

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
- MESTRADO -
CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCOMAXILOFACIAL

FERNANDA BOING

**Avaliação da neoformação óssea em defeitos
críticos com o uso de substitutos ósseos derivados
de fosfato e do PLGA/rhGH
– estudo preliminar em coelhos**

PORTO ALEGRE – RS
2014

FERNANDA BOING

**Avaliação da neoformação óssea em defeitos
críticos com o uso de substitutos ósseos derivados
de fosfato e do PLGA/rhGH
– estudo preliminar em coelhos**

Dissertação apresentada como requisito
para a obtenção do grau de Mestre pelo
Programa de Pós-Graduação da
Faculdade de Odontologia da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do
Sul.

Orientador:
Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli

PORTO ALEGRE - RS

2014

FERNANDA BOING

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

B681a Boing, Fernanda

Avaliação da neoformação óssea em defeitos críticos com o uso de substitutos ósseos derivados de fosfato e do PLGA/rhGH – estudo preliminar em coelhos / Fernanda Boing. - Porto Alegre, 2014.
47 f. : il.

Diss. (Mestrado em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial)
– Faculdade de Odontologia, PUCRS.
Orientador: Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli.

1. Odontologia. 2. Cirurgia Bucomaxilofacial.
3. Traumatologia Bucomaxilofacial. 4. Materiais Biocompatíveis.
5. Regeneração Óssea. 6. Coelhos – Experiências. I. Pagnoncelli,
Rogério Miranda. II. Título.

CDD 617.695

Ficha Catalográfica elaborada por
Vanessa Pinent
CRB 10/1297

Avaliação da neoformação óssea em defeitos críticos com o uso de
substitutos ósseos derivados de fosfato e do PLGA/rhGH
– estudo preliminar em coelhos

Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de
Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do
Sul.

Aprovada em: _____ de _____ de _____
BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli - PUCRS (Orientador)

Prof. Dr. Jefferson Viapiana Paes - UNIPLAC

Prof. Dr. Vinícius Neri Silveira - PUCRS

Prof. Dr. Vladimir Dourado Poli - PUCRS (suplente)

Porto Alegre
2014



Dedicatória

DEDICATÓRIA

À fé

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Teresa de Calcutá)



Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Orientador **Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli**, pela orientação no Mestrado, sempre acreditando, confiando em mim, pelo apoio, atenção, confiança e compreensão.

Aos **Professores Nelson H. A. Camargo, Aury Nunes de Moraes e Elena Riet**, que participaram deste trabalho como professores, orientadores e colegas.

Aos meus familiares, por todo apoio dispensado em minha trajetória profissional.

A **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul** e à Faculdade de Odontologia. Aos Professores e funcionários que colaboraram neste período de aprendizado.

Aos meus colegas e amigos de curso **Aline Duarte da Silva, Ricardo Garcia e Alexandre da Silveira Gerszon**, agradeço pelo incentivo e companheirismo neste período em que convivemos na pós-graduação.



Resumo

RESUMO

Objetivo: Avaliar a formação óssea com diferentes substitutos ósseos, incluindo um carreador de hormônio rhGH (hormônio do crescimento) em defeitos críticos em um modelo animal.

Materiais e Métodos: Foram utilizados 12 coelhos da raça Nova Zelândia, machos, e adultos jovens (aproximadamente 10 meses). Para cada grupo foi utilizado 6 coelhos, sendo que em cada animal foram realizadas 4 cavidades teste com broca trefina de 8mm de diâmetro e espessura total da calota craniana. As cavidades teste foram distribuídas em: Grupo I (a: coágulo, b: osso autógeno triturado, c: PLGA (Poli ácido glicólico láctico) + rhGH (hormônio do crescimento recombinante) e, d: osso autógeno triturado + rhGH) e Grupo II (a: HA (hidroxiapatita), b: osso autógeno triturado, c: HA/TCP- β (hidroxiapatita/tricálcio fosfato beta) e d: HA/SiO₂n (hidroxiapatita/óxido de silício). Os animais foram sacrificados após 6 semanas, e as amostras foram preparadas e coradas com coloração HE (hematoxilina e eosina). Foi realizada uma análise descritiva das amostras por MO (microscopia óptica).

Resultados: A avaliação mostrou que nas amostras com PLGA e rhGH não houve o preenchimento total da cavidade, embora tenha sido observado neoformação óssea. Essas regiões apresentavam-se com as lacunas osteocíticas preenchidas e em processo de remodelação, evidenciando osso maduro e viável. Com relação aos biomateriais (HA, HA/TCP- β e HA/ HA/SiO₂n), todos apresentaram formação óssea com a incorporação do biomaterial.

Conclusão: Os resultados do presente estudo demonstraram a neoformação óssea com os diferentes substitutos ósseos (HA, HA/TCP- β , HA/SiO₂n). Além disso, foi observada a viabilidade do uso do carreador de hormônio com a presença de osso maduro e viável nas regiões de teste desse.

Descritores: Biomateriais, neoformação óssea, Hidroxiapatita, Tricálcio Fosfato, Hormônio do Crescimento



ABSTRACT

Objective: To evaluate the bone formation with different bone substitutes, including a rhGH hormone carrier (Growth Human Hormone Recombined) in an animal model.

Materials and Methods: A total of 12 rabbits (from New Zealand), males, young adults (approximately 10 months old) were used. For each group, 6 rabbits were used, being that in each animal, 4 test sites were performed with a 8 mm diameter trephine, completing the total thickness of the skull. The test sites were distributed in: Group I (a: clot, b: autogenous bone triturated, c: PLGA (poly lactic glycolic acid) + rhGH (Growth Human Hormone Recombined), and d: autogenous bone + rhGH); and Group II (a: HA (hydroxyapatite), b: autogenous bone triturated, c: HA / β -TCP (hydroxyapatite / tricalcium phosphate beta), and d: HA / SiO₂n (hydroxyapatite / silicium oxide). The animals were sacrificed after 6 weeks and the samples were prepared and stained with HE (hematoxylin and eosin). A descriptive analysis of the samples was performed with OM (optics microscopic).

Results: The evaluation showed that in the samples with PLGA and rhGH there was not the complete filling of the sites, although it was observed inflammatory process compatible with existing biomaterials. The bone formation regions presented filled osteocytic gaps in remodeling process, showing mature and viable bone. In relation to the sites with biomaterials (HA, HA/TCP-b e HA/ HA/SiO₂n), all of them showed bone formation with biomaterial incorporation.

Conclusion: The results of this study demonstrated the viability of different bone substitutes (HA, HA / TCP- β , HA / SiO₂n). In addition, bone formation was not observed throughout the test region with the use of the hormone carrier. However, in regions with neof ormation, it was verified the presence of mature and viable bone

Descriptors: Biomaterials, bone neof ormation, Hydroxyapatite, Tricalcium Phos Growth Hormone.



Figura 01: Desenho esquemático do grupo 1	22
Figura 02: Desenho esquemático do grupo 2.	23
Figura 03: Tabela com as especificações dos biomateriais fornecidas pelo Grupo de Estudos da UDESC.	24
Figura 04: A – Canulação da veia marginal da orelha do coelho. B – Preparo do campo cirúrgico. C – Incisão e descolamento periosteal. D – Cavidades teste preparadas.	25
Figura 05: A – Matriz de PLGA+rhGH e biomateriais granulados sendo embebidos em coágulo. B – Cavidades teste preenchidas com materiais do Grupo 1. C – Cavidades teste preenchidas com materiais do Grupo 2. D – Sutura.	26
Figura 06: Coágulo: A e B – MO mostrando formação (asteriscos pretos) e remodelação óssea (setas pretas) com presença de osteócitos (setas vermelhas). Observa-se as fibras colágenas (triângulos brancos) e osteoblastos marginado a formação óssea (setas brancas). A – 50x e B – 100x.	29
Figura 07: Osso Autógeno: A – Imagem de MO mostrando a remodelação óssea (setas pretas), aumento de 50x. B – área com presença de tecido ósseo maduro de um fragmento de enxerto (asterisco branco), com neoformação óssea na periferia (asterisco preto). Presença de osteoblastos (seta branca), osteócitos (seta vermelha) e lacunas osteocíticas (seta amarela), aumento de 400x.	29
Figura 08: PLGA + GH: A e B – MO mostrando remodelação óssea (setas pretas), com presença de infiltrado inflamatório (triângulo preto) e não preenchimento total da cavidade teste. Aumento de 50x.	30
Figura 09: Autógeno + GH: A e B – Remodelação óssea (setas pretas) ao redor dos grânulos de osso autógeno (asterisco branco). Lacunas osteocíticas (setas amarelas) e osteócitos (seta vermelha). Deposição de fibras colágenas (triângulo branco). Aumento A 50x e B 100x.	31
Figura 10: HA: A e B – MO evidenciando boa formação e remodelação óssea (setas pretas) ao redor do biomaterial (asterisco vermelho). Osteócito (seta vermelha). A – aumento de 50x. B – Aumento de 100x.	31
Figura 11: Autógeno: A e B – Remodelação óssea (setas pretas) e deposição óssea (asteriscos pretos) ao redor dos grânulos do enxerto (asterisco branco), em aumento de 50x e 400x, respectivamente. Osteócito (seta vermelha), lacunas osteocíticas (seta amarela), osteoblastos (seta branca).	32
Figura 12: HA/TCP-     evidenciando a incorporação do biomaterial com deposição e neoformação óssea (setas pretas). Aumento de	32

50x. B – Amostra com remodelação óssea ao redor dos grânulos e deposição de fibras colágenas (triângulos brancos) com discreto processo inflamatório (triângulo preto). Aumento de 100x.

Figura 13: HA/SiO₂n: A – MO evidenciando neoformação óssea (asteriscos pretos) ao redor dos grânulos de biomaterial (asterisco vermelho) em processo de reabsorção. Aumento de 50x. B – Amostras semelhantes ao A em aumento de 100x.

33



Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

HA	- Hidroxiapatita
α	- Alfa
β	- Beta
Ca	- Cálcio
P	- Fósforo
TCP- β	- Tricálcio fosfato beta
PLGA	- Poli ácido glicólico láctico
FDA	- Food and Drug Administration
GH	- Growth hormone/Hormônio do Crescimento
IGF-I	- Fator de Crescimento semelhante à Insulina I
rhGH	- Hormônio de crescimento humano recombinante
IGF-II	- Fator de Crescimento semelhante à insulina II
PUCRS	- Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
SiO_2n	- Oxido de Silício
nm	- Nanômetro
%	- Porcentagem
UI	- Unidade Internacional
TCP	- Tricálcio fosfato
EDTA	- Acido etilenodiaminotetracético
HE	- Hematoxilina e Eosina
MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura
MO	- Microscopia Óptica
UFSC	- Universidade Federal de Santa Catarina
UDESC	- Universidade do Estado de Santa Catarina
BMP	- Bone morphogenetic proteins



Sumário

Sumário

1	Introdução e Justificativa	- 10
2	Objetivos	- 15
2	Objetivo Geral	- 15
2.1	Objetivos Específicos	- 15
3	Revisão de Literatura	- 16
4	Materiais e Métodos	- 21
4.1	Amostra	- 21
4.2	Animais	- 21
4.3	Organização dos Grupos Experimentais	- 21
4.4	Fornecimento dos Materiais Teste	- 23
4.5	Procedimentos Cirúrgicos	- 24
4.6	Procedimentos Laboratoriais e de Análise	- 27
4.7	Análise dos Enxertos por Microscopia Óptica	- 27
5	Resultado	- 28
6	Discussão	- 34
7	Conclusões	- 37
8	Referências	- 38
	Anexo 1 – Carta de Aprovação da Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS	-
	Anexo 2 – Termo de Cooperação entre as Universidades	-



Introdução e Justificativa

1 - INTRODUÇÃO

A recuperação de perdas ósseas, que podem ser ocasionadas por traumas, procedimentos cirúrgicos ou por processos patológicos, é um desafio para a Odontologia¹.

A absorção que se segue à exodontia muitas vezes compromete o volume ósseo remanescente, impedindo a instalação de implantes. Por essa razão, a reparação e reconstrução óssea são necessárias, para permitir a posterior colocação de implantes em posição proteticamente adequada².

A finalidade do enxerto se encontra em reparar o defeito, estimulando o crescimento de novo tecido ósseo no local. Este novo tecido deve idealmente apresentar a remodelação sequencial de um novo tecido ósseo, com características morfológicas e de dureza adequadas, permitindo que o local do reparo mantenha o equilíbrio ideal entre forma e função³.

Devido aos inconvenientes da remoção do osso autógeno, como a morbidade de uma segunda área cirúrgica para a remoção do enxerto e disponibilidade limitada, é crescente o interesse por materiais alternativos¹⁻³.

Os biomateriais, por vezes utilizados, podem ser divididos em quatro classes de acordo com seu comportamento fisiológico:

- Biotoleráveis: materiais apenas tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes devido à formação de uma camada envoltória de tecido fibroso. Essa camada é induzida por meio da liberação de íons do material implantado. Quanto maior a espessura da camada de tecido fibroso, menor será a tolerabilidade dos tecidos circundantes ao material. São exemplos grande maioria dos metais e praticamente todos os polímeros sintéticos^{4,5}.

- Bioinertes: esses materiais são tolerados pelo organismo, a formação da camada de tecido fibroso é praticamente inexistente. Possuem características como: durabilidade, estabilidade e nenhuma reatividade química ou biológica com os tecidos onde são implantados. Exemplos: alumina, zircônia estabilizada e algumas formas de carbono^{4,5}.

