanásia	Grupos experimentais	Grupo 1 Controle negativo	Grupo 2 Biogran®	Grupo 3 Biovidro teste	Grupo 4 Controle positivo
	7 dias	n=5	n=5	n=5	n=5
	14 dias	n=5	n=5	n=5	n=5
	21 dias	n=5	n=5	n=5	n=5
	28 dias	n=5	n=5	n=5	n=5
	49 dias	n=5	n=5	n=5	n=5
	70 dias	n=5	n=5	n=5	n=5

#### **6.4 Procedimento cirúrgico**

Primeiramente os animais receberam uma dose de 0,1ml de solução Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP) por via intramuscular, 24 horas antes do procedimento. O esquema de antibiótico foi profilático para se evitar infecções pós-operatórias. Os ratos foram então anestesiados com uma mistura de ketamina 10% e xilazina 2% (cloridrato de xilazina 15mg/kg e cloridrato de ketamina 100 mg/kg; fabricante: Rhobifarma indústria Farmacêutica Ltda, Hortolândia, São Paulo, Brasil) e submetidos à cirurgia para a realização de dois defeitos na tíbia direita. Após a tricotomia da perna direita do rato e assepsia com álcool iodado 0,1% (Rioquímica, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil), uma incisão de 10mm foi realizada com lâmina de bisturi nº15 (Solidor, Barueri, São Paulo Brasil) sobre a crista tibial de extensão de 10 milímetros. O descolamento dos tecidos moles foi realizado com o auxílio de um instrumento de Hollembeck 3S (Sswhite / Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os defeitos foram realizados com broca helicoidal de 1,6mm de diâmetro (Neodent, Curitiba, Brasil), sob abundante irrigação com soro fisiológico gelado, até trespassar a tíbia.

O primeiro defeito foi realizado a 15 mm de distância da articulação do joelho, já o segundo defeito foi realizado a 5 mm de distância do primeiro. Posicionou o material no defeito, dependendo de cada grupo experimental (tabela 2). O osso autógeno foi coletado da própria tíbia operada, através de uma raspagem com a lâmina de bisturi. O biovidro e o Biogran<sup>®</sup> foram pesados e inseridos nos defeitos. Cada defeito recebeu 10 mg de biovidro ou Biogran<sup>®</sup>, já a quantidade de osso autógeno foi colhida o suficiente para preencher o defeito sem que houvesse condensação do material. Logo após, a ferida foi suturada com fio de seda 5.0 (Ethicon<sup>®</sup>, Johnson & Johnson, São José dos Campos, São Paulo, Brasil) (Figura 2).

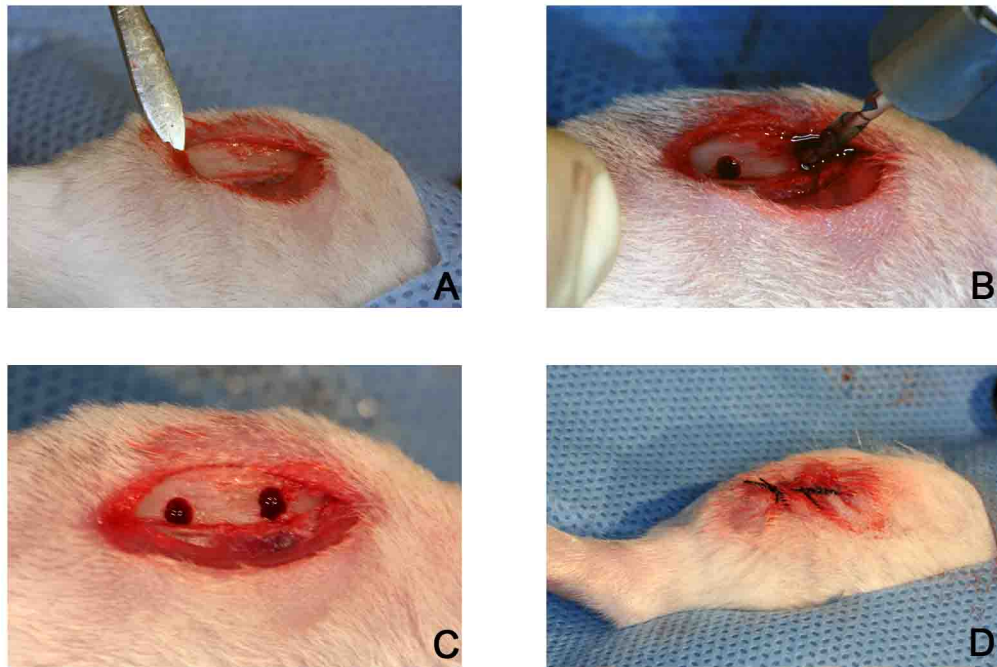


Figura 2 – Incisão (A), perfuração dos defeitos ósseos (B), defeitos finalizados (C) e sutura (D)

Terminado o procedimento cirúrgico, cada animal recebeu uma dose de 0,1ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP), para se completar a profilaxia e uma dose de 0,1 ml de flunixinina 50mg/ml (Banamine, Schering- Ploug Animal Health, Brasil), via intramuscular, para se proporcionar conforto pós-operatório ao animal.

No pós-operatório nenhuma restrição alimentar ou de movimentação foi imposta aos animais, os quais foram mantidos em gaiolas de 5 ratos cada, durante todo o experimento.

### **6.5 Eutanásia e coleta do material**

Os animais (n=120) sofreram a eutanásia em 7, 14, 21, 28, 49 e 70 dias pós-operatórios. No procedimento de eutanásia, os animais foram anestesiados utilizando-se o mesmo processo usado por ocasião da cirurgia e uma incisão ventral foi realizada. O diafragma foi rompido e foi realizada uma punção intracardíaca para a coleta de sangue do animal, para estudos futuros, tais como dosagem de BMP-2 no soro. Após esse procedimento, a artéria aorta do animal foi seccionada. O soro sanguíneo obtido pela centrifugação foi acondicionado e congelado em uma temperatura de 70° Celsius negativos.

A tíbia direita foi então removida e desarticulada do fêmur. Todo o tecido mole foi removido e, com um disco diamantado (KG Sorensen, Brasil), os dois defeitos foram separados. O mais proximal foi fixado em solução de formalina neutra tamponada a 10% (pH 7,2) e, posteriormente, processado. O defeito mais distal foi acondicionado em solução específica para a extração de citocinas (0,4mM NaCl, 10mM NaPO<sub>4</sub>, pH 7,4), em proporção de 0,1ml de solução para cada 10 mg de tecido. As amostras foram congeladas a -70°C, para a realização do ensaio ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) <sup>44</sup>.

As amostras em formalina foram desmineralizadas em solução na seguinte proporção: água destilada 1,125ml, ácido nítrico (pró análise) 125 ml e uréia (pró análise) 1,25g. A desmineralização foi realizada em 24 horas e as peças foram lavadas em água corrente, desidratadas em alcoóis de concentrações crescentes, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Cortes longitudinais seriados (4 µm de espessura) foram submetidos à coloração de hematoxilina e eosina (HE), para avaliação histológica qualitativa (processo inflamatório e tipos celulares) e de Tricômico de Masson para avaliação histométrica quantitativa (melhor visualização do colágeno do tecido ósseo).

## **6.6 ELISA**

As amostras congeladas a -70°Celsius, foram processadas em um homogenizador e o ensaio foi realizado com um kit para ELISA (R&D, Systems, Mineapolis, MN, USA).

## **6.7 Forma de análise dos resultados**

Previamente à realização da histometria, as amostras foram codificadas e dois examinadores, duplo cego, realizaram as análises. Após essa etapa, o teste estatístico de coeficiente de correlação intraclassa, para análise da confiabilidade, foi realizado através do programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS para Windows, versão 20.0, SPSS Inc., Chicago, USA).

### 6.7.1 Análise histológica

Os cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina foram analisados, qualitativamente, por microscopia óptica (Axio Scope A1, Carl Zeiss, Gottingen, Germany). Os itens considerados foram: a intensidade do processo inflamatório, a área de tecido ósseo na região central dos defeitos ósseos, a relação entre o osso neoformado e os tecidos moles e a relação dos substitutos ósseos com o osso ao redor do defeito cirúrgico<sup>35</sup>. O infiltrado inflamatório foi classificado como: nenhum, suave, moderado e severo, metodologia usada por Schallenberger *et al.*(2014)<sup>45</sup>.

### 6.7.2 Análise histométrica

As lâminas foram analisadas através de microscopia ótica (Standard 25, Carl Zeiss, Gottingen, Germany). A coloração escolhida para se realizar a análise histométrica foi o tricrômio de Masson. A histometria foi quantificada com o auxílio do programa ZEN 2 (Carl Zeiss, Microscopy, Jena, Alemanha). (Figura 3)

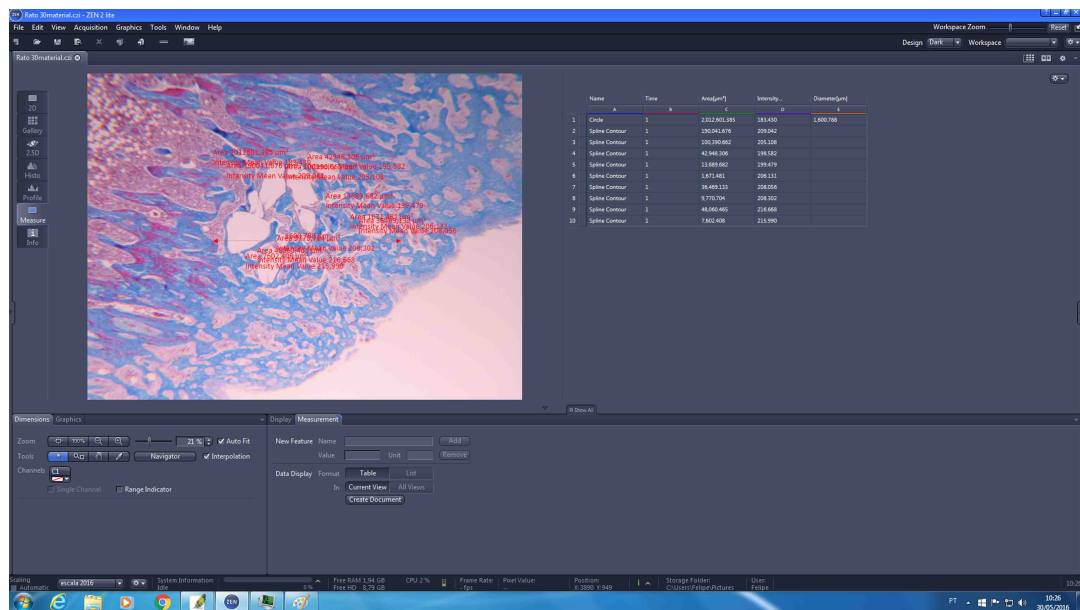


Figura 3 – Tela do programa ZEN 2, demonstrando como as áreas de osso neoformado e material foram obtidas

Foram feitas medidas das áreas ocupadas por osso neoformado na região do defeito. E, uma vez que nos grupos do biovidro, do biomaterial e do osso autógeno existe a presença do material de preenchimento, comparando com o controle negativo, procedeu-se a uma nova análise apenas da área não ocupada

por material. Foi realizado o cálculo da proporção de osso neoformado descontando a área do material. Para isso, foi subtraído do valor total da área do defeito, o valor da área ocupada por material. O valor obtido deste cálculo representou a área total (100%) em que poderia haver neoformação óssea. A partir desse resultado, foi calculada a porcentagem desta área ocupada por osso neoformado.

- Área disponível para neoformação = ADN
- Área total do defeito = ATD
- Área ocupada pelo material = AOM
- Área de osso neoformado = AON
- % osso neoformado = %ON

$$\mathbf{ADN = ATD - AOM}$$

$$\mathbf{\% ON = \frac{AON}{ADN} \times 100}$$

A presença dos biomateriais também foi medida através de uma fórmula matemática semelhante.

- Área total do defeito = ATD
- Área ocupada pelo material = AOM
- % de material remanescente = %Mat

$$\mathbf{\% Mat = \frac{AOM}{ATD} \times 100}$$

## **6.8 Análise estatística**

Primeiramente, os dados foram tabulados e avaliados quanto a sua distribuição, normal ou não, através de uma análise de Shapiro-Wilk. Os dados que obtiveram distribuição normal, foram avaliados pelo método paramétrico ANOVA com pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Já com os dados que não obedeceram a uma distribuição normal, foi realizada uma análise descritiva. Um teste de correlação de Spearman foi aplicado entre os grupos de porcentagem de osso neoformado e a porcentagem de material remanescente. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa computacional *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS para Windows, versão 20.0, SPSS Inc., Chicago, USA)

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Caracterização

A caracterização do biovidro e do Biogran<sup>®</sup> compreendeu os ensaios de espectroscopia na região do infravermelho, microscopia eletrônica de Varredura (MEV), EDS e fluorescência de Rx. Esses experimentos foram realizados após o biovidro ser imergido em uma solução de SBF.