- Bioativos: material em que ocorre uma forte ligação química estável na interface tecido ósseo-implante. Esses materiais são recomendados nos locais onde há necessidade de estimular o crescimento do osso ou de outros tecidos. Na forma

de pó ele pode servir para preenchimento. Como exemplo tem-se: hidroxiapatita (HA), biovidros e vitro-cerâmica contendo a fase apatita^{4,5}.

Os materiais bioativos, também, podem ser considerados osteocondutores por apoiar a aposição direta de osso em suas superfícies por osteoblastos maduros, ou intrinsecamente. Ou osteoindutor com o estímulo para aceleração da aposição óssea, influenciando o recrutamento, diferenciação e maturação de células mesenquimais em osteoblastos⁶.

- Bioabsorvíveis: materiais que, após certo período de tempo em contato com os tecidos ósseos, acabam sendo degradados ou fagocitados pelo organismo e substituídos pelos tecidos adjacentes. Esses biomateriais são promissores em aplicações médico-odontológicas, pela performance que apresentam em curto espaço de tempo, na reconstituição dos tecidos ósseos. Os biomateriais que mais se destacam são o fosfato de cálcio- α e β e a hidroxiapatita estequiométrica, porém estes biomateriais não suportam cargas mecânicas elevadas, o que inibe a utilização dos mesmos em meios de solicitações mecânicas elevadas^{4,5}.

Há também os materiais nanoestruturados que são promissores e vêm tomando espaço em diferentes áreas de aplicação termomecânica, aeroespacial, nuclear e biomédica. Na área biomédica, as biocerâmicas na composição e os fosfatos de cálcio (CA/P) têm se destacado, em razão das características mineralógicas destes biomateriais serem semelhantes aos da apatita da estrutura óssea do esqueleto humano, e por apresentarem boa biocompatibilidade⁷. Os biomateriais nanoestruturados de fosfato de cálcio e os nanocompósitos são uma nova classe de biomateriais, promissores em aplicações cirúrgicas médicas-odontológicas, na fixação de próteses, preenchimento ósseo, em revestimentos, na estabilização de implantes e como elemento matricial na reconstituição da estrutura óssea⁷.

A hidroxiapatita microestruturada é considerada não absorvível (não está sujeita à dissolução química significativa ou mediada por células de absorção *in vivo*), ou é considerada de dissolução lenta⁸. Já o TCP- β (beta tricálcio fosfato) microestruturado apresenta taxa de solubilidade superior a da hidroxiapatita, apresentando melhor absorção quando aplicado *in vivo*⁸, podendo ser variado dependendo da porosidade, do espécie e do tamanho do defeito^{3,8}.

Apesar das biocerâmicas microestruturadas de fosfato de cálcio serem empregadas há mais de 30 anos, estes biomateriais ainda apresentam resultado clínico inferior quando comparado com substitutos ósseos de origem natural (humana ou bovina)⁹.

Estudos desenvolvidos por diferentes autores com biomateriais nanoestruturados de fosfatos de cálcio vêm demonstrando que esta nova classe de biomateriais pode ser uma nova alternativa na substituição dos biomateriais

autógenos, alógenos e exógenos, nos tratamentos de reparo e de reconstrução de formação óssea^{4,10,11}. Sabe-se dos esforços de diferentes grupos de pesquisa no país, que vêm se destacando na área de nanotecnologia, através do desenvolvendo de nanopartículas e de nanomateriais de fosfatos de cálcio e nanocompósitos para aplicações biomédicas^{4,10,12-15}, mas mesmo assim, a produção científica relativa à biomateriais nanoestruturados de substituição ósseos ainda é incipiente, principalmente quando consideramos a sua aplicação clínica.

Tendo em vista que todos os constituintes dos seres vivos são organizados hierarquicamente a partir de nanocompósitos, é importante se desenvolver biomateriais que mimetizem as características morfológicas naturais do tecido a ser reparado^{13,16,17}. Em razão disto, a síntese e elaboração de biomateriais nanocompósitos tem se expandido em diferentes laboratórios de pesquisa, resultando na elaboração de novos biomateriais promissores como elemento matricial no reparo e na reconstituição de tecido ósseo, na traumatologia, na ortopedia e na odontologia^{4,10,12,17-22}.

Tem-se, também, cada vez mais estudado o uso de biomateriais para levarem medicação a algum sítio específico do organismo humano ou como auxiliares na reparação tecidual. O principal material hoje utilizado para esse objetivo é o polímero biodegradável PLGA (ácido polilático-co-glicólico). Ele é o mais comumente usado e aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA)^{23,24}. Uma das drogas que podem ser utilizadas nesse tipo de veículo é o hormônio do crescimento (GH – *growth hormone*).

O GH é um hormônio regulador fundamental do crescimento ósseo pós-natal, atuando no remodelamento ósseo, que é regulado pelo balanço entre a absorção e a formação óssea^{25,26}. Seus efeitos são mediados diretamente via receptores de GH expressos na membrana celular, ou indiretamente, via um aumento da síntese de Fator de Crescimento semelhante à insulina I (IGF-I)²⁷. No tecido ósseo, observa-se que sua ação promove a deposição aumentada de proteínas pelos condrócitos e osteoblastos, aumento do número de mitoses e a conversão de condrócitos em osteoblastos²⁷. Atualmente, a síntese laboratorial do hormônio de crescimento humano recombinante (rhGH – *recombinant human growth hormone*) permite que ele seja utilizado em adultos com deficiência desse hormônio. Essa reposição acarreta ganho de massa muscular e óssea^{28,29}.

O hormônio do crescimento (GH) é um peptídeo com 191 aminoácidos secretado pela glândula pituitária anterior¹¹⁻¹⁴ que estimula o processo de crescimento, atuando como um regulador metabólico e mitogênico. Este hormônio afeta o desenvolvimento de vários órgãos e tecidos como fígado, rins, músculos e ossos^{1,3}. Seus efeitos são mediados principalmente pelo fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I)¹¹⁻²⁰, um peptídeo de 70 aminoácidos que é sintetizado

em quase todos os tecidos, mas fundamentalmente no fígado e no tecido condral sob estimulação do GH²⁷.

O GH é uma das substâncias que regulam o crescimento e a remodelação óssea *in vivo*³⁰, podendo também atuar como um fator de crescimento produzido localmente, sendo secretado por vários tipos de células, exercendo efeitos endócrinos, assim como parácrinos e autócrinos^{31,32}. O GH é capaz de estimular o crescimento ósseo através da estimulação direta dos condrócitos e dos osteoblastos tanto *in vivo* como *in vitro*³⁰. Este hormônio é considerado um dos principais reguladores sistêmicos do crescimento longitudinal do osso. Ele também aumenta a síntese do IGF-I e do IGF-II, que estimula a proliferação e diferenciação dos osteoblastos^{27,34}. Conseqüentemente, é capaz de estimular a síntese de proteínas, aumentar a remodelação e mineralização óssea^{30,35}.

Nesse contexto, foi desenvolvida a PUCRS um biomaterial que pode ser utilizado como um enxerto na área de odontologia, medicina e veterinária, o qual tem o objetivo de estimular a formação óssea em um local específico, realizando uma regeneração óssea guiada. Para isso, foi utilizado como arcabouço um polímero biodegradável e biocompatível, o PLGA, e foi feita a incorporação do rhGH, que tem o papel de indutor de cicatrização e formação óssea³⁶⁻³⁸.

O PLGA é um polímero relativamente hidrofóbico, instável em condições de umidade e biodegradável, sofrendo hidrólise para produzir monômeros de ácido lático e glicólico, que são degradados nas mitocôndrias pelo ciclo de Krebs^{27,38-40}.

O rhGH (hormônio do crescimento recombinante) é incorporado ao PLGA para formar uma matriz. O *scaffold* (ou matriz) deve ser poroso, com uma relação superfície-volume alta, para permitir a fixação das células do crescimento, bem como a troca de nutrientes *in vitro* ou *in vivo*^{26,36,38}. Além disso, a natureza porosa da matriz permitirá angiogênese sobre a implantação no local do defeito. A matriz atuará ainda como um suporte temporário para as células aderirem e proliferarem. As matrizes devem imitar a matriz extracelular nativa tanto arquitetonicamente, como funcionalmente^{36,38,41}.

Nas situações de implante em alvéolo pós-exodontia, os padrões de remodelação óssea e procedimentos cirúrgicos reconstrutivos para a manutenção dos níveis ósseos são bastante discutidos na literatura, com indicações de preenchimento do *gap* entre implante/alvéolo dentário; ou preservação do alvéolo após a exodontia com substitutos ósseos e membranas de colágeno, que são alternativas de tratamento frequentemente recomendadas⁴¹. Sendo que a utilização do GH poderia ser uma alternativa coadjuvante em implantes dentários, reconstruções de alvéolo e outros procedimentos reconstrutivos tais como enxertos em bloco, de seio maxilar, interposicionais, e outras aplicações de regeneração óssea guiada associada a uma matriz polimérica.

Vê-se com todas essas possibilidades de substitutos ósseos duas linhas de pesquisa possíveis, uma com o uso de derivados de fosfato e outra com o uso de matriz associada à fatores de crescimento e/ou indutores. Sendo assim, optou-se neste trabalho por avaliar ao mesmo tempo essas duas vertentes de pesquisa.



Objetivos

2 - OBJETIVO GERAL

1- Este estudo teve como objetivo avaliar a neoformação óssea através do uso de diferentes substitutos ósseos em um modelo animal em calvária de coelhos. Foram avaliados *in vivo*, PLGA + rhGH e três diferentes composições de biomateriais nanoestruturados a base de fosfato de cálcio: HA, bifásico HA/TCP- β e nanocompósito HA/SiO₂n.

2.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 – Avaliar a viabilidade de um carreador (PLGA) de hormônio do crescimento e a influência do hormônio na neoformação óssea através da análise descritiva histológica.

2 - Avaliar a neoformação óssea com biomateriais derivados de fosfato *in vivo* através da análise descritiva histológica.



3 – REVISÃO DE LITERATURA

Os materiais substitutos devem responder a determinados requisitos, como possuir estrutura estável, rapidez na incorporação com o tecido ósseo, promover osteocondução e gerar pouca ou nenhuma complicação associada ao seu uso⁴³.

As biocerâmicas de fosfato de cálcio, naturais ou sintéticas, têm sido consideradas uma alternativa como biomateriais de substituição do tecido ósseo há mais de 30 anos, com duas áreas principais de pesquisa: 1) otimização dos processos cirúrgicos, com as novas características físicas e químicas e a capacidade que estes biomateriais podem oferecer de reparação de tecido ósseo; e 2) otimização da morfologia de grãos e de microporos destes biomateriais, procurando oferecer biomateriais com características microestruturais e físicas favoráveis a molhabilidade, capilaridade, solubilidade, adesão celular na superfície de grãos e para o interior do biomaterial³.

Entre as principais biocerâmicas de fosfato de cálcio se destacam: hidroxiapatita (HA) e o fosfato tricálcio - β (TCP- β) (biomaterial absorvível)⁴⁴.

O método de síntese por via úmida permite a obtenção de pós nanoestruturados de fosfato de cálcio e hidroxiapatita, com tamanho de partículas inferiores a 100nm⁴⁵. A elaboração de biomateriais granulados, através do método em moinho atritor de alta energia, utilizando pós nanoestruturados de fosfato de cálcio, conduz a obtenção de biomateriais granulados microporosos, com microporosidade interconectada, elevada área superficial de grãos e de microporos, condições favoráveis à molhabilidade, capilaridade, solubilidade, adesão e proliferação celular na superfície de grãos e microporos, melhorando as condições de osseoindução, osseointegração e de reparação do tecido ósseo precocemente⁴⁶.

Experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que fosfatos de cálcio porosos nanoestruturados apresentam maior bioatividade, especialmente maior osteoindutividade do que os convencionais, sugerindo que quanto menores forem os grânulos e mais porosidades tiverem, melhor será sua atividade na neoformação óssea⁴⁷.

A alta absorção do TCP- β , com liberação rápida de íons cálcio e fosfato quando em meio fisiológico, reduz drasticamente a área de superfície disponível para proliferação de células ósseas e, portanto, limita sua aplicação clínica quando isolado⁴⁸.

Estudos recentes que avaliaram o uso do TCP- β como substituto ósseo revelaram melhores resultados para formação óssea e na velocidade de degradação, do que aqueles obtidos com a hidroxiapatita^{49,50}.

Assim, pesquisou-se a utilização de compostos bifásicos com 60% de hidroxiapatita e 40% de TCP- β para uso clínico, associando boa solubilidade com maior resistência mecânica⁵¹.

Autores já têm sugerido o material bifásico em relação ao TCP- β , uma vez que porque o mesmo demonstrou boa bioatividade, mas com solubilidade mais lenta, permitindo uma osteocondutividade^{48,51}.

As biocerâmicas bifásicas e/ou nanocompósitos surgiram pelo interesse em melhorar as características de solubilidade da hidroxiapatita e dos fosfatos de cálcio em meios biológicos. Estudos realizados por diferentes autores sobre a proliferação celular utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* mostram superioridade desses materiais se comparados aos biomateriais convencionais^{16,29}. Esses estudos foram realizados sobre a superfície de biocerâmicas nanoestruturadas, formadas pela matriz cerâmica de HA e HA/TCP- β com tamanho médio de grãos inferior a 100nm, e constataram uma proliferação superior das células de osteoblastos sobre a superfície microporosa dos biomateriais nanoestruturados, se comparados com os resultados obtidos para os biomateriais convencionais (microparticulados, biocimento nanoestruturado e coágulo)^{11,52}. Os autores constataram também que estes nanomateriais permitem uma forte ligação na interface biomaterial/tecido ósseo, o que pode contribuir em processos cirúrgicos na fixação implantes ortopédico-dentais^{11,52}.

No caso da incorporação de silicato à estrutura cristalina das cerâmicas, relata-se uma resposta de cura acelerada. O silício é essencial para o desenvolvimento normal do esqueleto e a saúde vascular. Também desempenha um papel na mineralização óssea e no metabolismo e síntese de colágeno³.

Estudo recente comparou três tipos de biocerâmicas. A associação HA/TCP- β foi superior às demais por apresentar velocidade de absorção intermediária em relação à HA e ao TCP- β isolados, fornecendo ainda uma sustentação adequada ao tecido neoformado. O biomaterial HA/Al₂O₃ (hidroxiapatita/óxido de alumínio) a 5% se mostrou incompatível, provocando reação de rejeição por parte do hospedeiro e apresentou insignificante formação de tecido ósseo⁵³.

O sulfato de cálcio, também foi avaliado como cimento associado à cerâmicas (Pro Osteon 200R), e demonstrou ser osteoindutivo, porém com pouca estabilidade. No caso as cerâmicas foram as responsáveis pela osteocondução⁵⁴.

Com relação as propriedades mecânicas, um estudo desenvolvido em tíbias de coelhos apontou para o uso de HA e HA/TCP, e concluiu que tanto o HA e

HA/TCP (60/40) têm uma aplicação limitada no tratamento de suporte de carga de defeitos ósseos segmentais, mas não falham na fase inicial de implantação⁵⁵.

Dados recentes demonstram que a força mecânica fornecida pela hidroxiapatita pode ser benéfica a longo prazo, dependendo da aplicação a que este material esteja destinado. O composto bifásico 60% HA/40% TCP- β vem sendo considerado o melhor material conhecido, uma vez que sua capacidade alia a rápida solubilidade do TCP- β à superior biocompatibilidade da HA^{53,56}.

Como já revisado o uso de material biocerâmico combinado, onde o TCP funciona como precursor amorfo de osso e a HA é similar a parte mineral óssea, resulta na formação de uma estrutura, mas que tem limitada aplicação em defeitos amplos⁵⁷.

Já com relação ao uso do GH, observou-se que é possível incorporar o hormônio de crescimento humano recombinante em uma matriz de PLGA. Através deste dispositivo, conseguiu-se quantificar a liberação do hormônio, e pode-se observar que a melhor técnica de confecção de uma matriz com a finalidade de regeneração tecidual é uma que crie estrutura o mais próximo possível do tecido que ela irá ajudar a regenerar. Este é um objetivo de extrema importância nas áreas de cirurgia bucomaxilofacial e implantodontia³⁷.

Diferentes técnicas podem ser empregadas para a confecção de matrizes poliméricas. Também tem-se a técnica de co-precipitação e a de evaporação de solventes. Em um estudo sequencial, as matrizes de PLGA foram confeccionadas por meio da técnica de evaporação de solventes, que tem sido utilizada na indústria farmacêutica para a encapsulação de fármacos, como, por exemplo, a carbamazepina⁵⁹. Esse método é de simples execução e não necessita de equipamentos sofisticados. O material geralmente empregado para essa técnica é um polímero, e o PLGA está entre os mais utilizados^{38,58}.

Outro fator relevante na escolha do método de fabricação das matrizes foi a possibilidade de criá-las com características favoráveis à regeneração óssea. Assim sendo, apesar de a técnica de co-precipitação apresentar a vantagem de aumentar a área de superfície das matrizes (até 200%, justificado pela formação de estruturas de nano ou microsferas⁴⁶, ao passo que a evaporação de solventes pode crescer apenas 40%), ela é menos eficaz no desenvolvimento de rugosidade superficial e interconectividades, presentes nas matrizes confeccionadas previamente³⁷. Sabe-se que essas propriedades são imprescindíveis para auxiliar a migração e adesão celular e as trocas metabólicas, além de proporcionar um suporte mecânico^{38,58}.

Com relação ao uso do GH, realizou-se um estudo em porcos avaliando o reparo de feridas administrando-se o GH localmente, onde foi observado que há um maior aumento na produção do IGF-I e de colágeno tipo 1 no grupo experimental, quando comparado ao grupo controle, sugerindo que o tratamento local com GH

efetivamente acelera o reparo³⁵. Na área médica há uma linha que preconiza o uso de fatores de crescimento (BMPs: *bone morphogenetic proteins*) em fraturas de tíbia, por exemplo. Sustenta-se que esses fatores são uma alternativa ao uso de enxertos, exceto o autógeno, pois eles exerceriam a função de osteoindução nesses casos. Sugere-se o seu uso em reconstruções de grandes defeitos, inclusive^{36,37}.

Há, também, estudos que demonstram que o uso tópico do hormônio de crescimento humano recombinante (rhGH) tem acelerado o processo de osseointegração, estimulando a osteogênese e também acelerando o processo de remodelação óssea e maturação em volta dos implantes⁶⁰. Outros autores demonstraram que a administração local de rhGH resultou em diferenças histomorfométricas extremamente significantes entre os implantes tratados com o hormônio e os controles⁶¹. Em geral, observou-se maior densidade óssea ao redor do implante com rhGH em relação aos não tratados com rhGH após 14 dias⁶¹.

Outra avaliação se deu com a administração local de rhGH em uma dose única no momento cirúrgico do implante e verificou-se uma aceleração do processo de osseointegração²⁴. Esses autores demonstraram que o uso local de rhGH foi capaz de melhorar a resposta óssea em implantes colocados em tíbias de coelho jovem em um nível estatisticamente significativo²⁴.

Em um estudo conduzido em cães, após avaliação histológica do efeito do uso do GH ao redor de implantes colocados imediatamente em alvéolos pós-exodontia, foi observado que a densidade óssea foi maior e com uma melhor orientação das fibras colágenas no sítio onde o GH foi administrado⁶².

Em estudo de 2009, autores mostraram que a aplicação tópica de 4UI (Unidades Internacionais) de GH na superfície de implantes apresentou um aumento na formação óssea. Isso pode ser interpretado como um efeito direto do hormônio em células progenitoras mesenquimais, estimulando linhagens de osteoblastos. Sugere-se que o efeito positivo se dá durante o processo de integração óssea precoce. Assim, a possibilidade de aplicação do GH no momento da inserção dos implantes poderia potencializar a previsibilidade do tratamento⁶¹.

Outro trabalho evidenciou melhores resultados de defeitos ósseos críticos tratados com biomaterial associado ao GH. Foram realizados defeitos ósseos em cães, e o grupo do TCP (biomaterial) associado ao GH mostrou melhores resultados e estrutura na formação óssea, sugerindo ser uma opção em casos de regeneração óssea guiada⁶³.

Foi observado, também, que a administração local do GH, quando liberado a partir de um biomaterial carreador tipo fosfato, é capaz de melhorar o processo de substituição do biomaterial por osso, pela aceleração do processo de remodelação óssea⁶³.



4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostra

Optou-se por determinar uma amostra com $n=6$, totalizando 12 animais, baseado nos artigos de Valiati R *et al.*(2012)⁶⁴, Walsh WR *et al.*(2008)¹³, Walsh *et al.*(2003)⁶⁵ e Stubbs D *et al.*(2004)⁵⁴.

A pesquisa foi realizada junto ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, área de concentração Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofaciais (CTBMF), da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), em conjunto com a Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) – campus de Lages/SC e Joinville/SC (Termo de Cooperação de Pesquisa Científica, anexo 2) e com a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da PUCRS sob o número 13/00342.

4.2 Animais

O estudo foi desenvolvido em coelhos brancos da raça Nova Zelândia, espécie *Oryctolagus cuniculus*, da ordem Lagomorpha, gênero *Oryctolagus*, machos, adultos jovens, com aproximadamente 10 meses de idade, pesando entre 4,0Kg a 5,0Kg cada.

Durante o estudo, a manutenção dos animais foi feita sob condições satisfatórias, com temperatura, umidade e iluminação adequadas, no Biotério da UDESC, de Lages/SC. Os animais permaneceram em gaiolas individuais apropriadas ao tamanho de cada animal e suspensas, evitando assim o contato direto com urina e fezes. A dieta foi instituída com ração específica para a espécie e água *ad libitum*.

Foi realizado, com o uso de brocas tipo trefina, 4 sítios para inclusão do material em estudo em cada calvária de coelho. Os sítios tiveram diâmetro de 8mm e espessura total da calota dos animais, sendo preservada a integridade da duramater.

4.3 Organização dos grupos experimentais

Os grupos foram organizados da seguinte forma:

Grupo 1 – Avaliação do carreador do hormônio GH

- Cavity A: foi mantido somente com o coágulo.
- Cavity B: foi inserido o osso triturado.
- Cavity C: PLGA com hormônio do crescimento.
- Cavity D: osso triturado com hormônio do crescimento.

Grupo 2 – Avaliação de 2 substitutos ósseos com controle de biomaterial (HA) e controle padrão (osso triturado autógeno)

- Cavity A: HA
- Cavity B: osso triturado
- Cavity C: HA/TCP- β
- Cavity D: HA/SiO₂n

Desenho esquemático dos Grupos:

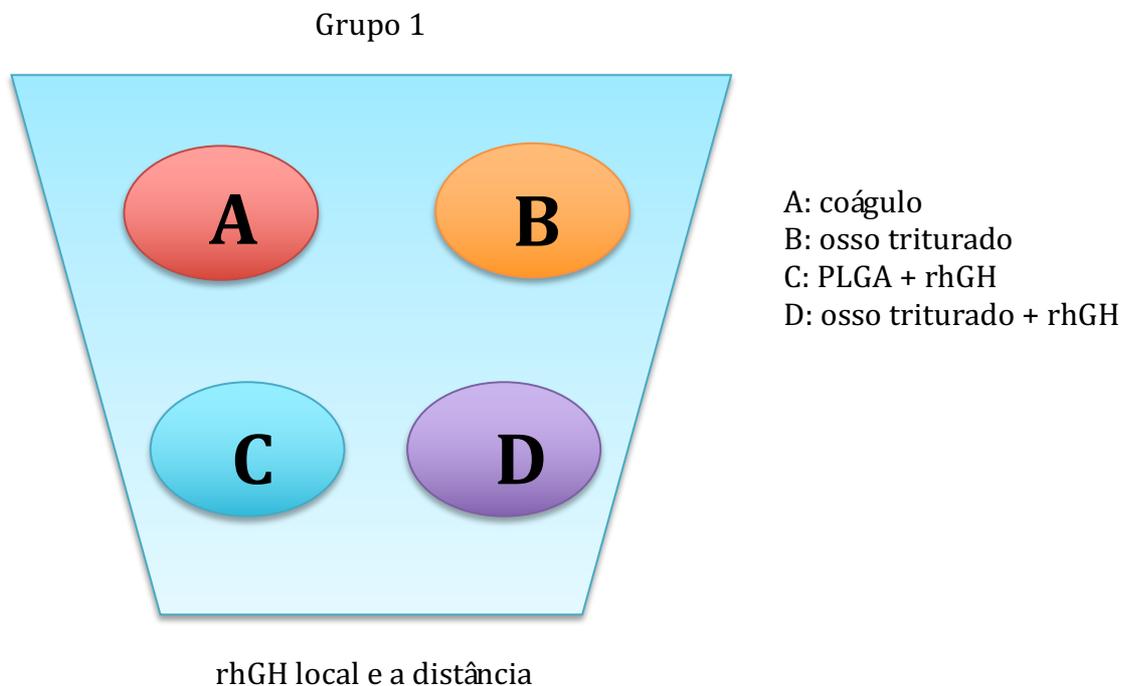


Figura 01: Desenho esquemático do grupo 1.

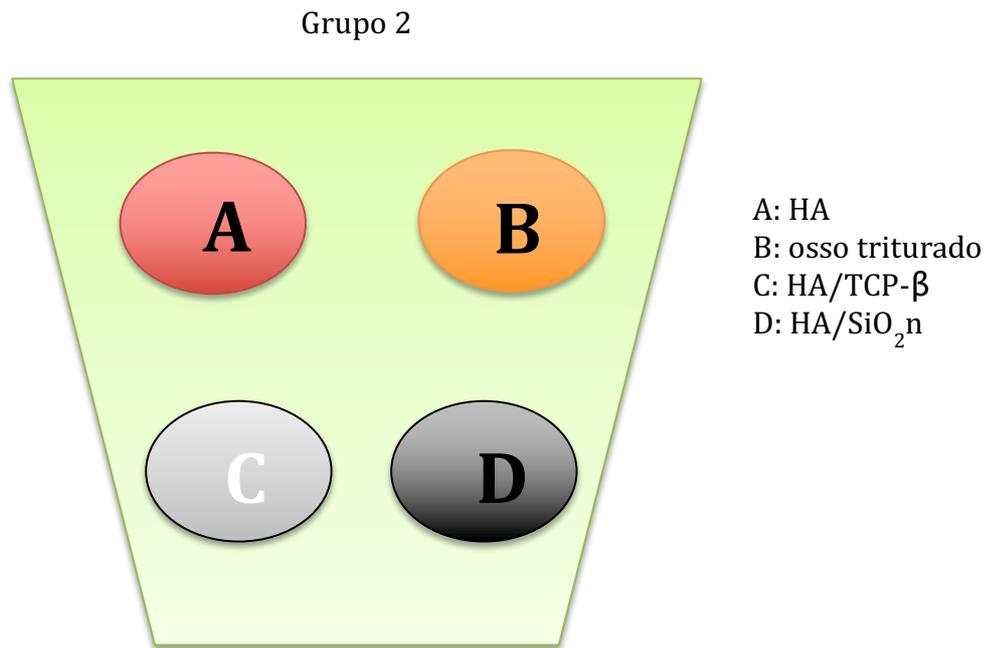


Figura 02: Desenho esquemático do grupo 2.