#### 7.1.1 Espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho das amostras de Biogran<sup>®</sup> e de biovidro expostas a 72 horas SBF demonstraram bandas entre 560 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , compatíveis com a formação de hidroxiapatita nas amostras. (Figura 4 e 5)

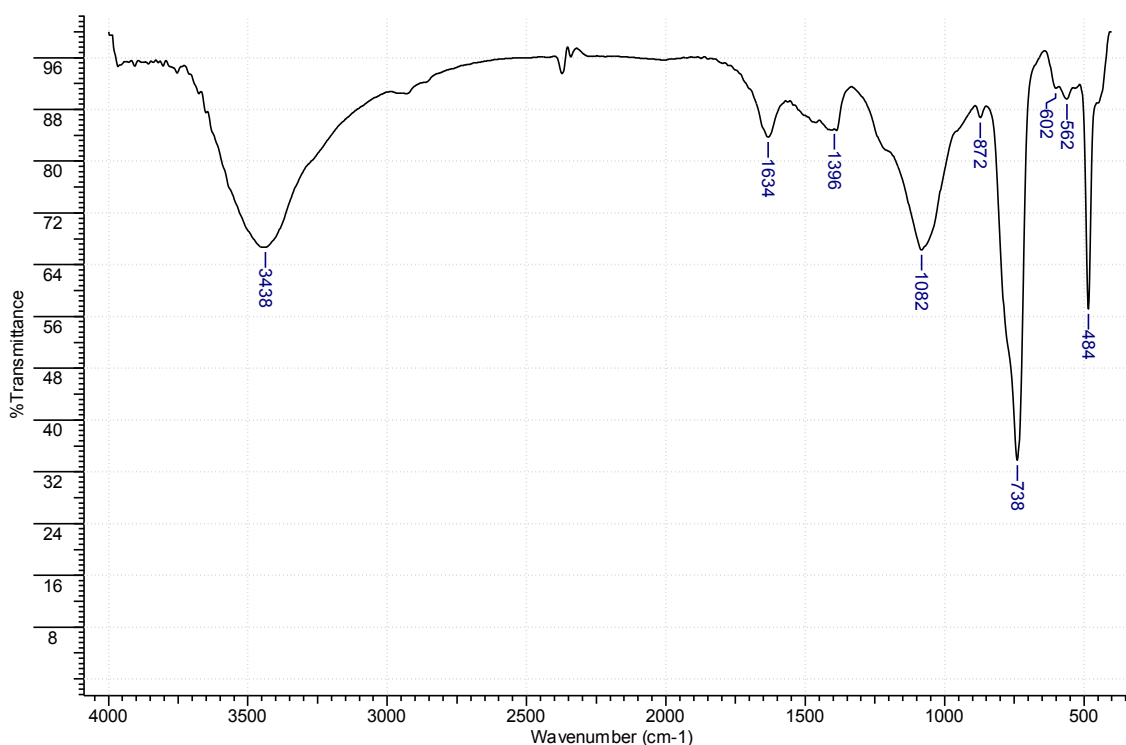


Figura 4 - Espectroscopia na região do infravermelho, Biogran<sup>®</sup> 72 h, demonstrando a presença de bandas entre 560 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , compatíveis com a presença de hidroxiapatita.



Figura 5 – Espectroscopia na região do infravermelho, biovidro 72 h, demonstrando a presença de bandas entre 560 a 600 cm-1, compatíveis com a presença de hidroxapatita.

### 7.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia Eletrônica de varredura demonstrou que a superfície do biovidro é, de certa maneira, mais porosa do que a do Biogran<sup>®</sup> que, por sua vez, apresenta uma superfície mais granular. (Figura 6)

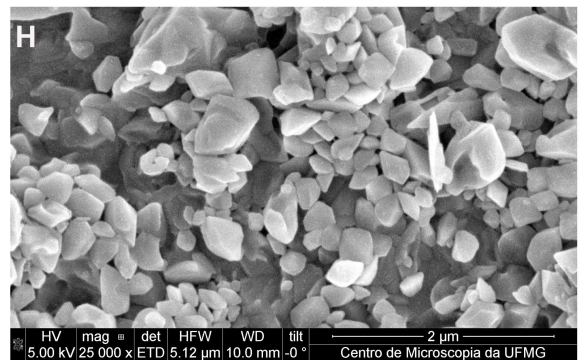
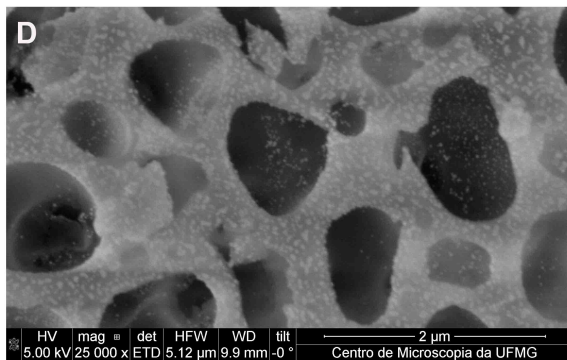
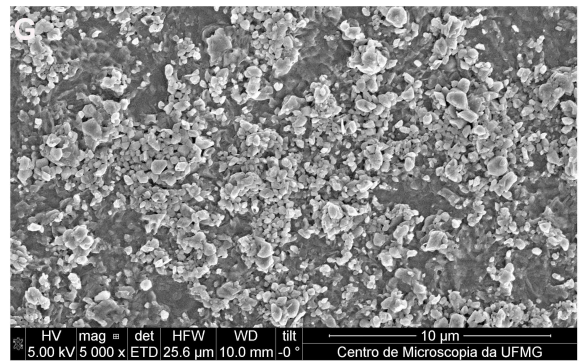
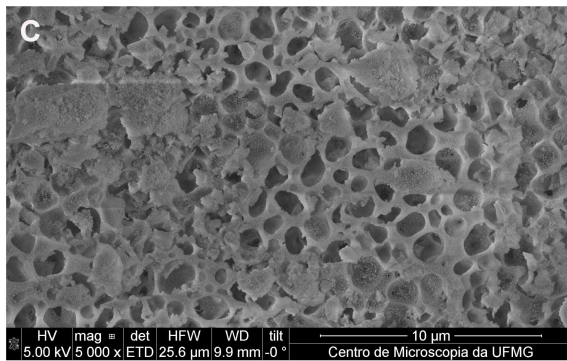
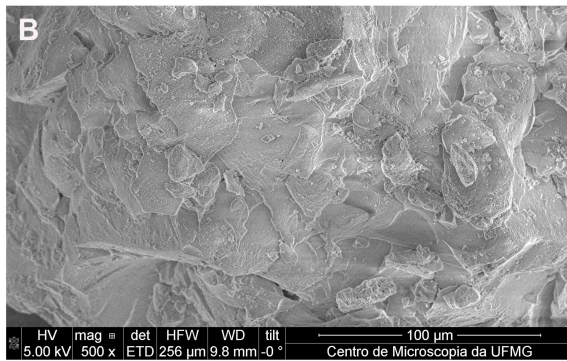
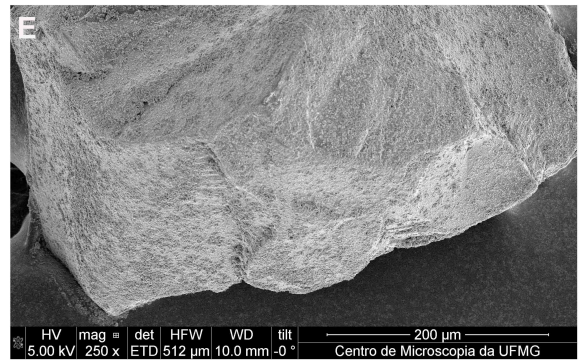
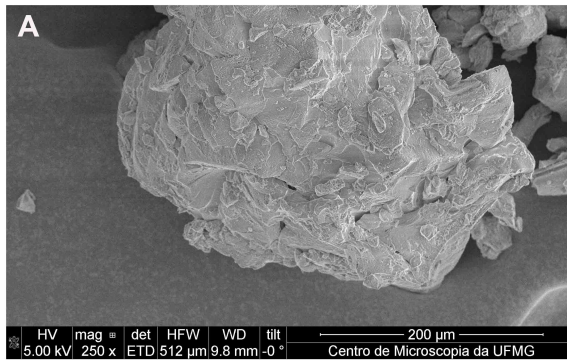


Figura 6 – Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) do biovidro teste (A a D) e do Biogran® (E a H)

### 7.1.3 EDS (Energy Dispersive Spectroscopy)

O teste de espectroscopia por dissipação de energia demonstrou que o Biogran<sup>®</sup> apresentou picos de cálcio, carbono, oxigênio, sódio, silício, e fósforo nesse ensaio. (figura 7)

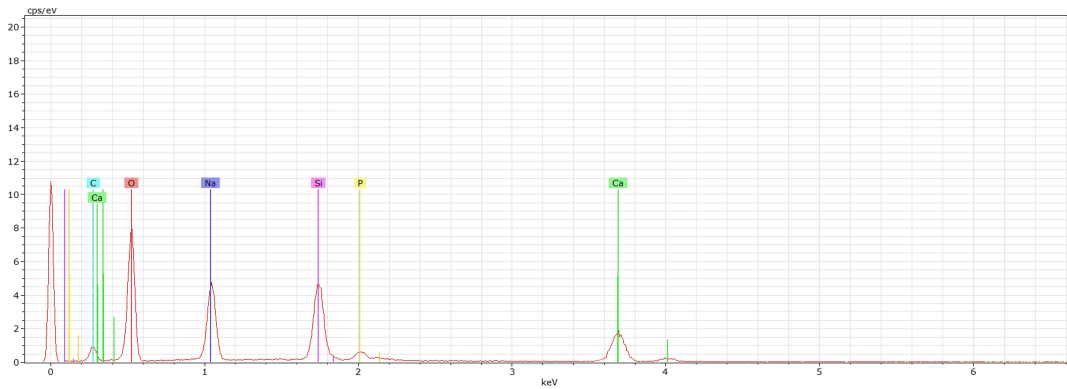


Figura 7 – Resultado de EDS do Biogran<sup>®</sup>

O ensaio de espectroscopia por dispersão de energia, demonstrou que o biovidro apresenta picos de carbono, cálcio, cloro, oxigênio e fósforo. (figura 8).

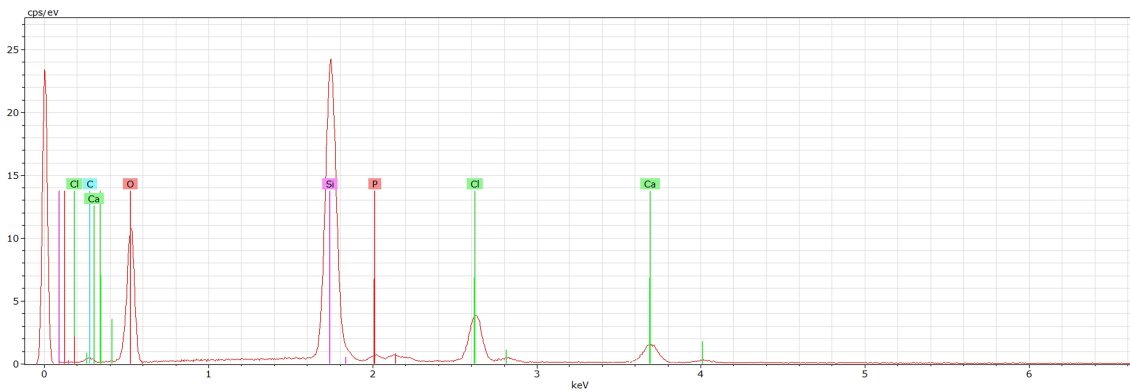


Figura 8 – Resultado EDS do biovidro teste

#### 7.1.4 Fluorescência de Raios X

A fluorescência de Rx detectou grande porcentagem de SiO<sub>2</sub> no biovidro (90,1%) enquanto no Biogran<sup>®</sup> o valor foi de 41,4%. Já a quantidade de CaO foi bastante superior no Biogran<sup>®</sup>(27,2%) em comparação ao biovidro (3,0%) (Tabela 3).

Tabela 3 – Resultado da fluorescência de Rx do Biogran<sup>®</sup> e do biovidro

ELEMENTO	Biogran <sup>®</sup> (%)	Biovidro (%)
CO <sub>2</sub>	0,74	1,9
Na <sub>2</sub> O	24,8	0
MgO	0,07	0
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,024	0,011
SiO <sub>2</sub>	41,4	90,1
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	5,6	2,3
SO <sub>3</sub>	0,018	0,02
Cl	0,009	2,7
K <sub>2</sub> O	0	0,003
CaO	27,2	3,0
Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0	0
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,009	0,03
NiO	0,004	0,004
SrO	0,006	0,004

## 7.2 Análise Histológica

As lâminas coradas por hematoxilina e eosina (HE) foram analisadas por microscopia óptica (Axio Scope. A1, Carl Zeiss MicroImaging GmbH 37081, Gottingen, Alemanha) de acordo com os tempos de eutanásia.

### 7.2.1 7 dias

As imagens das lâminas do grupo controle negativo, de uma semana de eutanásia, demonstraram que, da periferia para o centro, encontramos tecido ósseo lamelar/maduro, tecido osteóide (osso imaturo) e, bem ao centro, tecido conjuntivo celularizado (tecido de reparo) (figura 9).