Os animais foram sacrificados após 6 semanas, e as amostras foram processadas para a análise no Laboratório de Pesquisa da Pós-graduação de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

4.4 Fornecimento dos materiais teste

Este projeto está vinculado à pesquisas previamente realizadas na PUCRS . O PLGA associado ao hormônio do crescimento foi feito previamente pelos alunos Ricardo Fernandes Garcia (Protocolo PUC/RS 076/2011) e Aline Adelaide Paz da Silva Duarte. O PLGA utilizado no estudo foi o Purasorb®, comercializado pela empresa Purac, na proporção 50:50, igual proporção dos ácidos láctico e glicólico. Vendido comercialmente como Purasorb® PDLG 5010.

As associações de materiais HA/TCP- β e HA/SiO₂n foram fornecidas pelo Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC – Campus Joinville (anexo 2 - Termo de Cooperação entre as Universidades). Estes foram elaborados seguindo o método por via úmida descrito por Dalmônico (2011)¹⁰.

Os biomateriais, fornecidos pela UDESC, utilizados no presente estudo se apresentavam sob a forma de biomateriais granulados microporosos nanoestruturados, com tamanhos variando entre $200\mu\text{m} < d < 500\mu\text{m}$. A tabela 1 mostra os biomateriais e suas composições.

CONTROLE DE AMOSTRAS:			
LOCAL: Joinville - SC, Lote: 16/10/2013			
CÓDIGO:	DESCRIÇÃO:	COMPOSIÇÃO:	FORMA:

HA	Biomaterial Matriz HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Grânulos $200\mu\text{m} < d < 500\mu\text{m}$
60%HA/40%TCP	Biomaterial Bifásico HA/TCP	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 / \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 - \beta$	Grânulos $200\mu\text{m} < d < 500\mu\text{m}$
HA/SiO ₂ 5%	Biomaterial Nanocompósito	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 / \text{SiO}_2 \text{n}$	Grânulos $200\mu\text{m} < d < 500\mu\text{m}$

Figura 3: Tabela com as especificações dos biomateriais fornecidos pelo Grupo de Estudos da UDESC.

4.5 Procedimentos cirúrgicos

Para a realização desta pesquisa foram obedecidos os princípios de biossegurança e controle de infecção. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Hospital Veterinário da UDESC (anexo Termo de Cooperação – anexo 2).

Os animais foram submetidos a um período de jejum alimentar de 5 horas e hídrico de 3 horas previamente ao procedimento experimental. Foi realizada tricotomia da região da cabeça localizada entre a região frontal, parietal e a zigomática para o procedimento cirúrgico; além da região do pavilhão auricular dorsal, para canulação da veia marginal da orelha (Figura 4A).

Na sala de pré-anestesia, após a aferição do peso e parâmetros clínicos como frequência respiratória, cardíaca e tempo de perfusão capilar, os animais foram pré-medicados com Tiletamina + Zolazepam (Zoletil 100®) na dose de 20mg/Kg e Xilazina (Anasedan®), 3mg/kg, administrados por via intramuscular. Após o estabelecimento do efeito da medicação pré-anestésica, os animais foram posicionados em decúbito esternal sobre colchão térmico ativo, sendo a veia marginal da orelha canulada com cateter 24G para administração de NaCl 0,9% a 6 gotas/minuto. A manutenção da anestesia foi realizada através de uma máscara acoplada a um sistema sem reinalação de gases com administração de Isoflurano (Isoforine®) 1 a 1,5 CAM (concentração alveolar mínima), diluído em oxigênio a 100%, com fluxo de 2L/min, através de um vaporizador universal (Oxygel®). Foi realizada também a anestesia infiltrativa com 0,5ml de lidocaína (2%) (Xylestesin®) na região frontoparietal.

A antisepsia da pele foi realizada com aplicação tópica de polivinilpirrolidona-iodo a 1% (Povidine®), e os campos cirúrgicos estéreis isolaram a área operatória (Figura 4B).

A incisão foi realizada com espessura total até o periósteo com lâmina número 15 com aproximadamente 5cm sobre a sutura sagital e centro do frontal, e

após foi realizada a dissecação dos tecidos moles com descolador freer (Golgran®) (Figura 4C).

Duas cavidades foram realizadas em cada osso parietal, com cuidados para se manter a integridade da dura-máter. Para a realização de tais cavidades, utilizou-se uma broca trefina com 8mm de diâmetro (Neodent, Curitiba, Brasil), acoplada a um contra-ângulo redutor 20:1 montado em um motor elétrico, o que proporciona um total de 800 rotações por minuto e torque apropriado para a remoção de blocos ósseos do osso parietal. A refrigeração da broca e tecido ósseo foi realizada por meio de irrigação constante com solução NaCl a 0,9%. Uma vez concluídas as perfurações, a porção óssea delimitada pela trefina foi delicadamente removida com o auxílio de um descolador de periosteio. Assim, ao término desta etapa, haviam sido produzidas 4 cavidades em cada animal, onde os materiais teste foram depositados (Figura 4D).

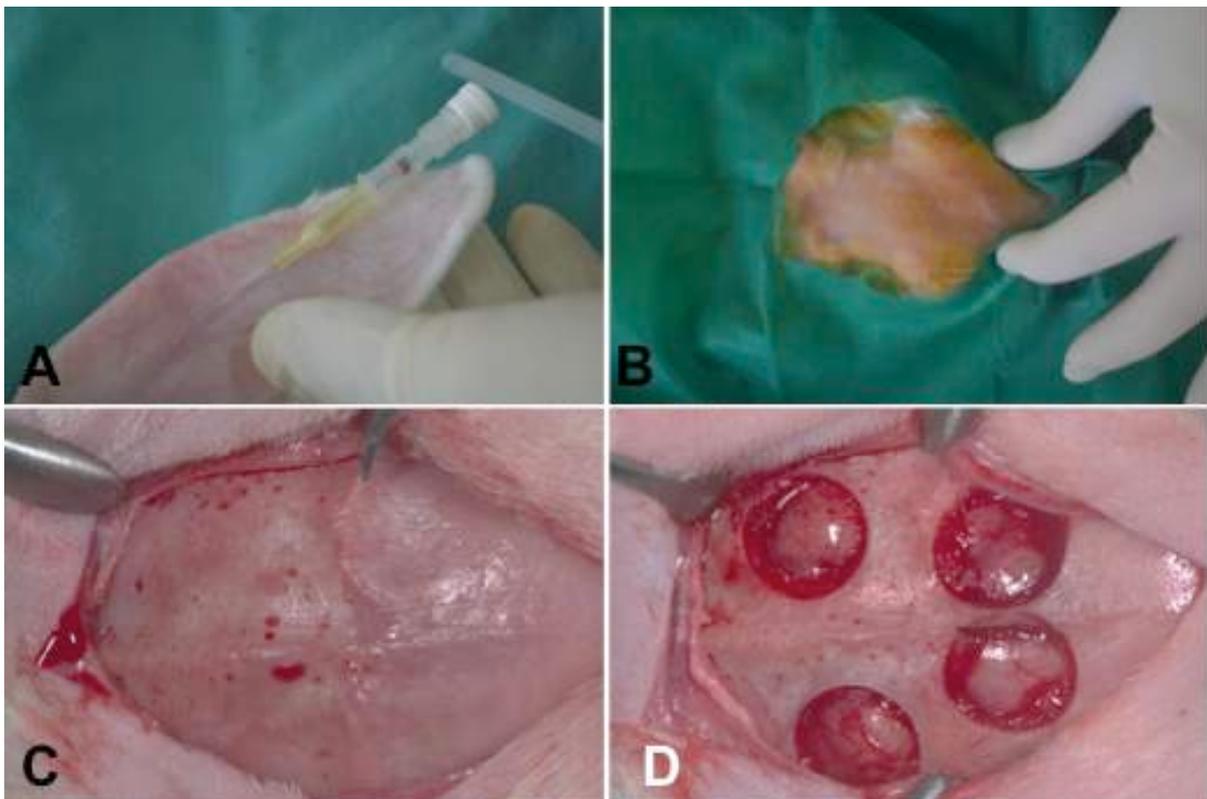


Figura 04: A – Canulação da veia marginal da orelha do coelho. B – Preparo do campo cirúrgico. C – Incisão e descolamento periosteal. D – Cavidades teste preparadas.

Os fragmentos ósseos removidos foram triturados e usados como enxerto autógeno sozinho ou misturado ao rhGH.

Uma lâmina de matriz de PLGA+rhGH, fornecida pela pesquisadora Aline Paz da Silva (PUCRS) foi recortada para inserção na cavidade (Figura 5A). Os biomateriais granulados foram embebidos em sangue removido do acesso venoso no momento da inserção dos materiais (Figura 5A).

Após a inclusão com espátula dos materiais, conforme o item 3.3 (Figuras 5B e 5C), fez-se a sutura com nylon 5.0 em 2 planos, sendo o primeiro com pontos isolados e o segundo intra-dérmico (Figura 5D).

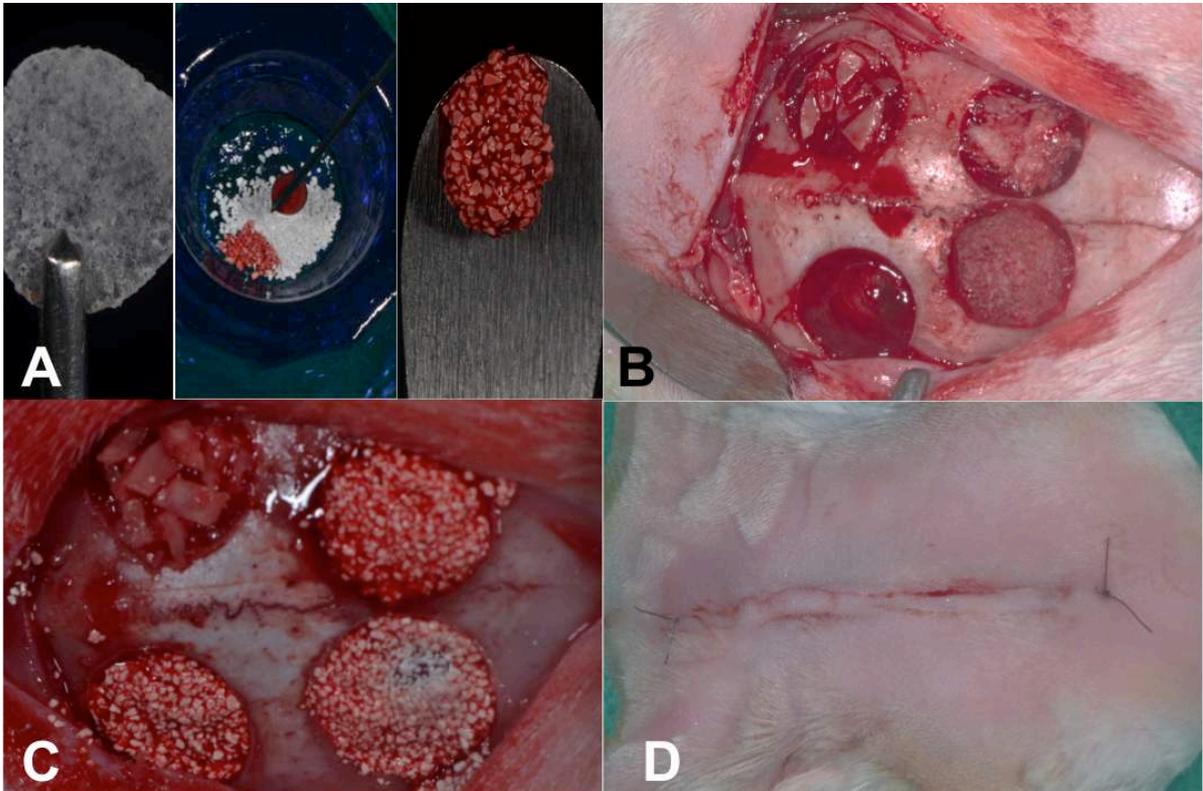


Figura 05: A – Matriz de PLGA+rhGH e biomateriais granulados sendo embebidos em coágulo. B – Cavidades teste preenchidas com materiais do Grupo 1. C – Cavidades teste preenchidas com materiais do Grupo 2. D – Sutura.

Foi instituída antibioticoterapia com enfloraxocina por via intramuscular na dose de 5mg/Kg a cada 24h. A analgesia pós-operatória foi instituída com meloxicam 0,1mg/kg a cada 24h. Em casos em que os animais manifestarem dor, uma dose de resgate com tramadol 2mg/Kg foi administrada.

O procedimento foi repetido de forma idêntica para todos os animais e pelo mesmo operador.

Após o término das cirurgias, os animais permaneceram no biotério da UDESC, sob cuidados dos pesquisadores e orientação de médicos veterinários.

Os animais foram sacrificados após 6 semanas. A eutanásia foi realizada conforme a Resolução CFMV (Conselho Federal de Medicina Veterinária) n 1000.2012, de 11 de maio de 2012. Para tal, foi utilizada uma superdose de mistura anestésica contendo Ketamina e solução aquosa a 2% de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6dihidro-4-H-1,3-tiazin. Após isto, procedeu-se com a remoção dos blocos ósseos da calota com broca tronco-cônica, e as áreas testes foram divididas para termos um plano de inclusão e clivagem.

4.6 Procedimentos laboratoriais e de análise

Os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Pesquisa da Pós-graduação em Odontologia da UFSC.

Após a coleta, os espécimes foram mantidos em solução de formalina tamponada a 10%. Em seguida as peças foram submetidas à descalcificação por imersão em solução de EDTA a 10%, em agitação constante até descalcificação, foram processadas e incluídas em parafina. Procedeu-se então para os cortes das amostras e preparo das lâminas para análise histológica.

Os cortes realizados com micrótomo foram no sentido longitudinal com espessura de $3\mu\text{m}$. As lâminas histológicas foram coradas pela técnica da Hematoxilina e Eosina (HE).

4.7 Análise dos enxertos por Microscopia Óptica

A análise foi feita por histologia descritiva avaliando-se: remodelação óssea, deposição de fibras colágenas, preenchimento de lacunas osteocíticas, incorporação do enxerto, infiltrado inflamatório e presença de osteoblastos. Essa avaliação foi realizada seguindo parâmetros da pesquisa de Valiati R et al (2012)⁶⁴.

As lâminas foram avaliadas em toda a sua extensão e a análise da área teste feita com aumentos de 50x, 100x e 400x.



5 - RESULTADOS

Um coelho do Grupo 2 teve alterações neurológicas, provavelmente por lesão de duramater, no pós-operatório imediato e foi submetido a eutanásia, restando assim 5 coelhos neste grupo. Além disso, durante o preparo do material para histologia ocorreu a perda de 2 amostras do grupo 1 (1c e 1d) no laboratório durante o processamento. Assim, do material histológico preparado foi realizado a avaliação descritiva de cada grupo:

Grupo 1

1a: Coágulo

1b: Autógeno

1c: PLGA + GH

1d: Autógeno + GH

Grupo 2

2a: HA

2b: Autógeno

2c: HA/b-TCP

2d: HA/ SiO₂n

Os resultados da Figura 6 demonstram que no grupo 1a (coágulo) foi possível observar remodelação óssea, com lacunas osteocíticas preenchidas em 4 das 6 amostras. Além disso, ocorreu deposição de fibras colágenas (Figura 6B). Em 2 das 6 amostras, podem ser observados espaços medulares amplos e discreta deposição de fibras colágenas. Observou-se ausência de infiltrado inflamatório nas amostras.

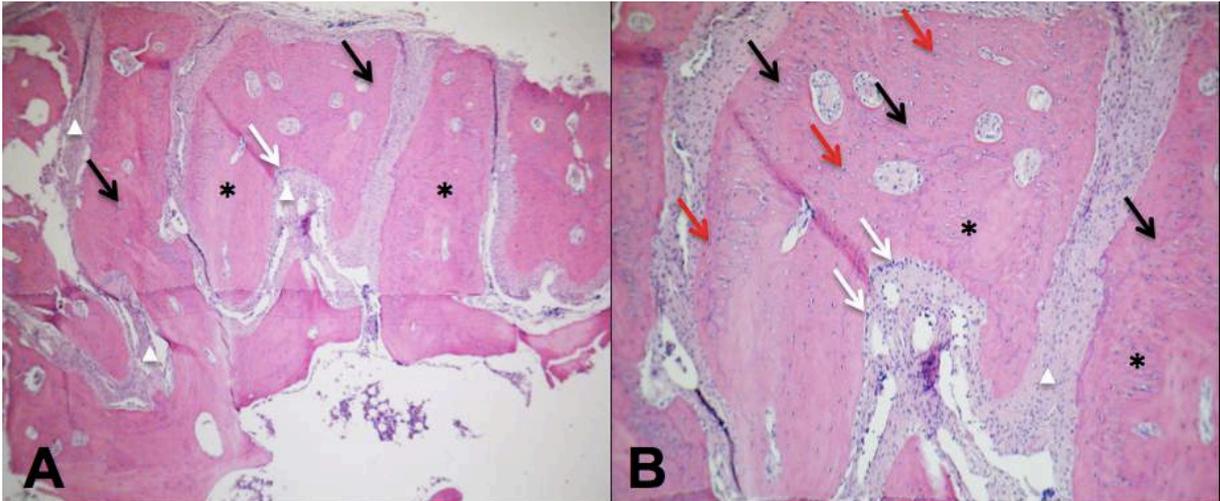


Figura 06: Coágulo: A e B – MO mostrando formação (asteriscos pretos) e remodelação óssea (setas pretas) com presença de osteócitos (setas vermelhas). Observa-se as fibras colágenas (triângulos brancos) e osteoblastos marginado a formação óssea (setas brancas). A – 50x e B – 100x.

A análise do grupo 1b (osso autógeno) mostra remodelação óssea, com lacunas osteocíticas apresentando osteócitos em 5 das 6 amostras (Figura 7A) e osteoblastos em algumas regiões. Em 1 amostra foi verificada deposição óssea, mas com amplos espaços medulares. Há deposição de fibras colágenas em algumas áreas em todos os casos e discreto infiltrado inflamatório em 2 amostras analisadas. É possível observar claramente a incorporação do enxerto em 2 casos (Figura 7B).

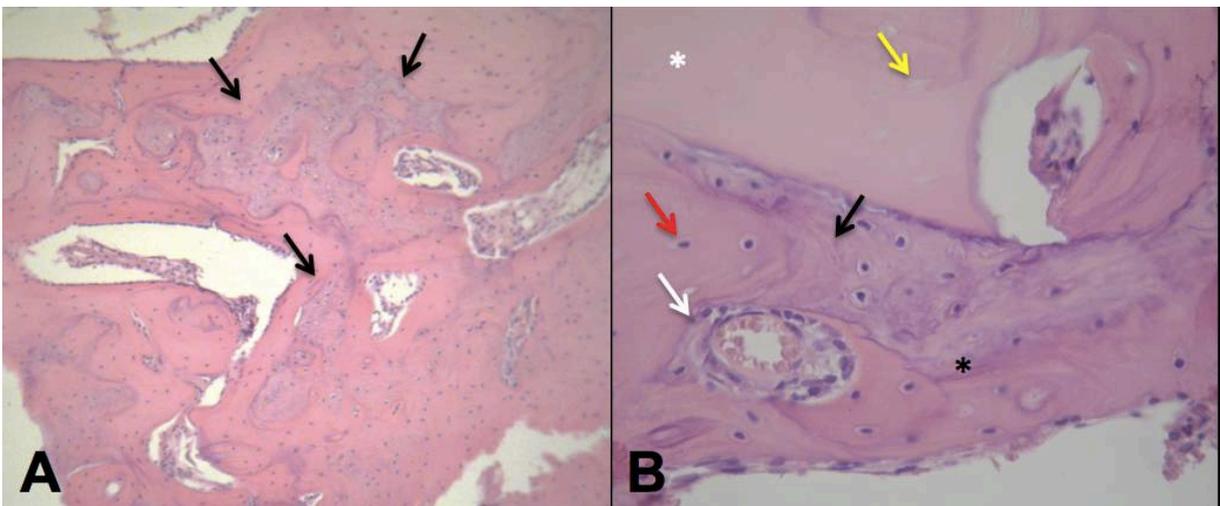


Figura 07: Osso Autógeno: A – Imagem de MO mostrando a remodelação óssea (setas pretas), aumento de 50x. B – área com presença de tecido ósseo maduro de um fragmento de enxerto (asterisco branco), com neoformação óssea na periferia (asterisco preto). Presença de osteoblastos (seta branca), osteócitos (seta vermelha) e lacunas osteocíticas (seta amarela), aumento de 400x.

A análise do grupo 1c (Figura 8) mostra remodelação óssea com lacunas osteocíticas preenchidas no grupo 1c (PLGA + GH), principalmente na periferia da cavidade teste. Evidenciou-se o não preenchimento total da cavidade em 3 das 5

amostras, corroborando com os achados macroscópicos clínicos de não formação óssea em toda a cavidade, inclusive havendo aspecto borrachóide em algumas amostras. Também foi verificada a presença de discreto infiltrado inflamatório em 3 amostras

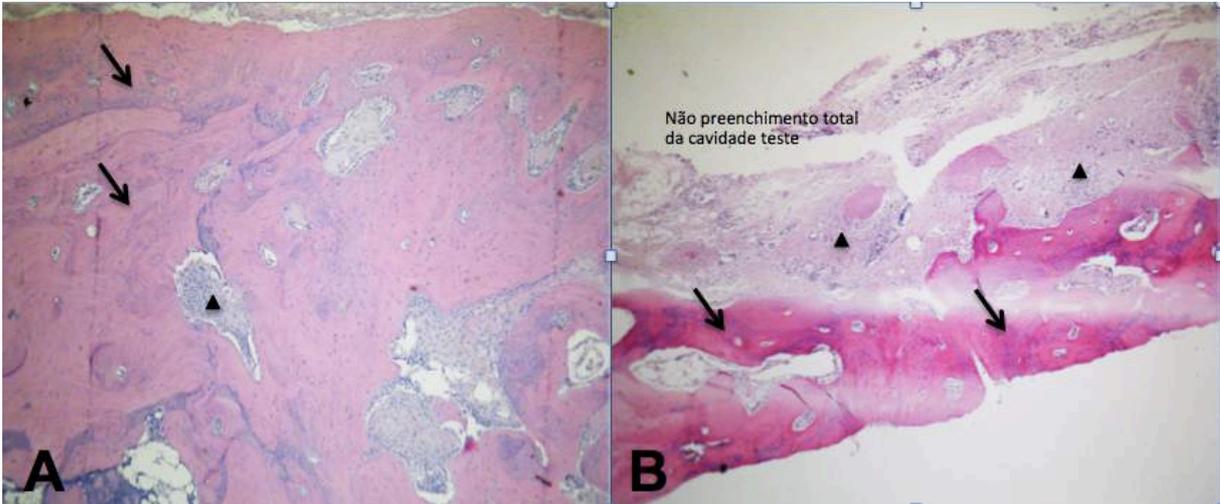


Figura 08: PLGA + GH: A e B – MO mostrando remodelação óssea (setas pretas), com presença de infiltrado inflamatório (triângulo preto) e não preenchimento total da cavidade teste. Aumento de 50x.

A análise do grupo 1d (autógeno + GH) demonstrou remodelação óssea ao redor dos grânulos do enxerto, com deposição de fibras colágenas em todas as amostras (Figura 9B). Foi observado discreto infiltrado inflamatório em algumas áreas em 2 das 5 amostras, e em duas amostras observou-se não preenchimento total da cavidade teste. Além disso, foi verificada a presença de material amorfo na maioria das lâminas (3 de 5) (Figura 9).

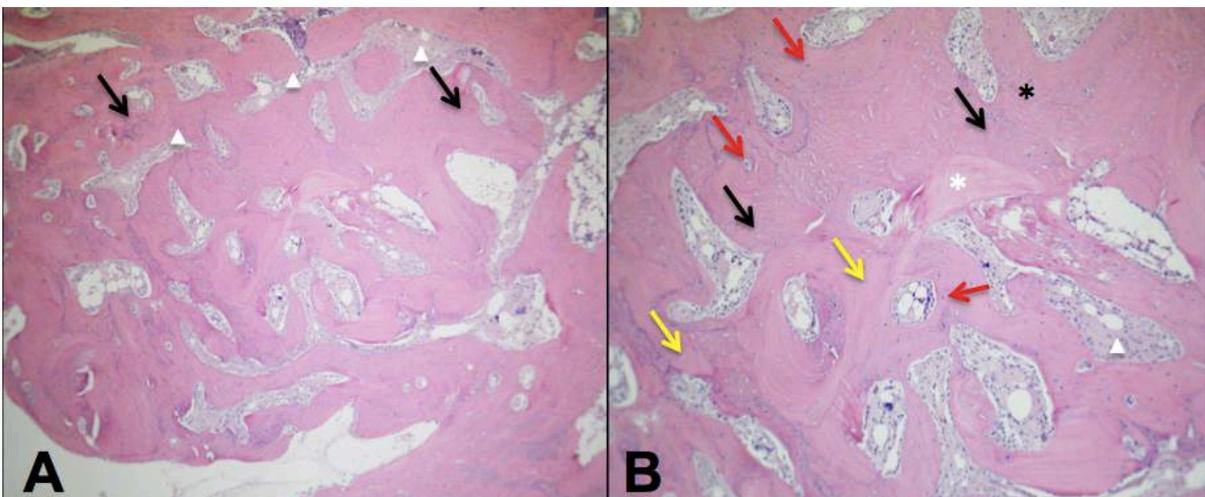


Figura 09: Autógeno + GH: A e B – Remodelação óssea (setas pretas) ao redor dos grânulos de osso autógeno (asterisco branco). Lacunas osteocíticas (setas amarelas) e osteócitos (seta vermelha). Deposição de fibras colágenas (triângulo branco). Aumento A 50x e B 100x.

Conforme ilustrado na Figura 10, a análise do grupo 2a (HA) demonstrou a presença de boa formação óssea ao redor do biomaterial em todas as 5 amostras, com a incorporação do biomaterial na quase totalidade da cavidade teste. Somente em 1 amostra há incorporação completa de todo o material, mas esta apresenta amplos espaços medulares e não se visualiza deposição de fibras colágenas. Duas amostras apresentaram infiltrado inflamatório discreto. Verifica-se, assim como em alguns casos do grupo 1 que essas áreas são as mais distantes do leito receptor, sugerindo a não estimulação local pela dificuldade de revascularização. Foi verificada pouca presença de osteoblastos em todas as amostras (Figura 10).