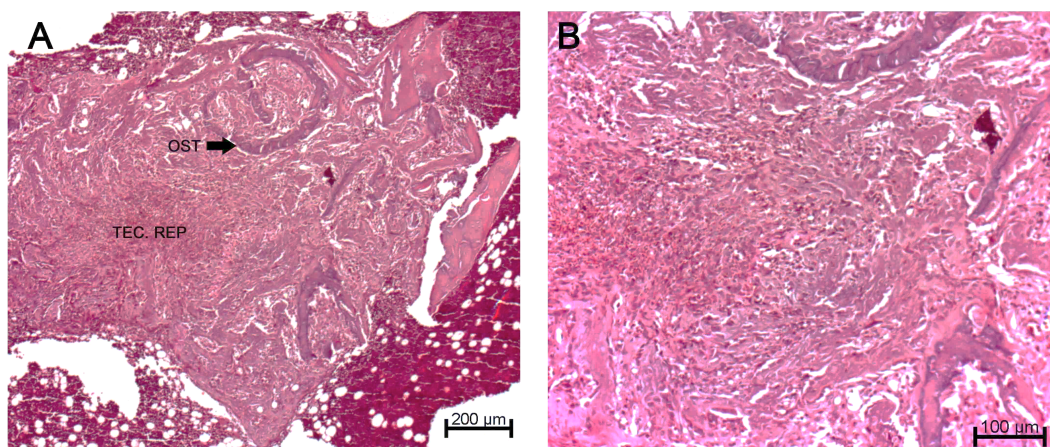


Figura 9 – Histologia do defeito ósseo com 7 dias, controle negativo. TEC REP – tecido de reparação e OST – material osteóide. Coloração HE. Aumento A - 50X e B – 100X

Lâminas do grupo Biogran<sup>®</sup> apresentaram imagem negativa do local preenchido pelo material, e uma formação de osso imaturo em contato com os grãos do material. Fissuras dentro dos grãos sugerem estar sendo ocupadas pelo tecido conjuntivo (figura 10).

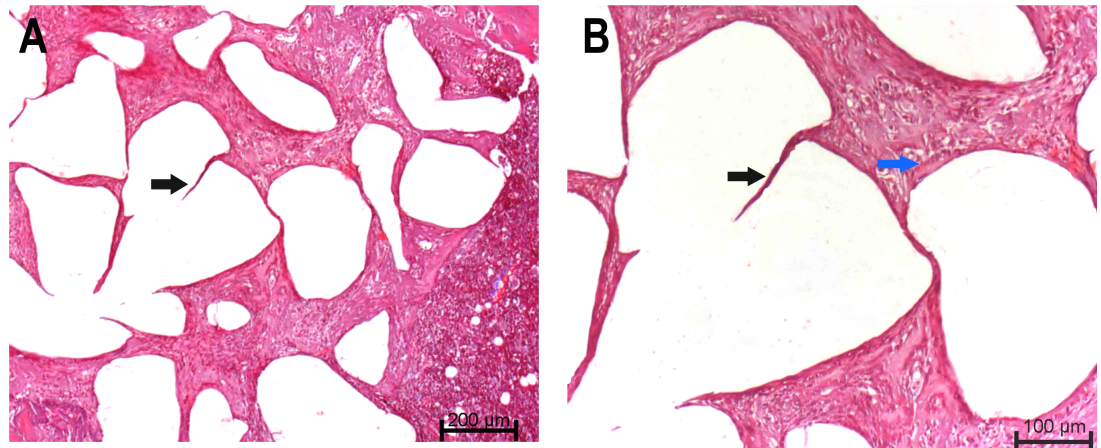


Figura 10 - Histologia do defeito ósseo com 7 dias, Biogran®. Setas pretas indicam as fissuras do biomaterial e a seta azul indica o tecido osteóide em contato com o grão do material. Coloração HE. Aumento A - 50X e B – 100X

O biovidro teste apresentou histologia com a presença de osso trabeculado na periferia do defeito, material basofílico ao centro (biovidro teste) entremeado por tecido conjuntivo celularizado, pouco vascularizado, presença de células grandes, com citoplasma claro e granular, núcleo central (figura 11).

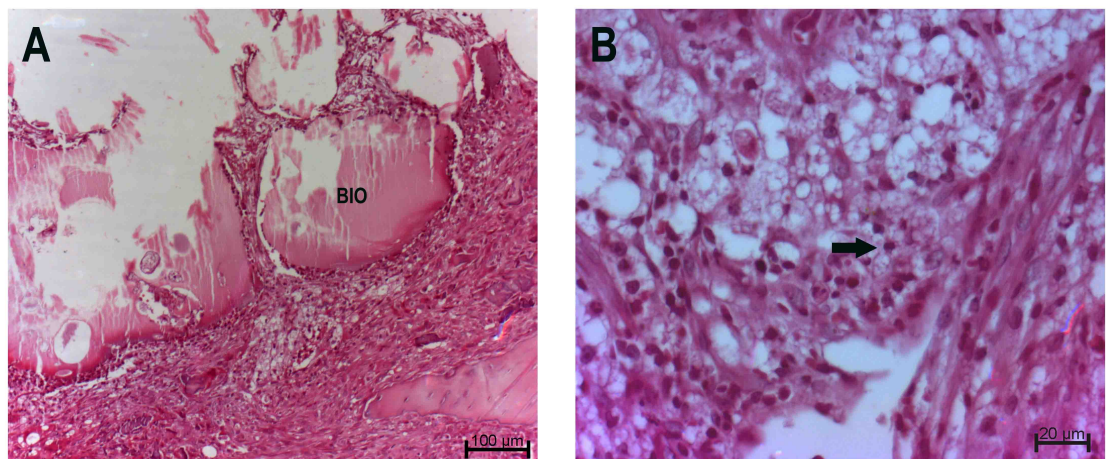


Figura 11 - Histologia do defeito ósseo com 7 dias, Biovidro. BIO – biovidro presente no defeito. Seta preta indica células grandes com citoplasma granular. Coloração HE. Aumento A - 100X e B – 400X

O osso autógeno nos primeiros 7 dias tem características muito semelhantes ao controle negativo, se diferenciando pela presença de partículas de osso enxertado (figura 12).

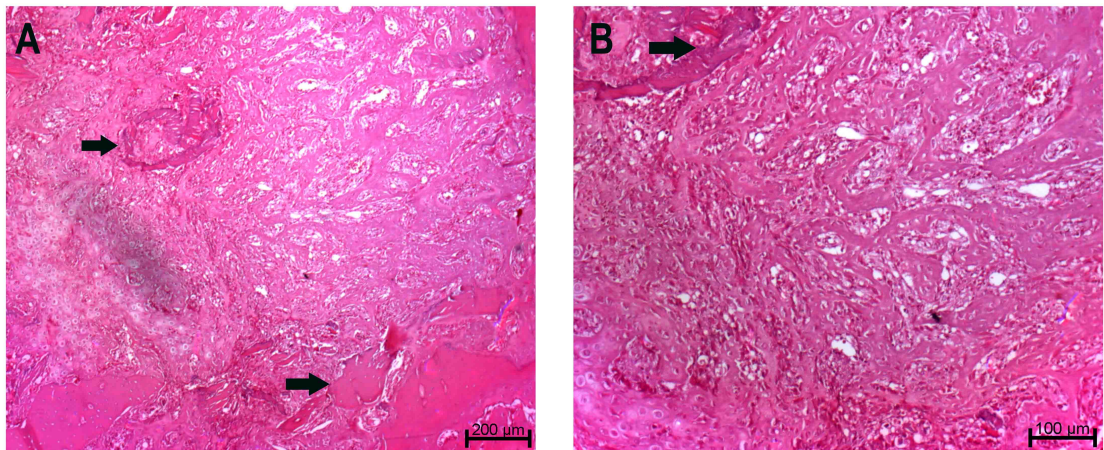


Figura 12 - Histologia do defeito ósseo com 7 dias, Controle positivo (autógeno). Setas pretas indicam osso autógeno enxertado no defeito. Coloração HE. Aumento A - 50X e B - 100X

### 7.2.2 14 dias

No grupo do controle negativo temos um quadro parecido com o tempo de 7 dias, mas com menos lamelas ósseas e mais tecido conjuntivo.

Aos 14 dias, os grãos de Biogran<sup>®</sup> continuam presentes e junto aos mesmos podemos notar o contato direto com osso um pouco mais maduro.

Quanto ao biovidro teste as lâminas revelaram a presença de osso neoformado com características mais maduras. As trabéculas ósseas não estão em contato tão íntimo com o material quando comparadas ao Biogran<sup>®</sup>.

O osso autógeno já não é encontrado com muita facilidade aos 14 dias de eutanásia (figura 13).

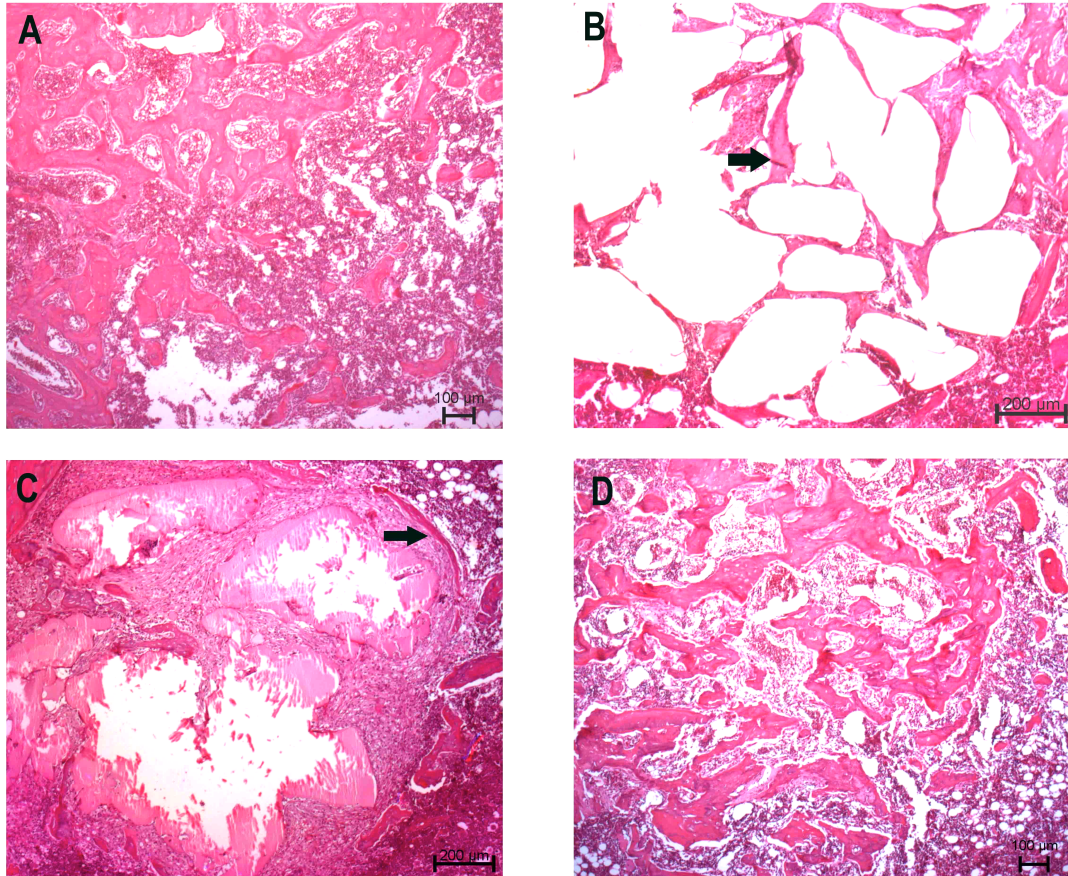


Figura 13 - Histologia do defeito ósseo com 14 dias, A - Controle negativo, B - Biogran® (seta indicando osso neoformado), C – Biovidro teste ( seta indicando osso neoformado), D – Controle positivo (autógeno). Coloração HE. Aumentos de 50X

### 7.2.3 21 dias

No controle negativo o tecido ósseo praticamente já foi totalmente remodelado e o local apresenta somente tecido hematopoiético nativo da região da medula da tibia.

O Biogran® ainda está presente e o tecido conjuntivo já aparece sendo substituído pelo tecido hematopoiético local.

No tempo de 21 dias o biovidro já se apresenta bastante degradado e um lençol de células semelhantes a macrófagos se forma no defeito.

Nesse tempo de eutanásia o osso autógeno já foi totalmente reabsorvido e o osso neoformado está presente em pequena quantidade (figura 14).

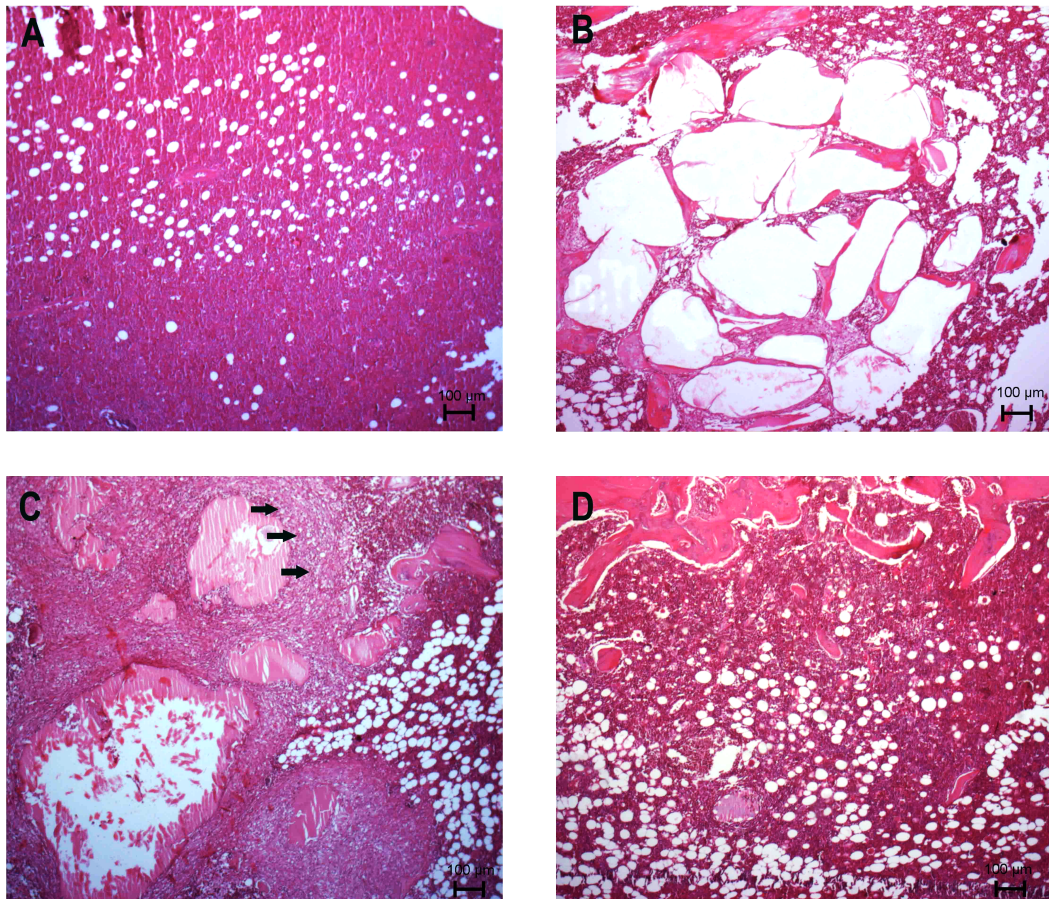


Figura 14 - Histologia do defeito ósseo com 21 dias, A - Controle negativo, B - Biogran<sup>®</sup>, C – Biovidro teste ( seta indicando lençol de células semelhantes a macrófados), D – Controle positivo (autógeno). Coloração HE. Aumentos de 50X

#### 7.2.4 28 dias

Os grupos de controle negativo e positivo, nesse tempo, apresentam lâminas que se parecem muito com o tecido primitivo hematopoiético, enquanto imagens negativas de grânulos de Biogran<sup>®</sup> aparecem, com trincas intragranulares povoadas por células ósseas. O osso neoformado aparece em íntimo contato com esses grânulos. Nesse estágio o grupo do biovidro, já quase todo degradado, apresenta ainda uma imagem compatível com lençóis de células semelhantes a macrófagos (figura 15).

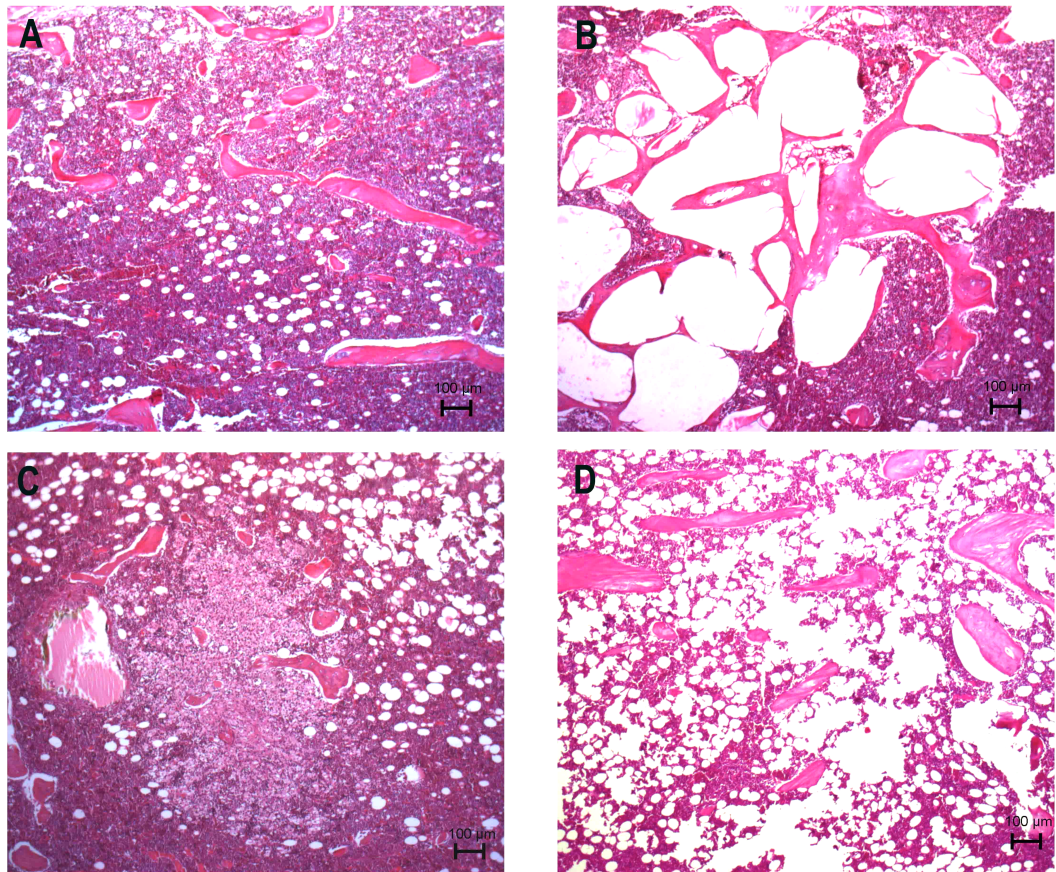


Figura 15 - Histologia do defeito ósseo com 28 dias, A - Controle negativo, B - Biogran<sup>®</sup>, C – Biovidro teste, D – Controle positivo (autógeno). Coloração HE. Aumentos de 50X

### 7.2.5 49 dias

Como já descrito no tempo anterior, os grupos de controle positivo e negativo apresentam nas lâminas um aspecto de tecido hematopoiético similar ao original.

O grupo do Biogran<sup>®</sup> continua com osso em íntimo contato com seus grânulos, e o do biovidro apresenta uma diminuição das células semelhantes a macrófagos (figura 16).

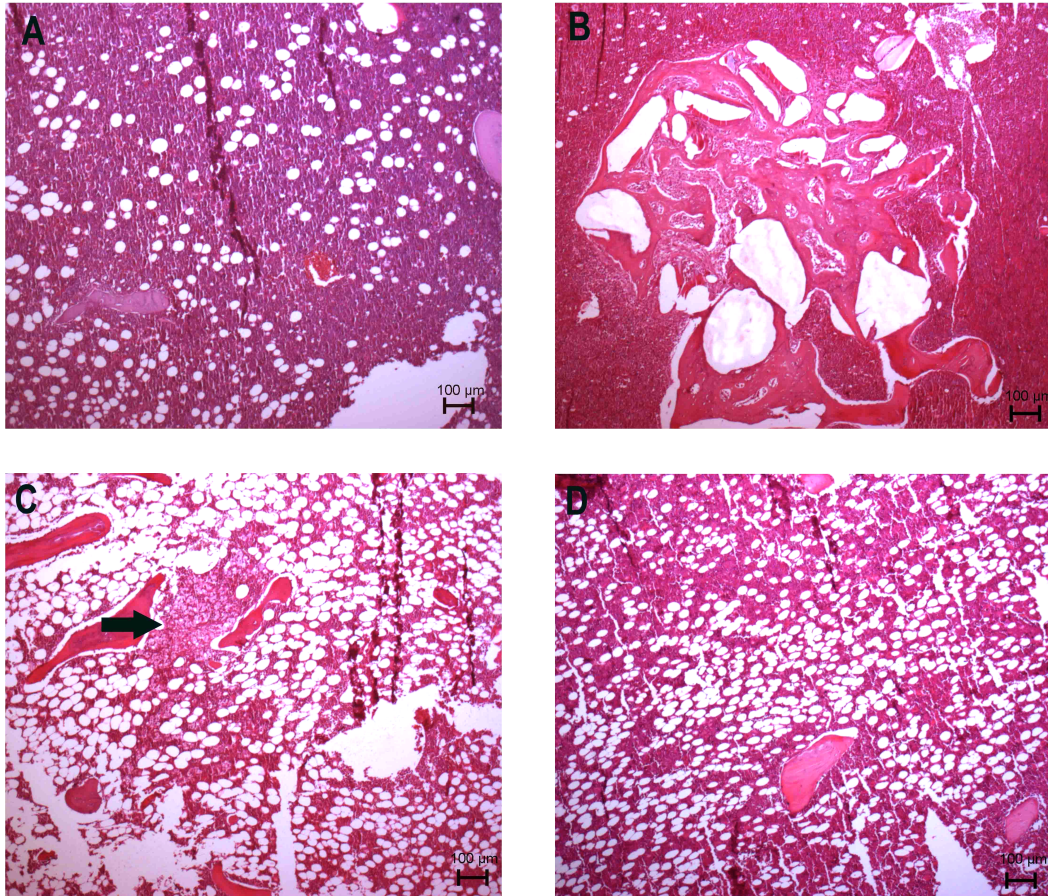


Figura 16 - Histologia do defeito ósseo com 49 dias, A - Controle negativo, B - Biogran<sup>®</sup>, C – Biovidro teste (seta indicando a presença do lençol de células semelhantes a macrófagos), D – Controle positivo (autógeno). Coloração HE. Aumentos de 50X

### 7.2.6 70 dias

Com 70 dias de eutanásia os grupos controle estão inalterados, já o do Biogran<sup>®</sup> apresenta osso em íntimo contato com o material. O grupo de biovidro apresenta raras lamelas ósseas em íntimo contato com o que restou do lençol de células semelhantes a macrófagos (figura 17).

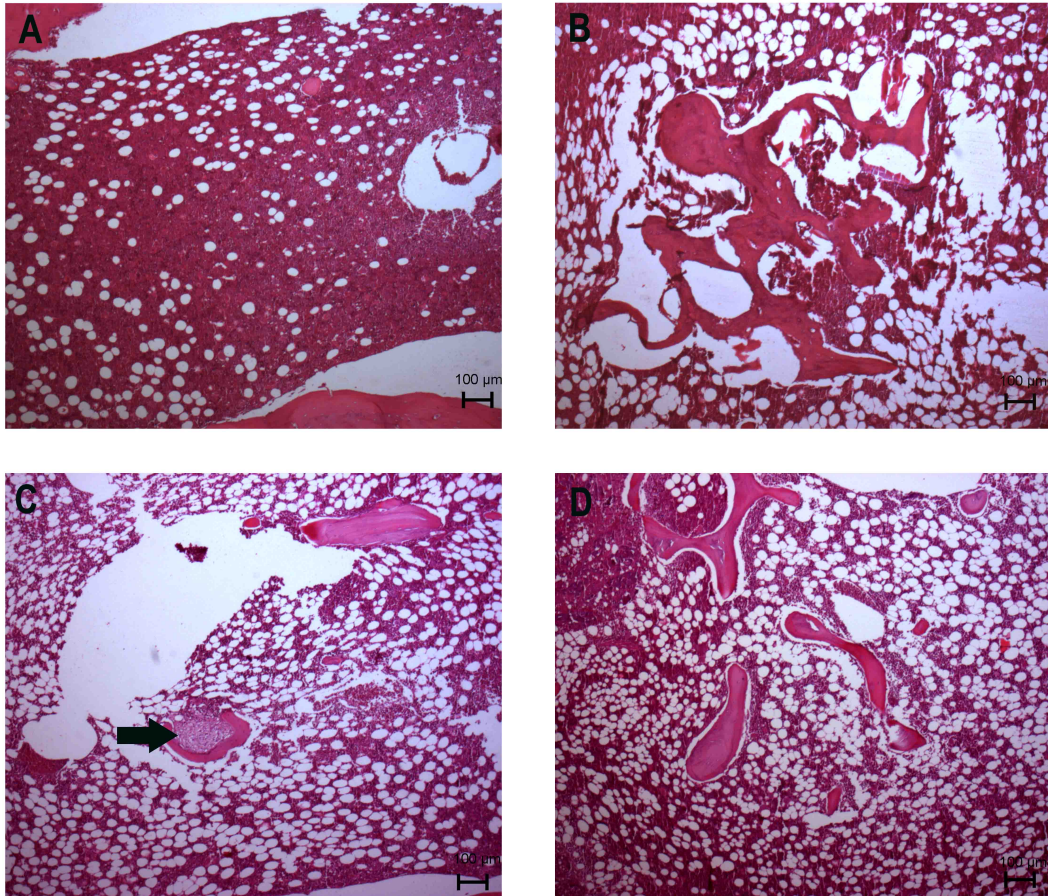


Figura 17 - Histologia do defeito ósseo com 70 dias, A - Controle negativo, B - Biogran<sup>®</sup>, C – Biovidro teste ( seta indicando lençol de células semelhantes a macrófados), D – Controle positivo (autógeno). Coloração HE. Aumentos de 50X

### 7.2.7 Análise de infiltrado inflamatório

O infiltrado inflamatório se mostrou de suave a moderado em todos os grupos e tempos cirúrgicos onde havia a presença de substitutos ósseos. Naqueles sítios onde já não havia material ou osso neoformado, o infiltrado inflamatório estava classificado como nenhum.

A presença de células gigantes (figura 18) e multinucleadas foram visualizadas em algumas lâminas dos grupos:

- Controle negativo (7 dias),
- Biogran<sup>®</sup> (7, 14, 28 e 49 dias),
- Biovidro teste (7, 14, 21 e 28 dias),
- Controle positivo (7 e 14 dias).