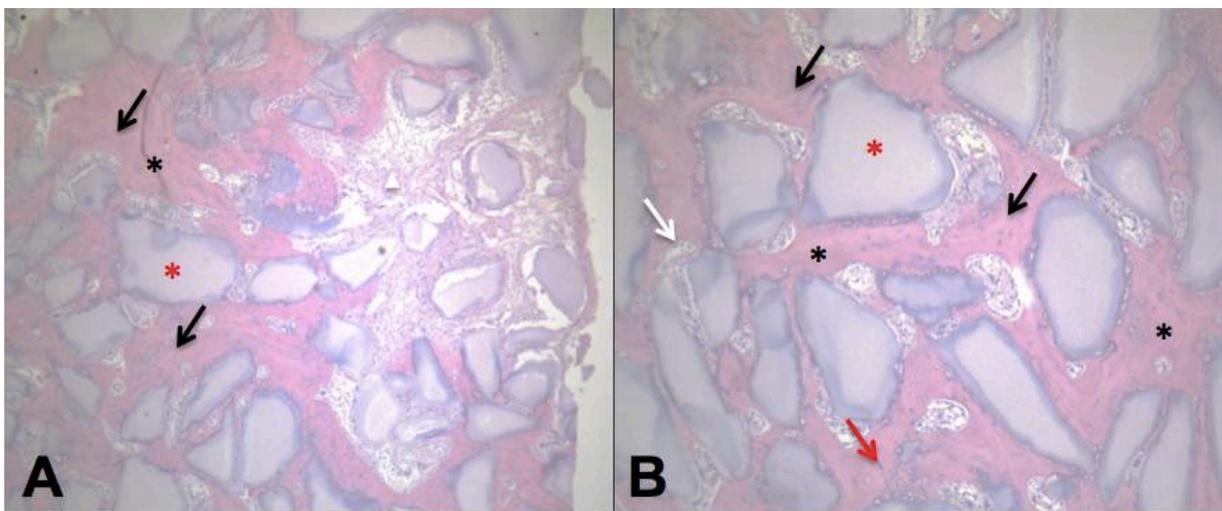


Figura 10: HA: A e B – MO evidenciando boa formação e remodelação óssea (setas pretas) ao redor do biomaterial (asterisco vermelho). Osteócito (seta vermelha). A – aumento de 50x. B – Aumento de 100x.

A análise do grupo 2b (autógeno) revelou remodelação óssea em todas as 5 amostras, presença dos grânulos de enxerto autógeno com formação óssea periférica e espaços medulares em 1 amostra. Foi observada ainda a formação de tecido conjuntivo com discreto infiltrado inflamatório em 3 das 5 amostras, além da presença de osteoblastos margeando a neoformação óssea nas amostras (Figura 11).

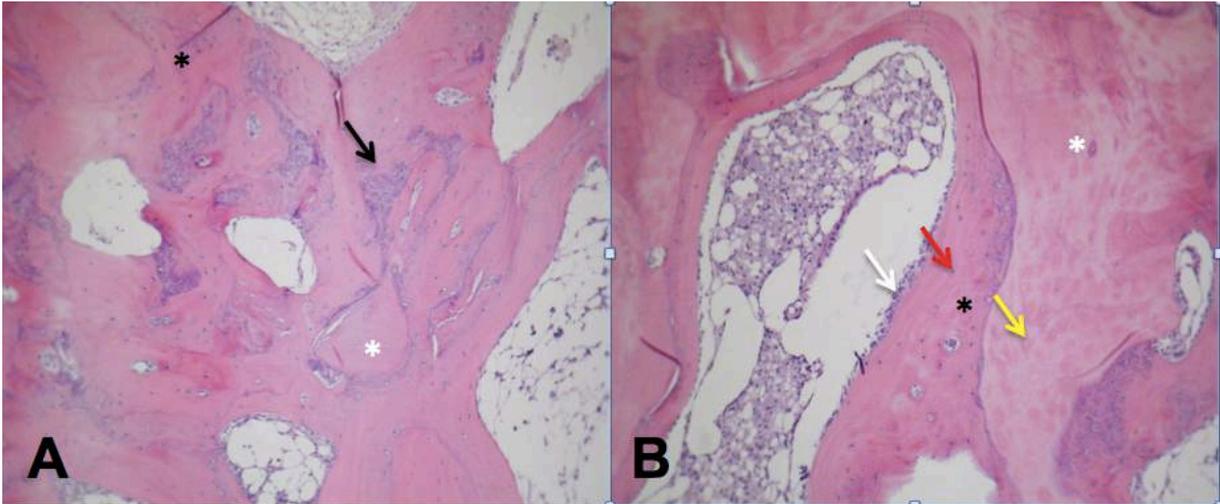


Figura 11: Autógeno: A e B – Remodelação óssea (setas pretas) e deposição óssea (asteriscos pretos) ao redor dos grânulos do enxerto (asterisco branco), em aumento de 50x e 400x, respectivamente. Osteócito (seta vermelha), lacunas osteocíticas (seta amarela), osteoblastos (seta branca).

Conforme observado na Figura 12, o grupo 2c (HA/TCP- β) apresentou presença de formação óssea ao redor de grande parte do biomaterial em 3 das 5 amostras. Em 2 amostras, foi possível verificar que uma área significativa não apresentava incorporação do biomaterial. Nessas áreas, há deposição de fibras colágenas e um infiltrado inflamatório discreto. Não se visualizam osteoblastos na maioria dos campos de todas as amostras. Além disso, o biomaterial parece estar em processo de reabsorção em todas as amostras (Figura 12).

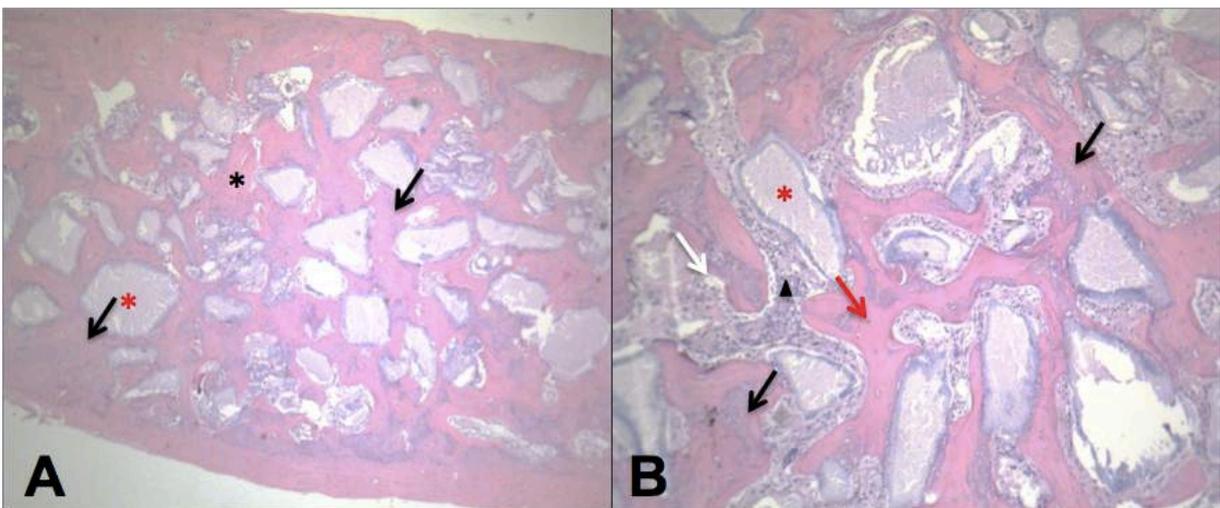


Figura 12: HA/TCP- β : A – MO evidenciando a incorporação do biomaterial com deposição e neoformação óssea (setas pretas). Aumento de 50x. B – Amostra com remodelação óssea ao redor dos grânulos e deposição de fibras colágenas (triângulos brancos) com discreto processo inflamatório (triângulo preto). Aumento de 100x.

Por fim, a avaliação do grupo 2d (HA/SiO₂n) demonstrou a presença de neoformação óssea ao redor dos grânulos do biomaterial, e observa-se que o mesmo está em processo de reabsorção. Não há formação de osso por toda a

região contendo biomaterial em 1 amostra, sendo que nessa região foi possível observar a presença de deposição de fibras colágenas. Nas áreas com deposição óssea, há remodelação em todas as 5 amostras. Não foi observado processo inflamatório. Contudo, a presença de reabsorção do biomaterial foi verificada, em graus variados, comparando-se todas as 5 amostras (Figura 13).

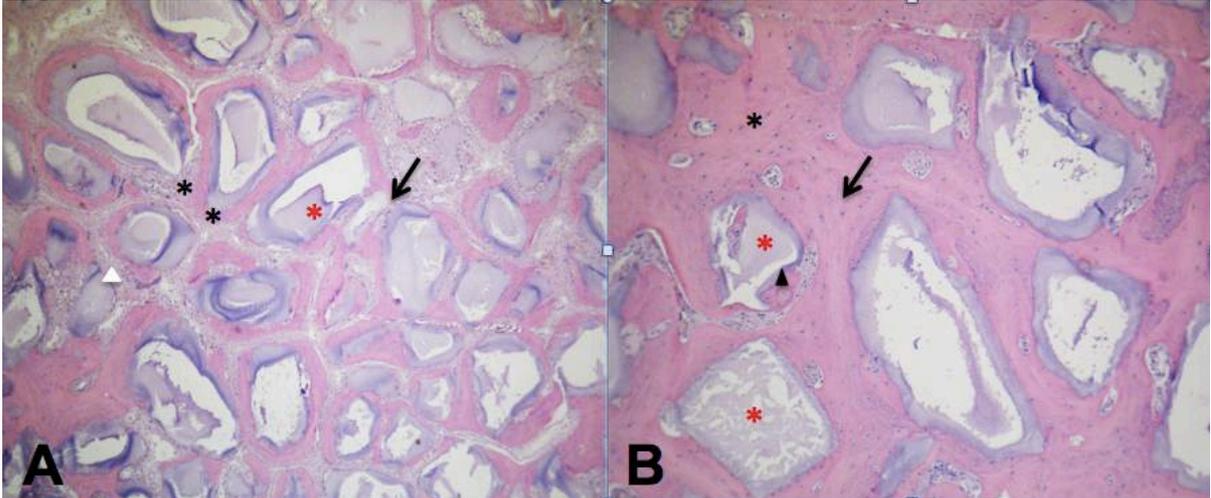


Figura 13: HA/SiO₂n: A – MO evidenciando neoformação óssea (asteriscos pretos) ao redor dos grânulos de biomaterial (asterisco vermelho) em processo de reabsorção. Aumento de 50x. B – Amostras semelhantes ao A em aumento de 100x.



6 – DISCUSSÃO

Os biomateriais empregados neste estudo foram obtidos pelo método de síntese por via úmida, sendo que os biomateriais granulados apresentavam-se com uma microestrutura microporosa interconectada e grânulos variando entre 200 μ m e 500 μ m. A HA obtida por este método possui características similares às do tecido ósseo e dentário, diferentemente da hidroxiapatita sintetizada à altas temperaturas⁶⁰.

Há estudos mostrando que, com o tamanho dos grânulos variando entre 212 a 1000 micrômetros, ocorre deposição de tecido fibroso sobre os grânulos de hidroxiapatita, lenta reabsorção e baixa capacidade de formação óssea⁶⁰. Nestes mesmos estudos, foi observado que a HA nanoestruturada está associada a neoformação de tecido ósseo ao redor dos grânulos, indicando boa osteocondução⁶¹. De acordo com os resultados do presente estudo, não foi observada deposição de fibras colágenas, e houve discreta presença de infiltrado inflamatório em 2 amostras, o que indica boa biocompatibilidade. A não formação óssea na região mais distante do leito receptor sugere dificuldade de vascularização, contudo isso pode não ser significativo em um tempo de estudo maior.

Já as biocerâmicas bifásicas e/ou nanocompósitos, surgiram pelo interesse de melhorar as características de solubilidade da hidroxiapatita e dos fosfatos de cálcio em meios biológicos^{3,13}. Estudos prévios já relataram uma proliferação maior de osteoblastos sobre a superfície microporosa dos biomateriais nanoestruturados de cerâmica de HA e HA/TCP- β , e permitindo forte ligação na interface biomaterial/tecido ósseo^{16,29}. No caso dos materiais testados neste trabalho, conseguiu-se verificar a boa incorporação dos materiais, mas em todos os casos não se verificou a presença marcante de osteoblastos. Os dados obtidos no presente estudo estão de acordo com aqueles da literatura^{16,29}, uma vez que houve uma boa formação óssea ao redor dos grânulos, sugerindo a forte interface biomaterial/tecido ósseo, inclusive em toda a interface das paredes ósseas da cavidade teste com biomaterial.

Como o TCP- β apresenta degradação rápida em meio fisiológico, há diminuição da área de superfície para a proliferação óssea⁶². Ainda assim, este material é considerado melhor para a formação óssea em relação a HA^{63,64}. Desta forma, pesquisou-se a utilização de materiais bifásicos para associar a boa solubilidade com maior resistência mecânica⁶⁵.

Diferentes autores já têm sugerido o material bifásico em relação ao TCP- β isolado por sua boa bioatividade associada a solubilidade mais lenta, permitindo uma osteocondutividade^{62,65}. Isso corrobora com os resultados obtidos no presente estudo, onde o material bifásico, contendo o TCP- β , apresentou-se em processo de degradação maior que a hidroxiapatita isolada.

Foi verificado, neste estudo, uma degradação inicial do material bifásico HA/TCP- β , e do HA/SiO₂n, porém com formação de tecido ósseo. Nesses casos, utilizou-se a HA, que confere resistência mecânica.

No caso dos nanocompósitos, presume-se que a deposição óssea ocorra em função da alta porosidade do biomaterial, que permite uma acentuada agregação de prolongamentos celulares e proteínas diversas no interior do grânulo, como etapa normal do processo de cicatrização⁶⁷.