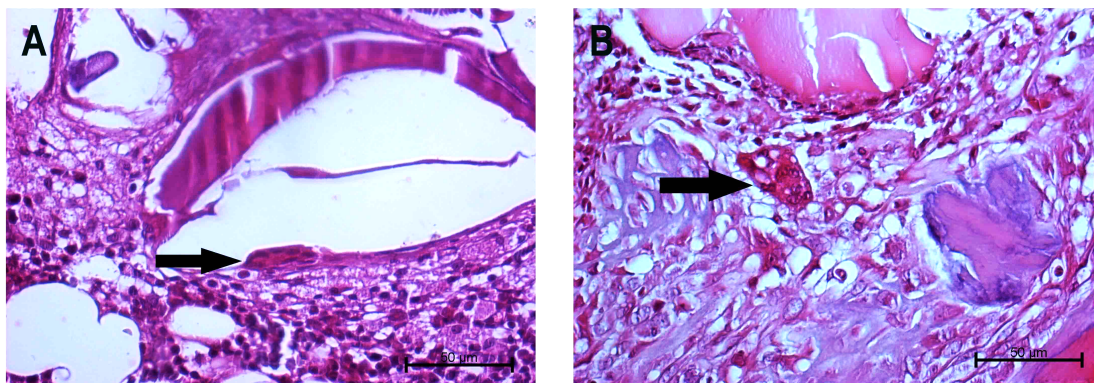


Figura 18- Histologia das células multinucleadas (setas) A- Biogran<sup>®</sup>, 49 dias, B- Biovidro 14 dias

### 7.3 Análise histométrica

As lâminas para essa análise foram coradas com tricrômio de Masson e foram analisadas por microscopia ótica (Standard 25, Carl Zeiss MicroImaging GmbH 37081, Gottingen, Alemanha). A análise histométrica foi realizada medindo-se a área de osso neoformado e sua porcentagem, frente à área disponível no defeito para sua formação. Os resultados foram tabulados de acordo com os tempos de eutanásia.

#### 7.3.1 7 dias

Nas análises de uma semana, a maior porcentagem de formação óssea nas áreas disponíveis nos defeitos, retirando-se as áreas preenchidas por substitutos ósseos, foi a do grupo controle negativo, seguido pelo grupo do controle positivo. Os grupos de biomateriais ficaram com menos formação óssea (tabela 4).

Tabela 4- Porcentagens das áreas de osso neoformado com desvio padrão em 7 dias

Grupo	Média (DP)	Valor de p*
Controle negativo	54,40 (11,63)% A	0,019
Biogran <sup>®</sup>	34,20 (11,45)% B	
Biovidro teste	21,00 (16,57)% A	
Controle positivo	37,20 (17,71)% C	

\*ANOVA e pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Letras iguais representam diferenças estatisticamente significativas entre as médias na comparação pareada entre cada grupo

### 7.3.2 14 dias

Quando os grupos foram analisados no tempo de 14 dias, a porcentagem de formação óssea nas áreas disponíveis nos defeitos, retirando-se as áreas preenchidas por substitutos ósseos, apresentou um comportamento diferente (tabela 5). A maior porcentagem foi do Biogran<sup>®</sup>, seguido pelo controle positivo, controle negativo e biovidro teste.

Tabela 5- Porcentagens das áreas de osso neoformado com desvio padrão em 14 dias

Grupo	Média (DP)	Valor de p*
Controle negativo	20,40 (8,32)% AD	<0,001
Biogran <sup>®</sup>	49,20 (5,49)% AC	
Biovidro teste	17,80 (7,79)% BCE	
Controle positivo	40,80 (17,11)% DE	

\*ANOVA e pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Letras iguais representam diferenças estatisticamente significativas entre as médias na comparação pareada entre cada grupo

### 7.3.3 21 dias

O tempo de eutanásia de 21 dias demonstrou, em relação às porcentagens de osso neoformado em espaços disponíveis, que o Biogran<sup>®</sup> teve maior porcentagem, seguido pelo biovidro teste e controles negativo e positivo (tabela 6).

Tabela 6- Porcentagens das áreas de osso neoformado com desvio padrão em 21 dias

Grupo	Média (DP)	Valor de p*
Controle negativo	6,60 (3,85)% A	<0,001
Biogran <sup>®</sup>	22,20 (4,65)% ADE	
Biovidro teste	9,00 (5,79)% BD	
Controle positivo	6,60 (2,70)% CE	

\*ANOVA e pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Letras iguais representam diferenças estatisticamente significativas entre as médias na comparação pareada entre cada grupo

### 7.3.4 28 dias

Na análise das áreas de neoformação óssea, obteve-se um resultado onde a presença óssea do grupo do Biogran<sup>®</sup> foi a maior, seguida da do biovidro teste (tabela 7). Todavia observamos que essa relação, nesse tempo de eutanásia, não produziu uma significância estatística  $p > 0,05$ .

Tabela 7- Porcentagens das áreas de osso neoformado com desvio padrão em 28 dias

<b>Grupo</b>	<b>Média (DP)</b>	<b>Valor de p*</b>
<b>Controle negativo</b>	<b>2,24 (1,92)%</b>	<b>0,255</b>
<b>Biogran<sup>®</sup></b>	<b>20,71 (27,22)%</b>	
<b>Biovidro teste</b>	<b>12,06 (7,71)%</b>	
<b>Controle positivo</b>	<b>7,39 (4,64)%</b>	

\*ANOVA e pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

### 7.3.5 49 dias

No tempo de eutanásia de 49 dias, foi encontrado uma maior quantidade óssea no grupo de Biogran<sup>®</sup>, seguido pelo grupo de biovidro. Os grupos controles tiveram similaridade numérica (tabela 8).

Tabela 8- Porcentagens das áreas de osso neoformado com desvio padrão em 49 dias

<b>Grupo</b>	<b>Média (DP)</b>	<b>Valor de p*</b>
<b>Controle negativo</b>	<b>6,09 (5,81)% A</b>	<b>0,036</b>
<b>Biogran<sup>®</sup></b>	<b>23,58 (7,27)% BE</b>	
<b>Biovidro teste</b>	<b>15,60 (17,62)% C</b>	
<b>Controle positivo</b>	<b>5,30 (4,18)% DE</b>	

\*ANOVA e pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Letras iguais representam diferenças estatisticamente significativas entre as médias na comparação pareada entre cada grupo

### 7.3.6 70 dias

No último tempo de eutanásia, foi observado que o Biogran<sup>®</sup> ainda estava relacionado com a maior quantidade de osso presente no defeito, seguido pelos outros grupos estatisticamente semelhantes (tabela 9).

Tabela 9- Porcentagens das áreas de osso neoformado com desvio padrão em 70 dias

<b>Grupo</b>	<b>Média (DP)</b>	<b>Valor de p*</b>
<b>Controle negativo</b>	<b>4,48 (2,20)% A</b>	<b>0,048</b>
<b>Biogran<sup>®</sup></b>	<b>15,67 (13,84)% BE</b>	
<b>Biovidro teste</b>	<b>5,31 (2,80)% C</b>	
<b>Controle positivo</b>	<b>2,72 (1,98)% DE</b>	

\*ANOVA e pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Letras iguais representam diferenças estatisticamente significativas entre as médias na comparação pareada entre cada grupo

### 7.3.7 Neoformação óssea por material no decorrer dos tempos de eutanásia

Os materiais também foram comparados entre os grupos de eutanásia, quanto à porcentagem de formação no espaço disponível (figura 19).

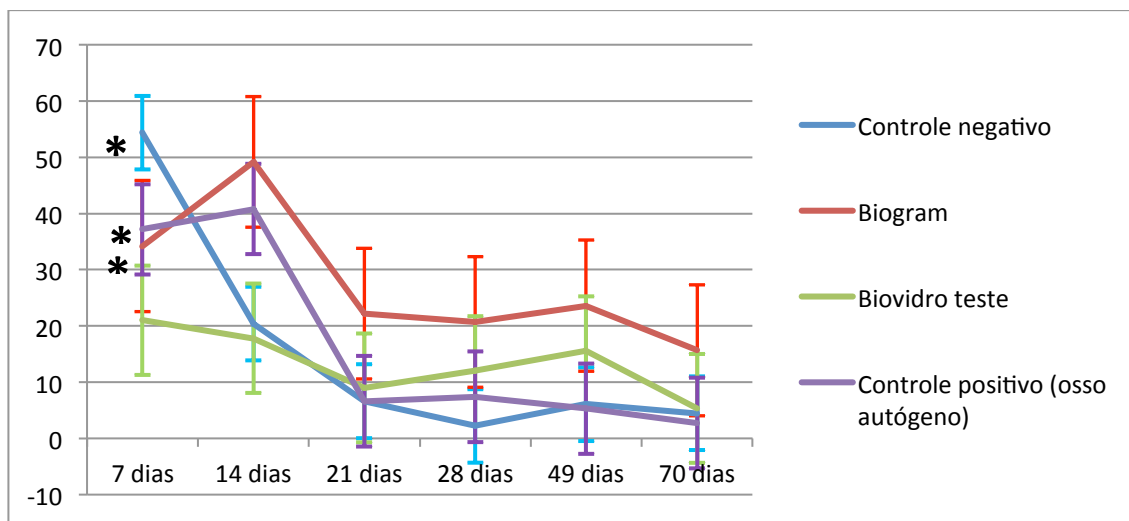


Figura 19- Gráfico comparando a formação óssea nos defeitos por porcentagem de osso neoformado, com desvio padrão médio. (\*) representa as curvas que apresentaram significância estatística [Controle negativo, Biogram® e Controle positivo]

A formação óssea no controle negativo atingiu seu ponto máximo em 7 dias, sofrendo uma diminuição crescente nos outros tempos. O grupo de Biogram® alcançou sua maior formação em 14 dias, expressando uma queda em 21 dias, mantendo-se estável até os 70 dias. O biovidro teste manteve sua formação óssea até 14 dias apresentando uma queda até 21 dias e um crescimento até 49 dias, evoluindo para uma queda até 70 dias. Há que se considerar que as amostras não tiveram um padrão com diferenças estatísticas nessa comparação ( $p > 0,05$ ). Já o controle positivo apresentou um aumento da porcentagem até 14 dias e subsequente diminuição até 21 dias, estabilizando-se até os 70 dias.

### 7.4 Manutenção dos substitutos ósseos nos defeitos

Foram colocados 10 mg de Biogram® e de biovidro nos defeitos. Quanto ao grupo de osso autógeno, os defeitos foram preenchidos por osso raspado do local. Para se acompanhar a degradação dos mesmos, foram medidas as áreas ocupadas pelos substitutos ósseos. A porcentagem dessas áreas ocupadas não apresentou uma distribuição normal segundo o teste de Shapiro-Wilk. Conseqüentemente, somente uma análise descritiva foi realizada (tabela 10).

Tabela 10- Tabela descritiva das porcentagens de materiais apresentadas em cada grupo referente aos tempos de eutanásia

<b>Grupos</b>	<b>Mediana (Intervalo interquartil)</b>
<b>7 dias</b>	
Biogran®	48 (40)%
Biovidro teste	40 (63)%
Controle positivo	3 (3)%
<b>14 dias</b>	
Biogran®	28 (43,50)%
Biovidro teste	23 (41)%
<b>21 dias</b>	
Biogran®	29 (35,50)%
Biovidro teste	0 (18)%
<b>28 dias</b>	
Biogran®	20 (31,50)%
<b>49 dias</b>	
Biogran®	15 (13,00)%
<b>70 dias</b>	
Biogran®	0 (0,18)%

O Biogran® fez-se presente em todos os tempos de eutanásia, mas sua quantidade diminuiu drasticamente aos 70 dias. Já o biovidro teste esteve presente até os 21 dias. O osso autógeno somente foi encontrado no tempo de 7 dias de eutanásia.

### **7.5 Correlação entre osso neoformado e substituto ósseo presente no defeito**

Após o teste de correlação de Spearman, constatou-se que somente o Biogran® e o osso autógeno apresentaram correlação com a área de osso neoformado no defeito.

O Biogran<sup>®</sup>, em relação ao osso neoformado, demonstrou uma correlação positiva moderada, onde  $\rho = 0,490$  e  $p=0,006$ . Já o osso autógeno apresentou uma correlação positiva moderada em relação ao osso neoformado, onde  $\rho = 0,483$ ,  $p=0,007$ .

## 7.6 ELISA

Os resultados do ensaio ELISA para BMP-2 obteve resultados de acordo com os tempos de eutanásia. Os valores encontrados se mostraram em um padrão de normalidade, mas, dentro dos tempos de eutanásia, os valores de  $p$  ficaram superiores a 0,05.

### 7.6.1 7 dias

No tempo de eutanásia de uma semana, o Biogran<sup>®</sup> e o biovidro teste se mostraram mais eficazes para a liberação de BMP-2, seguidos pelo controle negativo e por último pelo controle positivo (tabela 11).

Tabela 11- Quantidade de BMP-2 nas amostras com desvio padrão em 7 dias

Grupo	Média (DP)	Valor de p*
Controle negativo	418,80 (301,83)pg/mL	0,871
Biogran <sup>®</sup>	471,95 (238,40)pg/mL	
Biovidro teste	471,39 (238,50)pg/mL	
Controle positivo	346,55 (263,64)pg/mL	

\*ANOVA e pós-teste de Tukey ( $p<0,05$ )

### 7.6.2 14 dias

O biovidro teste se mostrou mais eficaz em duas semanas, seguido pelo controle negativo, Biogran<sup>®</sup> e pelo controle positivo (tabela 12).

Tabela 12- Quantidade de BMP-2 nas amostras com desvio padrão em 14 dias

Grupo	Média (DP)	Valor de p*
Controle negativo	274,45 (193,94)pg/mL	0,157
Biogran <sup>®</sup>	169,15 (88,09)pg/mL	
Biovidro teste	402,65 (218,63)pg/mL	
Controle positivo	89,42 (63,41)pg/mL	

\*ANOVA e pós-teste de Tukey ( $p<0,05$ )

### 7.6.3 21 dias

Em 21 dias foram encontrados os maiores níveis de BMP-2 no grupo de controle positivo, seguido do grupo de controle negativo, biovidro teste e Biogran<sup>®</sup> (tabela 13).

Tabela 13- Quantidade de BMP-2 nas amostras com desvio padrão em 21 dias

Grupo	Média (DP)	Valor de p*
Controle negativo	305,19 (12,38)pg/mL	0,300
Biogran <sup>®</sup>	120,67 (111,31)pg/mL	
Biovidro teste	163,93 (70,88)pg/mL	
Controle positivo	407,57 (355,39)pg/mL	

\*ANOVA e pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

### 7.6.4 28 dias

No tempo de eutanásia de 28 dias, houve uma significância estatística frente aos outros grupos, mas somente entre o Controle negativo e o Biogran<sup>®</sup>. O controle negativo obteve os maiores níveis de BMP-2, seguido do biovidro teste, controle positivo e Biogran<sup>®</sup> (tabela 14).

Tabela 14- Quantidade de BMP-2 nas amostras com desvio padrão em 28 dias

Grupo	Média (DP)	Valor de p*
Controle negativo	346,36 (226,99)pg/mL A	0,035
Biogran <sup>®</sup>	75,46 (16,63)pg/mL A	
Biovidro teste	106,47 (1,17)pg/mL B	
Controle positivo	84,05 (26,84)pg/mL C	

\*ANOVA e pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Letras iguais representam diferenças estatisticamente significativas entre as médias na comparação pareada entre cada grupo

### 7.6.5 49 dias

Os níveis de BMP-2, foram decrescendo em relação aos tempos anteriores, já nesse, o Biogran<sup>®</sup> apresentou o maior nível, seguido pelo controle negativo, biovidro teste e controle positivo (tabela 15).

Tabela 15- Quantidade de BMP-2 nas amostras com desvio padrão em 49 dias

<b>Grupo</b>	<b>Média (DP)</b>	<b>Valor de p*</b>
<b>Controle negativo</b>	<b>117,82 (57,06)pg/mL</b>	<b>0,133</b>
<b>Biogran<sup>®</sup></b>	<b>157,80 (92,64)pg/mL</b>	
<b>Biovidro teste</b>	<b>88,40 (8,44)pg/mL</b>	
<b>Controle positivo</b>	<b>33,10 (35,56)pg/mL</b>	

\*ANOVA e pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

### 7.6.6 70 dias

O último tempo de eutanásia apresentou pequenos níveis de BMP-2; no controle negativo a quantidade foi omitida em virtude de sua pequena concentração na amostra. O Biogran<sup>®</sup> atingiu o maior nível no tempo de eutanásia de 70 dias, seguido pelo biovidro teste e o controle positivo (tabela 16).

Tabela 16- Quantidade de BMP-2 nas amostras com desvio padrão em 70 dias

<b>Grupo</b>	<b>Média (DP)</b>	<b>Valor de p*</b>
<b>Controle negativo</b>	<b>Omitida</b>	<b>0,198</b>
<b>Biogran<sup>®</sup></b>	<b>50,50 (45,77)pg/mL</b>	
<b>Biovidro teste</b>	<b>31,68 (27,46)pg/mL</b>	
<b>Controle positivo</b>	<b>12,46 (11,89)pg/mL</b>	

\*ANOVA e pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

### 7.6.7 Níveis de BMP-2 no decorrer dos tempos de eutanásia.

Comparados os níveis de BMP-2 no decorrer dos tempos de eutanásia, foi achado que os mesmos são muito variáveis. O controle negativo teve seus picos em 7 e 28 dias. O Biogran<sup>®</sup>, por sua vez, estimulou mais a produção da proteína aos 7 e 49 dias, mas em níveis um pouco inferiores dos do biovidro teste que obteve maiores concentrações em 7 e 14 dias. O osso autógeno demonstrou picos em 7 e 21 dias (figura 20).

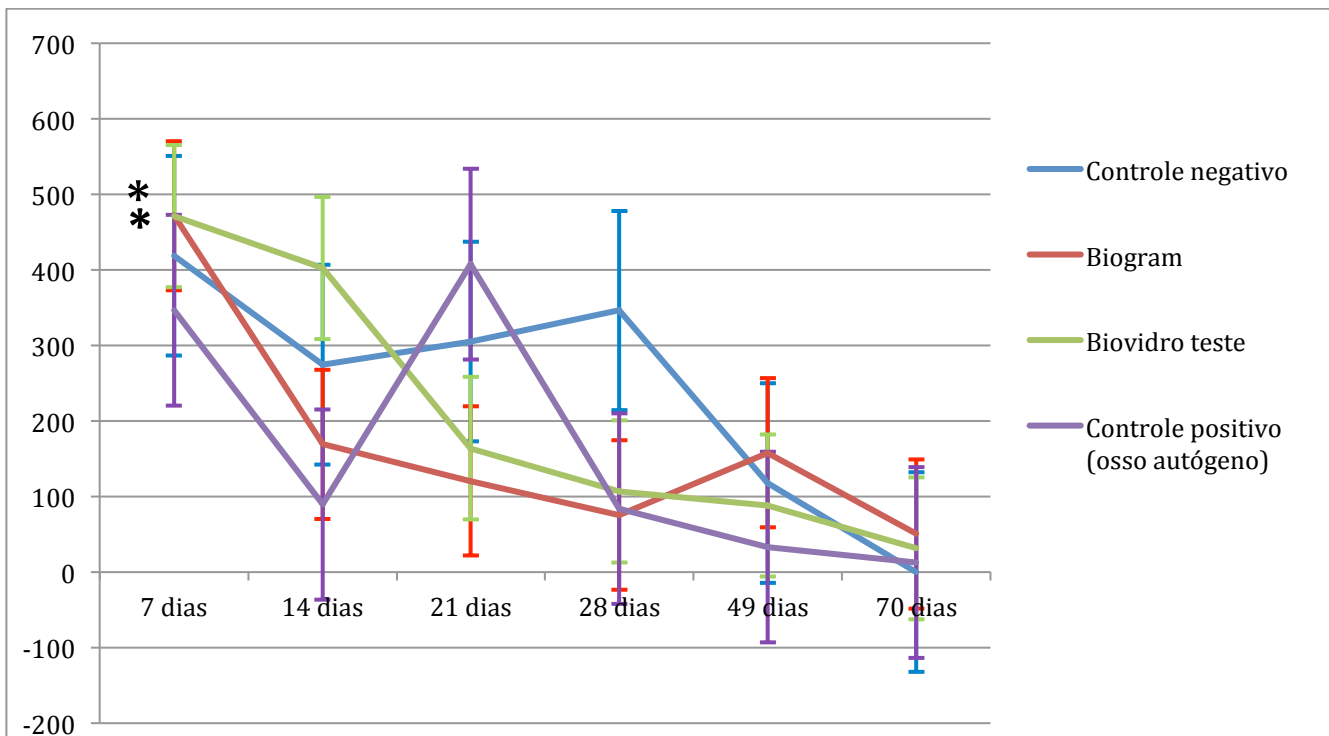


Figura 20- Gráfico comparando níveis de BMP-2 nos defeitos com desvio padrão médio. (\*) representa as curvas que apresentaram significância estatística. [Biogran® e Biovidro teste]

## 8. DISCUSSÃO

É fato incontestável que muitos testes que devem ser realizados antes da liberação do uso de novos materiais em humanos<sup>8</sup>. Neste estudo foram realizados alguns desses ensaios. O biovidro teste usado só foi submetido a estudos *in vitro*<sup>35, 36</sup>, sendo avaliado como carreador de hidrocortisona, tetraciclina entre outras substâncias. Dessa maneira esse foi o primeiro estudo *in vivo* desse material específico.

A caracterização comparativa demonstrou que o biovidro teste se assemelha ao Biogran®, já comercializado e estudado<sup>31, 40, 43</sup>. Na espectroscopia na região do infravermelho, os dois materiais demonstraram que, após 72 horas de contato com SBF, houve formação de material semelhante a hidroxiapatita. As imagens obtidas por MEV mostraram que o biovidro possui mais porosidade que o Biogran®, o que pode indicar a possibilidade de ancoragem celular nessas áreas e que substâncias diversas, adicionadas no momento de sua síntese, podem ser armazenadas nesses locais. No ensaio de EDS, elementos como cálcio, carbono, oxigênio e fósforo foram encontrados em ambos. Na fluorescência de Rx foi observado que a composição do Biogran® (41,4% SiO<sub>2</sub>, 24,8% Na<sub>2</sub>O, 27,2 CaO,

5,6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), ficou mais próxima da composição do Biovidro 45S5 de Hench (45% SiO<sub>2</sub>, 24,5% Na<sub>2</sub>O, 24,5% CaO, 6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) do que o biovidro (90,1% SiO<sub>2</sub>, 0% Na<sub>2</sub>O, 3,0% CaO, 2,3% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)<sup>23, 24, 25, 26</sup>. Com mais cálcio e fósforo em sua composição básica, houve uma maior área de formação óssea no grupo do Biogran<sup>®</sup> em comparação ao biovidro. Isso se explica, em parte, pela presença dos íons de cálcio e fósforo que podem ter participado desse processo de ossificação.

Experimentos com animais têm grande dificuldade de apresentar reprodutibilidade em seres humanos. A escolha do modelo experimental é de grande importância para que haja essa reprodutibilidade. O modelo escolhido para esse estudo se utilizou de defeitos de tíbia<sup>18,40</sup> pois, de acordo com Borrasca *et al.* (2015)<sup>13</sup>, esse seria o modelo mais próximo de um defeito ósseo alveolar, em comparação com um defeito crítico de calota.

As imagens das lâminas do trabalho de Ribeiro *et al.* (2008)<sup>43</sup>, são muito similares às imagens reveladas no presente estudo. No citado trabalho, os tempos de eutanásia foram de 10 e 30 dias, e a coloração realizada foi de hematoxilina e eosina (HE). Quanto aos grupos experimentais, somente foram realizados grupos de controle negativo e Biogran<sup>®</sup>. A histologia de 7 dias desse estudo demonstrou as mesmas características do grupo de 10 dias do referido artigo. Já o tempo de 21 e 28 dias demonstraram semelhança com o grupo de 30 dias do trabalho de Ribeiro *et al.* (2008)<sup>43</sup>. Frente ao exposto a reprodutibilidade foi conseguida.

A histologia desse estudo apresentou um ciclo no controle negativo onde houve neoformação óssea em 7 a 14 dias e depois em 21 dias, esse osso estava praticamente reabsorvido. No controle positivo as partículas de enxerto estavam presentes até os 7 dias, de acordo com o relatado por Borrasca *et al.* (2015)<sup>13</sup>. A presença de osso esteve em maior grau nos 14 dias, mas em 21 dias o mesmo já estava praticamente todo reabsorvido, o que foi de encontro ao relatado por esse mesmo autor<sup>13</sup>.

O uso de biomateriais parece retardar um pouco esse processo, principalmente nos grupos de Biogran<sup>®</sup> e biovidro teste.

O grupo de Biogran<sup>®</sup> mostrou o início de neoformação óssea em 7 dias, tendo seu pico em 14 dias e uma queda em 21 dias com estabilidade até 70 dias. Foi observado em comparação com a porcentagem de material remanescente,

que a presença desse material no defeito, de certa maneira, mantinha o osso neoformado no sítio. Quando esses grãos foram degradados, o osso local foi reabsorvido também.

No biovidro a maior formação óssea se deu em dois momentos, 7 dias e 49 dias. Em uma semana houve a formação óssea no defeito sem muito contato com o material. Em 28 dias foi possível observar que um lençol de células semelhantes a macrófagos se formou no defeito. Em 49 dias e até em 70 dias, foi visualizado osso neoformado em contato com essas células. A hipótese levantada foi a de que essas células participaram ou induziram a ossificação no local. Em 70 dias quase não se viu osso neoformado nesse grupo. A migração de células semelhantes a macrófagos no sítio do defeito ósseo preenchido pelo biovidro teste, pode ser explicada pela sua degradação. Produtos desta degradação podem ter atuado como irritantes dos tecidos adjacentes, produzindo uma reação de recrutamento desses tipos celulares para o local.

A degradação dos substitutos ósseos e a remodelação do osso neoformado podem estar relacionados com a presença das células gigantes multinucleadas presentes na histologia dos grupos.

Os resultados do ensaio ELISA obtiveram distribuição normal, mas não obtiveram significância estatística quando comparados dentro dos tempos de eutanásia. Isso se deu, possivelmente, pelo pequeno número de amostras realizadas (3 por grupo). Mesmo assim, tais resultados foram usados para se ter uma idéia do que se pode obter em relação à liberação de BMP-2 nos defeitos, e se algum material apresentou papel osteoindutor.