No caso da incorporação de Silicato à estrutura cristalina das cerâmicas, há um aumento da taxa de reabsorção *in vivo* em relação às hidroxiapatitas estequiométricas tradicionais, e uma resposta de cura acelerada³. Nos materiais testados, as amostras contendo o silício mostraram incorporação do material e neoformação óssea em praticamente todas as amostras, sugerindo assim, formação óssea condizente com o trabalho citado³. O silício é essencial para o desenvolvimento normal do esqueleto e a saúde vascular. Também desempenha um papel na mineralização óssea e no metabolismo e síntese de colágeno³. Em um modelo de estudo, sugere-se que a sílica incorporada mantém uma estrutura mais estável e permite o desenvolvimento mais rápido de osso funcional³. No presente estudo, não foi possível afirmar isso somente com um tempo de cicatrização.

Considera-se o composto bifásico 60% HA/40% TCP- β , até o presente momento, como o melhor material conhecido, pois sua capacidade alia a rápida solubilidade do TCP- β à superior biocompatibilidade da HA^{66,67}. No atual estudo, temos que o composto bifásico HA/SiO₂n apresentou resultados semelhantes em relação à associação HA/TCP- β , indicando uma nova possibilidade de biomaterial para a aplicabilidade clínica.

Com relação ao grupo que recebeu rhGH, tem-se parâmetros de avaliação usados mais diretamente com o implante na maioria dos trabalhos pesquisados⁵⁷. O presente estudo fez a associação de uma matriz polimérica com o rhGH com o objetivo de avaliar uma possível regeneração óssea guiada.

Realizou-se, previamente, estudo avaliando reparo de feridas em porcos, onde se mostrou que o uso local de rhGH aumentou a produção de IGF-I e colágeno tipo I⁴⁵. O rhGH funcionaria como um indutor de fator de crescimento. Estes já usados em fraturas de tíbias, por exemplo, e inclusive sendo sugeridos em reconstruções de grandes defeitos⁴⁵.

Outra linha de pesquisa é na aceleração da osseointegração e melhora da densidade ao redor dos mesmos⁴¹. Sugere-se que o efeito positivo se dá durante o processo de integração óssea e, assim, aumentando a previsibilidade do tratamento⁴¹.

Há estudo prévio que encontrou melhores resultados em biomateriais TCP associados ao GH em relação a estrutura da formação óssea⁶⁷. E no processo de substituição do biomaterial por osso, pela aceleração do processo de remodelação óssea⁶⁷. Mas neste trabalho, foi realizada a avaliação sem o uso associado a derivados de fosfato ou HA.

No atual trabalho, verificamos que não houve diferença observacional nos achados microscópicos das cavidades teste de autógeno em relação ao autógeno com rhGH. A cavidade teste com a matriz de PLGA associada ao rhGH não mostrou formação óssea completando a cavidade teste macro e microscopicamente em 3 das 5 amostras. Notou-se que a matriz havia sido totalmente reabsorvida ao final das 6 semanas desse estudo.

As matrizes utilizadas nesse estudo são resultados de pesquisa prévia⁴⁷ onde se determinou a taxa de perda de massa das matrizes com rhGH, a concentração de hormônio liberada, em um meio que simula o ambiente *in vivo*, e também a estabilização do pH⁴⁷.

Os resultados *in vivo* desse material neste estudo, apesar de não formação óssea em toda a cavidade, mostraram neoformação óssea com as lacunas osteocíticas preenchidas. Isso significa presença de osso maduro. Visualizou-se, também, remodelação óssea nessas áreas, condizente com a estimulação pelo rhGH, conforme demonstrado nos estudos prévios citados, onde se atribui uma aceleração desse processo⁶⁷.

Também deve-se considerar que, devido a degradação do PLGA, não havia um material osteocondutor por um período semelhante aos biomateriais com HA. E devido a isso, pode não ter ocorrido a formação óssea em toda a cavidade. Outro ponto que deve ser avaliado é que a presença de grânulos de biomaterias ocupando espaço na área teste permite uma avaliação observacional como se houvesse maior formação óssea. Mas isso quantitativamente pode não expressar a realidade, pois a região teste com PLGA+GH teve formação óssea sem a presença de outros componentes (no caso os grânulos).



7 - CONCLUSÕES

1 – Neste estudo o carreador de hormônio não mostrou completa neoformação óssea na cavidade teste na maioria das amostras. Mas nas regiões com neoformação, o osso apresentou-se com lacunas osteocíticas preenchidas e com remodelação, mostrando osso maduro e viável.

2 - Este estudo mostrou a viabilidade de diferentes substitutos ósseos (HA, HA/TCP- β , HA/ SiO₂n). Em todos os casos houve neoformação óssea.



8 - REFERÊNCIAS

- 1) De Long WG Jr, Einhorn TA, Koval K, McKee M, Smith W, Sanders R, Watson T. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *J Bone Joint Surg Am.* 2007 Mar;89(3):649-58. Review.
- 2) Francischone CE. *et al.* Osseointegração e o tratamento multidisciplinar. São Paulo: Quintessence; 2006.
- 3) Wilson LF, *et al.* Comparative Performance of three ceramic bone graft substitutes. *The Spine Journal.* 2007;7:475-90.
- 4) Camargo NHA, Delima SA, Gemelli E. Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite/TiO₂n Nanocomposites for Bone Tissue Regeneration. *American Journal of Biomedical Engineering.* 2012;2(2).
- 5) Bellini OJ. Síntese e caracterização de uma matriz óssea de fosfato de cálcio e nanocompósitos fosfato de cálcio/SiO₂ alfa para substituição e regeneração óssea. *Dissertação de Mestrado/UDESC-Joinville, p.97, 2007.*
- 6) Bauer TW, Smith ST. Bioactive materials in orthopaedic surgery: overview and regulatory considerations. *Clin Orthop* 2002;395:11–22. In: Wilson LF, *et al.* Comparative Performance of three ceramic bone graft substitutes. *The Spine Journal.* 2007;7:475-90.
- 7) Camargo NHA, *et al.* Synthesis and characterization of nanostructured ceramics powders for biomedical applications. *Revista Matéria.* 2007;12(4):574-82.
- 8) Walsh WR *et al.* b-TCP bone graft substitutes in a bilateral rabbit tibial defect model. *Biomaterials.* 2008;29:266-71.
- 9) Jensen SS, Terheyden H. Bone Augmentation Procedures in Localized Defects in the Alveolar Ridge: Clinical Results with Different Bone Grafts and Bone-Substitute Materials. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009;24(7 – suppl.):218-36.

- 10) Dalmônico GML. Síntese e Caracterização de Fosfato de Cálcio e Hidroxiapatita: Elaboração de Composições Bifásicas HA/TCP- β para Aplicações Biomédicas. Dissertação de Mestrado UDESC, Joinville, p. 99, 2011.
- 11) Levandowski-Jr N. [In vivo behavior of nanostructured bioceramics in a guided bone regeneration model in rabbits](#) [Journal] Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology, 2012-10-01 , Volume 114, Issue 4, Pages e37-e38
- 12) Souza JCP. Estudo de caracterização de pós nanoestruturados de fosfatos de cálcio e nanocompósitos fosfato de cálcio/ Al_2O_3 - \checkmark sol-gel para aplicações biomédicas. Dissertação de Mestrado - UDESC-Joinville, p.102, 2009.
- 13) Camargo NHA, Delima SA, Aguiar JF, Gemelli E, Tomyama M. Synthesis and Characterization of Nanostructures Calcium Phosphates Powders and Calcium Phosphates/ α - Al_2O_3 Nanocomposites. Journal of Advanced Materials. 2009;41(3):33-43.
- 14) Fernanda FS, Figueira M. Estudo comparativo entre a distribuição da fase cerâmica particulada e a dureza em compósito de matriz metálica. 18° CBECIMAT, 2008.
- 15) Soares C. Síntese e Caracterização de Biocimentos Nanoestruturados para Aplicações Biomédicas. Dissertação de mestrado – UDESC-Joinville, p. 91, 2006.
- 16) Chan WD, Perinpanayagam H, Goldberg HA, *et al.* Tissue engineering scaffolds for the regeneration of craniofacial bone. J Can Dent Assoc.2009;75(5):373-7.
- 17) Delima SA, Camargo NHA, Souza JCP, Gemelli E. Synthesis and Characterization of Nanocomposites Powders Calcium Phosphate/Titanium Oxide for Biomedical Applications. Congresso Internacional PTECH 2009, São Paulo, vol. 1 p. 1-12.
- 18) Viswanath B, Ravishankar N. Interfacial reaction in hydroxyapatite/alumina nanocomposites. Scripta Materialias.2006;55: 863-6.
- 19) Hassna RR, Ramay R, Zhang M. Biphasic calcium phosphate nanocomposite porous scaffold for load-bearing bone tissue engineering. Biomaterials. 2004;25:5171-80.

- 20) Jun Y, Wan H, Kweon, Hong K, Seong-Hyeon. The fabrication and biochemical evolution of alumina reinforced calcium phosphate porous implants. *Biomaterials*.2003;24:3731-39.
- 21) Daculsi G, Laboux o, Malard O, Weiss P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*.2003;14:195-200.
- 22) Kim S, Kong YM, Lee IS, Kim H. Effect of calcinations of starting powder on mechanical properties of hydroxyapatite-alumina bioceramic composite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*.2001;13:307-10.
- 23) Soares AQ, Oliveira LF, *et al.* Polimeros Biodegradáveis: Novas prespectivas para ciências farmacêuticas. *Rev. Eletrônica de Farmacia*. 2005 2 (2).
- 24) Houchin ML, Topp EM. Chemical Degradation of Peptides and Proteins in PLGA: A Review of Reactions and Mechanisms. Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com), DOI 10.1002/jps.21176
- 25) Raschke M, *et al.* Homologous growth hormone accelerates healing on segmental bone defects. *Bone*. 2001;29(4):368-73.
- 26) Sharma B, Elisseeffi JH. Engineering structurally organized cartilage and bone tissues. *Ann. Biomed. Eng.* 2004;32:148.
- 27) Guyton AC. *Textbook of medical physiology*. 11th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006.
- 28) Kolbeck S, *et al.* Homologous growth hormone accelerates bone healing – a biomechanical and histological study. *Bone*.2003;33:628-37.
- 29) Eriksen EF, Kassen M, Lagdahl B. Growth hormone, insulin-like growth factors and bone remodeling. *Eur J Clin Invest*.1996;26:252-64.
- 30) Yang S, Cao L, Cai S, Yuan J, Wang J. A systematic review of growth hormone for hip fractures. *Growth Horm IGF Res* 2012; 22(3): 97-101.
- 31) Tresguerres IF, Blanco L, Clemente C, Tresguerres JA. Effects of local administration of growth hormone in peri-implant bone: an experimental study with implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003; 18(6): 807-11.

- 32) Hajjar D, Santos MF, Kimura ET. Propulsive appliance stimulates the synthesis of insulin-like growth factors I and II in the mandibular condylar cartilage of young rats. *Arch Oral Biol* 2003; 48(9): 635-42.
- 33) Livne E, Laufer D, Blumenfeld I. Comparison of in vitro response to growth hormone by chondrocytes from mandibular condyle cartilage of young and old mice. *Calcif Tissue Int* 1997; 61(1): 62–67.
- 34) Buser D. 20 years of guided bone regeneration in implant dentistry. 2010. 2. ed. New Malden: Quintessence Publishing Co Ltd; 2009.
- 35) Kim SH, Heo EJ, Lee SW. The effect of topically applied recombinant human growth hormone on wound healing in pigs. *Wounds* [periódico online] 2009 [citado 2009 Jun 1] ; 21(6): 158-63. Disponível em URL: http://www.woundsresearch.com/files/wounds/pdfs/Kim_pA2_W07_Staff.pdf
- 36) Giannoudis PV, Dinopoulos HT. Autologous bone graft: when shall we add growth factors? *Orthop Clin North Am* 2010; 41(1): 85-94.
- 37) Garcia, RF. Incorporação do hormônio do crescimento humano recombinante (rhgh) em matriz de polímero biodegradável. 2013. 58f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.
- 38) Duarte, A. Avaliação da degradação de matrizes poliméricas biodegradáveis (PLGA) associadas com hormônio do crescimento Humano recombinante (rhGH): estudo in vitro. 2014 45f Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.
- 39) SOARES Amanda Queiroz; Oliveira, Leonardo, François; et al. Polimeros Biodegradáveis: Novas prespectivas para ciências farmacêuticas. *Rev. Eletrônica de Farmacia*. 2005 2 (2).
- 40) E.M. TOPP. Chemical Degradation of Peptides and Proteins in PLGA: A Review of Reactions and Mechanisms. Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com), DOI 10.1002/jps.21176

- 41) LIU, X., and M.A, P.X. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann. Biomed. Eng.* 2004; 32: 477.
- 42) Araújo M, Linder E, Lindhe J. Bio-Oss Collagen in the buccal gap at immediate implants: a 6-month study in the dog. *Clin Oral Impl Res* 2011; 22: 1-8.
- 43) Mellonig, J.T. Porous particulate hydroxyapatite in a human periodontal osseous defect: a case report. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry.* v.11, n.3, p.217-223, 1991.
- 44) Melnik V, *et al.* Síntese e caracterização de fosfato de cálcio nanoestruturado para aplicações na ortopedia e na traumatologia. COLAOB – The 6th Latin American Congress of Artificial Organs e Biomaterials.
- 45) Gilapa CL. Elaboração e caracterização de um material biocerâmico à matriz de fosfato de cálcio produzido a partir de pó biocerâmico reciclado. Dissertação de mestrado UDESC – Joinville, p. 96, 2001.
- 46) Camargo NHA, Delima SA, Souza JCP, Deaguiar JF, Gemelli E, Meier MM, Silva VE, Mittelstadt FG. Synthesis and Characterization of Nanostructured Ceramic Powders of Calcium Phosphate and Hydroxyapatite for Dental Applications”. *Key Engineering Materials.* 2009;396-98:619-22.
- 47) Hong Y, *et al.* Fabrication, biological effects, and medical applications of calcium phosphates nanoceramics. *Materials Science and Engineering R.* v.70, n.3-6, p.225-242, 2010.
- 48) Yamada S, *et al.* Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate ratios. *Biomaterials.* v.18, n.15, p.1037-1041, 1997.
- 49) Pereira FH, *et al.* Clarifying the effect of sintering conditions on the microstructure and mechanical properties of β -tricalcium phosphate. *Ceramics International.* v. 36, n.6, p. 1929-1935, 2010.
- 50) Ye X, *et al.* Ectopic Bone Regeneration by Human Bone Marrow Mononucleated Cells, Undifferentiated and Osteogenically Differentiated Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Beta-Tricalcium Phosphate Scaffolds. *Tissue Engineering: Part C: Methods.* v.18, n.7, p.545-556, 2012.

- 51) Daculsi G, *et al.* Macroporous calcium phosphate ceramic for long bone surgery in humans and dogs. Clinical and histological study. *Journal of Biomedical Materials Research*. v.24, n.3, p.379-396, 1990.
- 52) Webster TJ. Nanophase Ceramics as Improved Bone Tissue Engineering Materials *Am. Ceram. Soc. Bull.* 2003;82(6):23-28.
- 53) Camargo NHA, Gemelli E, Moraes AN, Costa BD, Oleskovics N, Dallabruda AL, *et al.* In vivo preliminary study on bone neoformation behavior of three types of calcium phosphate bioceramics. *Journal of Biosciences and Medicines*, 2014, 2, 36-42.
- 54) Stubbs D, Deakin M, Chapman-Sheath P, Bruce W, Debes J, Gillies RM, *et al.* In vivo evaluation of reabsorbable bone graft substitutes in a rabbit tibial defect model. *Biomaterials*. 2004;25: 5037-44.
- 55) Balçık C, Tokdemir T, Senköylü A, Koç N, Timuçin M, Akin S, *et al.* Early weight bearing of porous HA/TCP (60/40) ceramics in vivo: A longitudinal study in a segmental bone defect of rabbit. *Biomaterials*. 2007;3:985-96.
- 56) Kim, T.; *et al.* In situ formation of biphasic calcium phosphates and their biological performance in vivo. *Ceramics International*. v.38, n.3, p.1965-1974, 2012.
- 57) Dinipoulos H, Dimitriou R, Giannoudis PV. Bone Grafts substitutes: What are the options? Review. *The Surgeon J of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburg an Ireland*. 2012:1-10.
- 58) Abreu, MER. Hormônio do crescimento no processo de osseointegração de implantes de titânio - estudo experimental e revisão de literatura. 2011. 117f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- 59) Hu and Ma. Nano-Fibrous Scaffolds Capable of Growth Factor Delivery. *Pharm Res*. 2011;28:1273–81.
- 60) Calvo-Guirado JL, Mate-Sanchez J, Delgado-Ruiz R. Effects of growth hormone on initial bone formation around dental implants: a dog study. *Clinical Oral Implants Research*. 1-7, 2010

- 61) Gómez-Moreno G, Cutando A, Arana C, Worf CV, et al. The effects of growth hormone on the initial bone formation around implants. *The International Journal of Oral e Maxilofacial Implants*. V.24, n.6, 1068- 1073. 2009
- 62) Hossam Eldein AM, Elghamrawy SH, Osman SM, Elhak AR. Histological evaluation of the effect of using growth hormone around immediate dental implants in fresh extraction sockets: an experimental study. *Implant Dent* 2011; 20(1):47-55.
- 63) Weng D, et al. The effects of recombinant human growth/differentiation factor 5 (RhGDF-5) on bone regeneration around titanium dental implants in barrier membrane protected defects: a pilot study in the mandible of beagle dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009; 24(1): 31-7.
- 64) Valiati R, Paes JV, Moraes AN, Gava A, Agostini M, Masieiro AV, et al. Effect of Low-Level Laser Therapy on Incorporation Of Block Allografts. *Int J of Medical Sciences*. 2012;9:853-61.
- 65) Walsh WR *et al.* A resorbable porous ceramic composite bone graft substitute in a rabbit metaphyseal defect model. *J Orthop Res*. 2003;21:655–61.
- 66) Fulmer MT, Martin RI, Brown PW. Formation of calcium deficient hydroxyapatite at near-physiological temperature. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. v.3, n.4, p. 299-305, 1992.
- 67) Cho JS, Chung C, Rhee S. Bioactivity and Osteoconductivity of Biphasic Calcium Phosphates. *Bioceramics Development and Applications*. v.1, n.1, p.1-3, 2011.



Anexos

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMISSÃO CIENTÍFICA E DE ÉTICA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA PUCRS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 80/13 - CEUA

Porto Alegre, 29 de outubro de 2013.

Prezado Sr(a), Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 13/00342, intitulado "**Avaliação comparativa de substitutos ósseos e do PLGA/rhGH para enxertia em calvária de coelhos**".

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está **autorizada** a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Atenciosamente,


Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber
Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. Rogério Miranda Pagnoncelli
FO
Nesta Universidade



Campus Central
Av. Ipiranga, 6681 - P. 99 - Portal Tecnopuc - sala 1512
CEP: 90619-900 - Porto Alegre/RS
Fone: (51) 3353-6365
E-mail: ceua@pucrs.br

ANEXO B – TERMO DE COOPERAÇÃO ENTRE AS UNIVERSIDADES

TERMO DE COOPERAÇÃO DE PESQUISA CIENTÍFICA

Acordo nº 1

Cooperação de Pesquisa Científica entre a UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC E PONTIFÍCIO UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL - PUC/RS, visando à realização de projetos de pesquisa e difusão Científica na área de Biomateriais e da Saúde.

Em virtude da necessidade legal de regularizar direitos e deveres dos envolvidos nesta parceria, resolvem estas celebrar o presente acordo de pesquisa, mediante as cláusulas e condições seguintes:

CLAUSULA PRIMEIRA - DO OBJETO

O objeto do presente instrumento é execução de um projeto de pesquisa para realização de estudos in vivo em calvária de coelhos. O trabalho intitulado "*Avaliação Comparativa de substitutos ósseos e do PLGA/rhGH sobre o processo da formação óssea*". Esta proposta envolve os pesquisadores na estranda Fernanda Böing e Prof. Dr Rogério Miranda Pagnoncelli PUC/RS (Prof. orientador), Prof. Dr. Nelson Heriberto Almeida Camargo UDESC/Joinville-SC (Prof. colaborador), Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes UDESC/Lages-SC e Prof. Dr. Nilson Oleskovicz UDESC/Lages (Profs. Colaboradores).

Serão realizados experimentos-cirúrgicos na calvária de coelhos, com o objetivo de avaliar a capacidade de neoformação óssea de biomateriais a base de fosfatos de cálcio e PLGA + GHRh. O interesse se encontra em avaliar o comportamento da neoformação óssea destes biomateriais em diferentes tempos de aplicação in vivo.

Serão utilizados 24 animais, coelhos brancos da raça Nova Zelândia, espécie *Oryctolagus cuniculus*, da ordem Lagomorpha, gênero *Oryctolagus*, machos, adultos jovens, com idade média de 10 meses e peso médio de 4,0 a 5,0 kg. Serão criados quatro defeitos ósseos na calvária de cada coelho, com uma trefina 0,8mm, para simular um defeito crítico. Sendo que, cada um dos defeitos será preenchido por um tipo de biomaterial diferente, de acordo com o grupo a que os animais pertencem. Os animais serão alocados em 2 grupos ou mais,

buscando testar a eficácia das composições Hidroxiapatita/Fosfato de cálcio- β (60%HA/40%TCP- β), Hidroxiapatita/SiO₂n 5% em volume e PLGA + Ghrh a título comparativo entre as composições, visando avaliar o desempenho dos biomateriais sobre o processo da neoformação óssea. Aos 45 e 90 dias de pós-operatório os animais serão submetidos à eutanásia para realização das avaliações macroscópica e histológica (...) do material de biópsia recuperado das regiões de enchimento com biomaterial.

CLÁUSULA SEGUNDA - PRAZOS E VIGENCIAS

O experimento deverá ser implantado, conduzido e analisado com a participação dos professores da PUC/RS, UDESC/Joinville e UDESC/Lages, no período de Julho de 2013 a dezembro de 2014, podendo ser prorrogado de comum acordo entre as partes.

CLÁUSULA TERCEIRA - DAS RESPONSABILIDADES

O coordenador do Grupo de Biomateriais da UDESC/Joinville, Prof. Dr. Nelson Heriberto Almeida Camargo, fica responsável pelo fornecimento dos biomateriais: 60HA/40TCP- β e HA/SiO₂n 5%.

A mestranda Fernanda Böing e seu orientador Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli, ambos da PUC/RS ficam responsáveis pela obtenção do produto PLGA + Ghrh, que serão utilizados para realização dos estudos comparativo entre os biomateriais e coágulo. Ficam responsáveis também por:

- Execução dos experimentos in vivo e coleta de material para realização dos estudos de caracterização das biópsias.
- Manter os Professores da UDESC: Nelson Heriberto Almeida Camargo UDESC/Joinville Prof. Aury Nunes de Moraes UDESC/Lages e Nilson Oleskovicz UDESC/Lages, Prof. Rogério Miranda Pagnoncelli PUC/RS e a aluna Fernanda Boing PUC/RS sobre o andamento das pesquisas, através de relatórios parciais dos estudos in vivo.
- As Instituições, UDESC/Lages e PUC/RS e os pesquisadores deverão obedecer ao PROTOCOLO e agir sempre em conformidade com as leis, regras, regulamentos e demais normas governamentais que regem aos Estudos Clínicos.
- A PUC/RS e os pesquisadores não poderão utilizar ou dispor dos biomateriais 60HA/40TCP- β e HA/SiO₂n 5% para outra finalidade que não seja a especificada no PROTOCOLO.

- A UDESC/Joinville, UDESC/Lages e os pesquisadores não poderão utilizar ou dispor dos biomateriais PLGA + GHRh para outra finalidade que não seja a especificada no PROTOCOLO.

CLÁUSULA QUARTA – DA PUBLICAÇÃO

A PUC/RS e os pesquisadores concordam em não fornecer dados do estudo para terceiros, no que se refere ao biomaterial 60HA/40TCP-β e HA/SiO₂n 5%, sem prévia anuência do Prof. Nelson Heriberto Almeida Camargo UDESC/Joinville.

Comprometem-se em não utilizá-los em pesquisa comercialmente patrocinada ou acadêmicas internas e/ou externas, ou em publicações sem o consentimento prévio, por escrito, dos professores participantes.

Os resultados advindos do uso de 60HA/40TCP-β e HA/SiO₂n só poderão ser apresentados pelos pesquisadores, pela PUC/RS e pela UDESC em simpósios, encontros profissionais regionais, nacionais e/ou internacionais, publicados em jornais, capítulo de livros, periódicos, dissertações, mediante autorização pelos professores da UDESC e da PUC/RS, envolvidos na pesquisa.

O professor orientador e/ou a mestrandia da PUC/RS devem fornecer aos professores colaboradores da UDESC, cópia dos trabalhos a serem publicados por si, com uma antecedência mínima de 30 (trinta) dias de sua apresentação ou submissão a uma revista científica, sendo a recíproca também exigida.

Os professores da UDESC e a PUCRS, incuídos na pesquisa poderão, ainda, decidir pela não publicação dos resultados do estudo dependendo dos interesses de patente ou produto.

CLÁUSULA QUINTA - DA RESCISÃO

Consitui motivo para a rescisão deste Convênio de Cooperação de pesquisa científica a inadimplemento de quaisquer das Cláusulas aqui pactuadas.

PARÁGRAFO ÚNICO - O presente Convênio também poderá ser rescindido, de comum acordo entre as partes, mediante prévia notificação escrita, com antecedência mínima de 30 (trinta) dias.

CLÁUSULA SEXTA - VIGÊNCIA

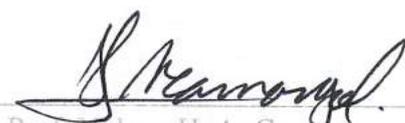
O prazo de vigência deste acordo de desenvolvimento de pesquisa científica entre PUC/RS-UDESC/SC é de 1(um) ano e será contado a partir da data de sua assinatura, com a possibilidade de prorrogação.

CLÁUSULA SETIMA - DO FORO

Fica eleito o Foro da cidade de Joinville-SC e/ou Porto Alegre para dirimir as dúvidas deste acordo de pesquisa científica, que não sejam resolvidas amigavelmente.

E, por estarem justas e acordadas as partes firmam o presente acordo de pesquisa científica em 03 (três) vias de igual teor e forma e para um só efeito.

Joinville-SC e Porto Alegre- RS, 21 de maio de 2013.



Prof. Nelson H. A. Camargo
UDESC-CCT/Joinville.



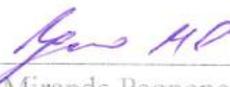
Prof. Aury Nunes de Moraes
UDESC-CAV/Lages



Prof. Nilson Oleskovicz-
UDESC-CAV/Lages- Diretor do
Hospital Veterinário



Fernanda Böing
Mestranda



Rogério Miranda Pagnoncelli PUC/RS-
Prof. Orientador