O grupo do controle negativo obteve maiores níveis de BMP-2 em 7 e 28 dias. A proteína liberada em 7 dias, possivelmente participou na neoformação óssea de 14 dias. Já a liberação de 28 dias, não parece estar associada a nenhum tipo de ossificação, pois não há osso neoformado nos tempos subsequentes de acordo com a histomorfometria.

Níveis de BMP-2 no grupo de Biogran<sup>®</sup> obtiveram o seu pico máximo em 7 dias, tendo uma queda até 28 dias e um ligeiro pico em 49 dias que decaiu em 70 dias. A produção de BMP-2 em 7 dias possivelmente participou da formação da maior área de osso desse grupo em 14 dias. Nos outros tempos, possivelmente não houve influência da BMP-2 na neoformação óssea.

O biovidro obteve maior liberação de BMP-2 nos tempos de 7 e 14 dias. Esse estímulo participou possivelmente na neoformação de 14 e 21 dias, mas não no pico de 49 dias. Nesse tempo a teoria seria que a neoformação se deu pela presença do lençol de células semelhantes a macrófagos.

No grupo do controle positivo os níveis de BMP-2 se mostraram maiores em 7 e 21 dias. Em 14 dias a área de osso neoformado pode ter sido consequência dos níveis de BMP-2 de 7 dias, já depois de 21 dias não foi encontrado muito osso nos defeitos e possivelmente a BMP-2 presente no sítio não foi suficiente para que houvesse um novo pico de neoformação óssea.

A síntese do biovidro teste, por ser realizada a temperatura ambiente, pode viabilizar a incorporação de diversas substâncias<sup>35</sup>(Andrade, 2009), sem alteração de suas características pelas altas temperaturas de síntese dos biovidros. Se isso for realizado, pode-se ter a liberação lenta e constante dessas substâncias no meio adjacente, podendo levar a uma melhora qualitativa e quantitativa da reparação óssea local. Por esse motivo é interessante que o biovidro se degrade em um tempo determinado. Nesse estudo, notou-se que a degradação do biovidro teste no sítio ósseo durou o tempo de 14 a 21 dias, sendo que o Biogran<sup>®</sup> não se degradou totalmente, pois foram detectados grãos de material em algumas amostras de 70 dias. Outra grande vantagem observada foi que o biovidro se degradou totalmente em 21 dias, e com isso, foi conquistado um maior espaço para que a formação óssea se dê naquele local. Já o Biogran<sup>®</sup> não se degrada, ocupando esse possível espaço. Desse modo, se um implante metálico for realizado no local tratado com biovidro, não haverá a possibilidade do contato desse metal com partículas de biomaterial, pois ele já estará reabsorvido. O contato do metal será somente em tecido ósseo ou hematopoiético.

Apesar de o osso xenógeno ser uma opção excepcional para enxertia na odontologia,<sup>37, 38, 39</sup> o biovidro com capacidade de carrear substâncias<sup>35, 36</sup> com posterior liberação lenta e constante das mesmas, pode ser uma melhor opção de terapia.

## **9. CONCLUSÃO**

O biovidro teste desse estudo tem particularidades benéficas. Na histologia se mostrou degradável e substituído por um tecido ósseo local, o que mostra que esse é um material osteocondutor, da mesma maneira que o Biogran<sup>®</sup>. As células gigantes encontradas na histologia, podem estar associadas a degradação do biovidro, do Biogran<sup>®</sup> e do osso local.

A histomorfometria demonstrou que nos grupos experimentais a maior neoformação óssea se deu no grupo do Biogran<sup>®</sup>, e a manutenção desse osso está ligada diretamente a manutenção do material. Já o biovidro teve sua neoformação óssea mais tardia, e a mesma se deu sem a necessidade da presença do material.

A liberação de BMP-2 no sítio, pode mostrar que o biovidro tem uma característica de osteoindução, principalmente em 7 e 14 dias.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yonamine Y., Matsuyama T., Sonomura T., Takeuchi H., Furuichi Y., Uemura M., Izumi Y., Noguchi K. Effectable application of vascular endothelial growth factor to critical sized rat calvária defects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2010, (109):225-231.
2. Santos F.A., Pochapski M.T., Martins M.C., Zenóbio E.G., Spolidoro L.C., Marcantonio Jr E. Comparison of biomaterial implants in the dental socket: histological analysis in dogs. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 2010 (12) 1: 18-25.
3. Kolk A., Handschel J., Drescher W., Rothamel D., Kloss F., Blessmann M., Heiland M., Wolff K. D., Smeets R. Current trends and future perspectives of bone substitute materials – From space holders to innovative biomaterials. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 2012. 40: 706-718.
4. Lundgren D.; Sennerby, L.; Falk, H.; Friberg, B.; Nyman, S. The use of a new bioresorbable barrier for guided bone regeneration in connection with implant installation: case reports. *Clin. Oral Implants Res*. 1994, 5(3):177-184.
5. Schallhorn, R.G. Postoperative problems associated with iliac transplants. *J. Periodontol*. 1972 43(1): 3-9.
6. Block M. S., Kent J. N. Sinus Augmentation for Dental Implants: The Use of Autogenous Bone. *J Oral Maxillofac Surg*. 1997. 55: 1281-1286.
7. Yao J., Radim S., Leboy P.S., Ducheyne P. The effect of bioactive glass content on synthesis and bioactivity of composite poly (lactic-co-glycolic acid)/ bioactive glass substrate for tissue engineering. *Biomaterials*. 2005, 26:1935-1943.
8. FDA U.S. Food and Drug Administration [internet]: Guidance for Industry and FDA Staff – Class II Special Controls Guidance Document: Dental

Bone Grafting Material Devices. [cited, 2005, April 28] Available from: <http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm071842.htm#7>.

9. Hassan K. S., Damman. Autogenous bone graft combined with poly(lactic polyglycolic acid) polymer for treatment of dehiscence around immediate dental implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009,108: e19-e25.
10. Blokhuis T. J., Arts J.J.C. Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: Definitions, facts and myths. *Injury, Int. J. Care Injured.* 2011, 42: S26-S29.
11. Sbordone C., Toti P., Guidetti F., Califano L., Santoro A., Sbordone L. Volume changes of iliac crest autogenous bone grafts after vertical and horizontal alveolar ridge augmentation of atrophic maxillas and mandibles: A 6-year computerized tomographic follow-up. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012, 70: 2559-2565.
12. Madsen M. J., Mauffrey C., Bowles N., Seligson D. Using the Proximal Ulna as a Novel Site for Autogenous Bone Graft Harvesting. *J Oral Maxillofac Surg.* 2011, 69: 1930-1933.
13. Borrasca A.G., Aranega A.M., Filho O M, Timóteo C. A. Bone repair of surgical defects filled with autogenous bone and covered with demineralized bone matrix membrane or polytetrafluoroethylene membrane in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2015,; 30: 442-449.
14. Senta H., Park H., Bergeron E., Drevelle O., Fong D., Leblanc E., Cabana F., Roux S., Grenier G., Faucheux N. Cell responses to bone morphogenetic proteins and peptides derived from them: Biomedical applications and limitations. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 2009 20: 213-222.

15. Schlegel K. A., Zimmermann R., Thorwarth M., Neukam F. W., Klongnoi B., Nkenke E., Felszeghy E. Sinus floor elevation using autogenous bone or bone substitute combined with platelet-rich plasma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007 104: e15-e25.
16. Choukroun J., Diss A., Simonpieri A., Girard M. O., Schoeffler C., Dohan S.L., Dohan A. J. J., Mouhyi J., Dohan D. M. Platelet-rich fibrina (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part V: Histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 101: 299-303.
17. Simmons C. A., Alsberg E., Hsiong S., Kim W. J., Mooney D. J. Dual factor delivery and controlled scaffold degradation enhance in vivo bone formation by transplanted bone marrow stromal cells. *Bone.* 2004 35: 562-569.
18. García-Gareta E., Coathup M.J., Blunn G.W. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone*, 2015, 81: 112-121.
19. Contar C. M. M., Sarot J. R., Bordini Jr J., Galvão G. H., Nicolau G. V., Machado M. A. N. Maxillary Ridge Augmentation With Fresh-Frozen Bone Allografts. *J Oral Maxillofac Surg* 2009, 67:1280-1285.
20. Barone A., Varanini P., Orlando B., Tonelli P., Covani U. Deep-Frozen Allogenic Onlay Bone Grafts for Reconstruction of Atrophic Maxillary Alveolar Ridges: A Preliminary Study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009 67: 1300-1306.
21. Sipn-Neto R., Stavropoulos A., Pereira L. A. V. D., Marcantonio Jr E., Wenzel A. Fate of autologous and fresh-frozen allogeneic block bone grafts used for ridge augmentation. A CBCT-based analysis. *Clinical Oral Implants Research.* 2013, 24: 167-173.

22. Perri de Carvalho P.S., Bassi A.P.F., Pereira L.A.V.D. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais. *Implant News* 2004, 1(3):255-260.
23. Hench L.L. et al. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prothetic materials. *J. Biomed. Mater. Res.* 1971, 2(1):117-141.
24. Hench L.L., Paschall H.A. Direct chemical bond of bioactive glass- ceramic materials to bone and muscle. *J. Biomed. Mater. Res.* 1973, 7(3):25-42.
25. Hench L.L., Wilson J. Histochemical responses at a biomaterisl's interface. *J. Biomed. Mater. Res.* 1974, 8(3):49-64.
26. Hench L.L. *Biomaterials Science*. May, 1980, 208(4446):826-831.
27. Scheppers E.J.G. et al. Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions. *J. Oral Reahabil.* Sept., 1991, 18(5):439-452.
28. Wheeler D.L. et al. Evaluation of particulate Bioglass in a rabbit radius ostectomy model. *J. Biomed. Mat. Res.* , May 1997, 35(2): 249-545.
29. Roriz V. M., Rosa A. L., Peitl O., Zanotto E. D., Panzeri H., Oliveira P. T. Efficacy of a bioactive glass-ceramic (Biosilicate<sup>®</sup>) in the maintenance of alveolar ridges and in osseointegration of titanium implants. *Clinical Oral Implants Research*. 2010, 21: 148-155.
30. Araújo M. V. F., Mendes V. C., Chattopadhyay P., Davies J. E. Low-temperature particulate calcium phosphates for bone regeneration. *Clinical Oral Implants Research*. 2010, 21: 632-641.
31. Srisubut S., Teerakapong A., Vattraphodes T., Taweechaisupapong S., Kaen K. Effect of local delivery of alendronate on bone formation in bioactive glass grafting in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Parthol Oral Radiol Endod.* 2007, 104: e 11-e16.

32. Andrade A. L., Turchetti-Maia R. M. M., Lopes M. T. P., Salas C. E., Domingues R. Z. In vitro Bioactivity and Cytotoxicity of Chemically Treated Glass Fibers. *Materials Research*. 2004 7(4): 635-638.
33. Renghini C., Komlev V., Fiori F., Verné E., Baino F., Vitale-Brovarone C. Micro-CT studies on 3-D bioactive glass-ceramic scaffolds for bone regeneration. *Acta Biomaterialia*. 2009, 5: 1328-1337.
34. Yadav V. S., Narula S. C., Sharma R. K., Tewari S., Yadav R. Clinical evaluation of guided tissue regeneration combined with autogenous bone or autogenous bone mixed with bioactive glass in intrabony defects. *Journal of Oral Science*. 2011, 53(4): 481-488.
35. Andrade A.L., Souza D.M., Vasconcellos W.A., Ferreira R.V., Domingues R.Z., Tetracycline and/or hydrocortisone incorporation and release by bioactive glasses compounds. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 2009, (355): 811-816.
36. Carvalho M.F.F., Fernandes R.Z.D., Andrade A.L., Santos V.R., Tavano K.A.T., Vasconcelos W.A. Bioactive glass with antimicrobial agents: *In vitro* evaluation. *Journal of Medicine and Medical Sciences*, May 2014, (5)5: 109-112.
37. Arx T., Buser D. Horizontal ridge augmentation using autogenous block grafts and the guided bone regeneration technique with collagen membranes: a clinical study with 42 patients. *Clin Oral Impl Res*. 2006 17: 359-366.
38. Merli M., Moscatelli M., Mariotti G., Rotundo R., Nieri M. Autogenous bone versus deproteinised bovine bone matrix in 1-stage lateral sinus floor elevation in the severely atrophied maxilla: a randomized controlled trial. *Eur J Oral Implantol*. 2013 6(1): 27-37.

39. Caneva M., Botticelli D., Morelli F., Cesaretti G., Beolchini M., Lang N. P. Alveolar process preservation at implants installed immediately into extraction sockets using deproteinized bovine bone mineral – an experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research*. 2012, 23: 789-796.
40. Melo L.G.N., Nagata M.J.H., Bosco A.F., Ribeiro L.L.G., Leite C.M. Bone healing in surgically created defects treated with either bioactive glass particles, a calcium sulfate barrier, or a combination of both materials: histological and histometric study in rat tibias. *Clin Oral Impl. Res.* 2005, (16): 683-691.
41. Avani Y., Avishai G., Calderon S., Allon D.M. Bone remodeling in onlay beta-tricalcium phosphate and coral grafts to rat calvaria: microcomputerized tomography analysis. *Journal of Oral Implantology*. 2011, 27(4):379-386.
42. Oliveira H.T.R., Bergoli R.D., Hirsch W.D.B., Chagas Jr O.L., Heitz C., Silva D.N. Isotretinoin effect on repair of bone defects – A study in rat calvaria. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery*. 2013 (41): 581-585.
43. Ribeiro L. L. G., Bosco A.F., Nagata M.J.H., Melo L.G.N. Influence of bioactive glass and/or acellular dermal matrix on bone healing of surgically created defects in rat tibiae: a histological and histometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2008 23: 811-817.
44. Correa J.D., Madeira M.F.M., Resende R.G., Silva J.F.C., Gomez R.S., Souza D.G., Teixeira M.M., Queiroz Jr C.M., Silva T.A. Association between polymorphisms in interleukin 17A and 17F genes and chronic periodontal disease. *Mediators of Inflammation* 2012 (2012): 1-9.
45. Schallenberger M.A., Rossmeier K., Lovick H.M., Meyer T.R., Alberman H.M., Juda G.A. Comparison of the Osteogenic Potential of OsteoSelect Demineralized Bone Matrix Putty to NovaBone Calcium-Phosphosilicate Synthetic Putty in a Cranial Defect Model. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 2014 (25) 2: 657-661.

46. Bosetti M., Cannas M. The effect of bioactive glasses on bone marrow stromal cells differentiation. *Biomaterials*. 2005, 26: 3873-3879.
47. Ljusberg J., Ek-Rylander B., Andersson G. Tartarate-resitant purple acid phosphatase is synthesized as a latent proenzyme and activated by cysteine proteinases. *Biochem J*. 1999, 343: 63-69.

## 11. ANEXOS E APÊNDICES

### 11.1 ANEXO 1 – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UFMG.



**UFMG**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**CEUA**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

#### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 103 / 2014, relativo ao projeto intitulado "Avaliação histométrica e histoquímica de vidro bioativo no processo de reparação óssea", que tem como responsável RICARDO ALVES DE MESQUITA, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 12/08/2014. Este certificado expira-se em 12/08/2019.

#### CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 103 / 2014, related to the Project entitled "Histometric and histochemistry review of bioactive glass on bone healing", under the supervision of RICARDO ALVES DE MESQUITA, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 12/08/2014. This certificate expires in 12/08/2019.

Jacqueline Isaura Alvarez Leite  
Coordenador(a) da CEUA/UFMG  
Belo Horizonte, 12/08/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3499-4518 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

## 12. PRODUÇÃO INTELECTUAL DESENVOLVIDA DURANTE O CURSO DE DOUTORADO

### 12.1. Publicações de artigos científicos.

1. Araújo, R. ; Pinto Júnior, A. ; Lehman, L. F. ; Campos, F. E. ; Cunha, J. ; Castro, W. Análise epidemiológica de 132 casos de cirurgia ortognática. *Journal of the Brazilian College of Oral and Maxillofacial Surgery*,2015 (1): 30-35.
2. Araújo, R; Pinto Júnior, A; Lehman, LF ; Campos, FE ; De Castro,W. Deslocamento de implante dentário para o espaço submandibular. *Journal of the Brazilian College of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2015(1):68-73.

### 12.2 Artigo submetido a periódico:

Journal: Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology

Corresponding Author: Tarcilia Silva

Co-Authors: Joanna F Cunha ; Camila F Leite ; Luiz Felipe C Lehman ; Helder C Oliveira; Ricardo A Mesquita;

Title: Swelling in the anterior palate with a mixed radio-opaque and radiolucent image

### 12.3 Resumos publicados em Anais de congresso.

1. Pinto Jr A.A.; Cunha, J.F.; Lehman, LFC; Campos, FEB; Castro, WH. Tumor odontogênico adenomatóide múltiplo: relato de um caso raro. In: XXII Congresso Paulista de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial, 2014, Campinas. Anais do XXII Congresso Paulista de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial, 2014.
2. Pinto Jr, A.A.; Cunha, J.F.; Lehman, LFC; Campos, FEB ; Castro, WH. Mixoma Odontogênico: diagnóstico, tratamento, preservação e reabilitação protética. In: XXII Congresso Paulista de Cirurgia e Traumatologia Buco-

- maxilo-facial, 2014, Campinas. Anais do XXII Congresso Paulista de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial, 2014.
3. Fonseca, VJ; Cunha, JF; Lehman, LFC; Campos, FEB ; Castro, WH . Deslocamento de implante para o espaço submandibular. In: XXII Congresso Paulista de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial, 2014, Campinas. Anais do XXII Congresso Paulista de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial, 2014.
  4. Rodrigues, LN; Gomes, CC; Lehman LFC; Castro, WH; Gomez, RS. Tumor Odontogênico Adenomatóide. In: XX Jornada Mineira de Estomatologia, 2013, Uberlândia. Anais da XX Jornada Mineira de Estomatologia, 2013.
  5. Araújo, RZ; Pinto Júnior AA; Monteiro Júnior, SL ; Lehman LFC ; Campos, FEB ; Castro, WH . Osteotomia Le Fort III: Aplicação e relato de caso. In: XXII Congresso Brasileiro de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial, 2013, Rio de Janeiro. Anais do XXII Congresso Brasileiro de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial, 2013.
  6. Araújo, RZ ; Pinto Júnior AA; Monteiro Júnior, SL ; Lehman LFC ; Campos, FEB ; CASTRO, WH . Fratura de côndilo intracapsular: Tratamento cirúrgico com lag screw. In: XXII Congresso Brasileiro de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial, 2013, Rio de Janeiro. Anais do XXII Congresso Brasileiro de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial, 2013.
  7. Pinto Júnior AA; Araújo, RZ; Monteiro Júnior, SL ; Lehman LFC ; Campos, FEB ; Castro, WH . Tratamento de seqüela de fratura do seio frontal. In: XXII Congresso Brasileiro de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial, 2013, Rio de Janeiro. Anais do XXII Congresso Brasileiro de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial, 2013.
  8. Pinto Júnior AA; Araújo, RZ; Monteiro Júnior, SL ; Campos, FEB; Lehman LFC; Castro, WH . Reabilitação protética implantossuportada após ressecção mandibular de ameloblastoma. In: XXII Congresso Brasileiro de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial, 2013, Rio de Janeiro. Anais do XXII Congresso Brasileiro de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial, 2013.

# Análise epidemiológica de 132 casos de cirurgia ortognática

RAFAEL ZETEHAKU **ARAÚJO**<sup>1</sup> | AÉCIO ABNER CAMPOS **PINTO JÚNIOR**<sup>2</sup> | LUIZ FELIPE CARDOSO **LEHMAN**<sup>3</sup> |  
FELIPE EDUARDO BAIREIS **CAMPOS**<sup>4</sup> | JOANNA FARIAS **CUNHA**<sup>5</sup> | WAGNER HENRIQUES **CASTRO**<sup>6</sup>

## RESUMO

**Objetivo:** o presente artigo teve como objetivo fazer uma análise epidemiológica dos pacientes submetidos a cirurgia ortognática no Serviço de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). **Métodos:** por meio da avaliação de prontuários, foram coletadas informações referentes aos dados demográficos, ao perfil clínico e ao tratamento de pacientes submetidos a cirurgia ortognática em um período de cinco anos, entre julho de 2008 e julho de 2013. **Resultados:** foram analisados os prontuários de 132 pacientes submetidos à cirurgia ortognática. A média de idade foi de 29,6 anos, e os pacientes do sexo masculino e feodermas foram os mais prevalentes. Os pacientes Classe III e aqueles de Padrão Facial III foram maioria na amostra. Houve, por parte dos pacientes, 229 queixas relatadas, sendo preponderantes aquelas relacionadas à estética facial e à função mastigatória. Entre as cirurgias maxilares, 40 foram expansões rápidas da maxila, 81 osteotomias do tipo Le Fort I, 3 osteotomias do tipo Le Fort I com segmentações, e 5 osteotomias do tipo Le Fort III. Entre as cirurgias mandibulares, 68 foram osteotomias sagitais bilaterais dos ramos, 2 osteotomias verticais bilaterais dos ramos, e 2 osteotomias vértico-sagitais bilaterais dos ramos, além das 28 mentoplastias realizadas. **Conclusão:** o contínuo desenvolvimento da cirurgia ortognática e o aumento do número de pacientes que buscam esse tipo de tratamento faz necessário um maior conhecimento, por parte dos cirurgiões, sobre o perfil epidemiológico desses pacientes. Tais dados poderão influenciar nos planos de tratamento orto-cirúrgicos e na estruturação dos Serviços que prestam esse tipo de atendimento.

**Palavras-chave:** Cirurgia ortognática. Estudos epidemiológicos. Anormalidades maxilo-mandibulares.

<sup>1</sup> Ex-residente do Programa de Residência em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

<sup>2</sup> Residente do Programa de Residência em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

<sup>3</sup> Especialista em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial pela EAP-ABO, Uberlândia/MG. Preceptor do Programa de Residência em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

<sup>4</sup> Doutor em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia. Preceptor do Programa de Residência em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

<sup>5</sup> Ex-residente e Preceptor do Programa de Residência em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

<sup>6</sup> Doutor em Patologia Odontológica pela Faculdade de Medicina da UFMG. Coordenador do Serviço do Programa de Residência em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

**Como citar este artigo:** Araújo RZ, Pinto Júnior AAC, Lehman LFC, Campos FEB, Cunha JF, Castro WH. Análise epidemiológica de 132 casos de cirurgia ortognática. J Braz Coll Oral Maxillofac Surg. 2015 maio-ago;1(2):30-5. DOI: <http://dx.doi.org/10.14436/2358-2782.1.2.030-035.oar>

**Enviado em:** 28/11/2014 - **Revisado e aceito:** 13/03/2015

» Os autores declaram não ter interesses associativos, comerciais, de propriedade ou financeiros, que representem conflito de interesse, nos produtos e companhias descritos nesse artigo.

**Endereço para correspondência:** Wagner Henriques de Castro - Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Minas Gerais - SEDTO (Serviço Especial de Diagnóstico e Tratamento em Odontologia) - Av. Prof. Alfredo Balena nº 110, Santa Eligênia, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil - CEP: 30.130.100 - E-mail: [wagnercastro@ufmg.br](mailto:wagnercastro@ufmg.br)

# Deslocamento de implante dentário para o espaço submandibular

RAFAEL ZETEHAKU **ARAÚJO**<sup>1</sup> | AÉCIO ABNER CAMPOS **PINTO JÚNIOR**<sup>1</sup> | LUIZ FELIPE CARDOSO **LEHMAN**<sup>2</sup> | FELIPE EDUARDO BAIREN **CAMPOS**<sup>2</sup> | WAGNER HENRIQUES DE **CASTRO**<sup>3</sup>

## RESUMO

A instalação de implantes dentários osseointegráveis é considerada um procedimento cirúrgico previsível e seguro. No entanto, sem um adequado planejamento do tratamento cirúrgico, várias complicações trans-operatórias e pós-operatórias podem ocorrer. O presente artigo objetiva relatar o caso de uma paciente, com 48 anos de idade, que compareceu com histórico de deslocamento de implante dentário durante sua instalação, com queixa álgica e de desconforto psicológico. Avaliações clínicas intrabucais e extrabucais não apontaram alterações significativas, e o exame tomográfico revelou deslocamento do implante para o espaço submandibular. Em um segundo tempo cirúrgico, o implante foi removido via acesso submandibular. As complicações com implantes dentários podem ser trans-operatórias, como hemorragias e danos neurosensoriais, ou pós-operatórias, como falta de osseointegração e peri-implantite. O deslocamento de implantes ou materiais relacionados é raro e, em geral, relatado como sua movimentação para o interior do seio maxilar. Fatores de risco para essa complicação estão diretamente relacionados a características anatômicas locais. A decisão quanto à sua remoção envolve questões fisiológicas, funcionais, psicológicas e médico-legais. Não existem casos relatados na literatura de deslocamento de implante para o espaço submandibular. Um minucioso planejamento clínico e radiográfico de todas as etapas do tratamento cirúrgico é necessário para evitar esse tipo de complicação.

**Palavras-chave:** Implantes. Complicações. Deslocamento. Submandibular.

<sup>1</sup> Residente em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

<sup>2</sup> Preceptor do Serviço de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

<sup>3</sup> Coordenador do Serviço de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

**Como citar este artigo:** Araújo RZ, Pinto Júnior AAC, Lehman LFC, Campos FEB, Castro WH. Deslocamento de implante dentário para o espaço submandibular. J Braz Coll Oral Maxillofac Surg. 2015 maio-ago;1(2):68-73. DOI: <http://dx.doi.org/10.14436/2358-2782.1.2.068-073.oar>

**Enviado em:** 08/10/2014 - **Revisado e aceito:** 24/04/2015

» Os autores declaram não ter interesses associativos, comerciais, de propriedade ou financeiros, que representem conflito de interesse, nos produtos e companhias descritos nesse artigo.

» O(s) paciente(s) que aparece(m) no presente artigo autorizou(aram) previamente a publicação de suas fotografias faciais e intrabucais, e/ou radiografias.

**Endereço para correspondência:** Aécio Abner Campos Pinto Júnior  
Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais SEDTO - Serviço Especial de Diagnóstico e Tratamento em Odontologia Departamento de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial  
Av. Prof. Alfredo Balena, 110, Santa Etigênia, Belo Horizonte/MG - CEP: 30.130-100  
E-mail: [aeciocampos@gmail.com](mailto:aeciocampos@gmail.com)

