



**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS E  
MEDICINA**

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO  
DE BIOMATERIAL XENOGÉNICO EM  
DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO**

**LILIAN SOUZA CAMPOS**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**Trabalho orientado por:**

**Prof.<sup>a</sup> Doutora Fabiana Paim Rosa e Prof.<sup>a</sup> Doutora Gabriela Silva**

**2012**



**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS E  
MEDICINA**

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO  
DE BIOMATERIAL XENOGENICO EM  
DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO**

**LILIAN SOUZA CAMPOS**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**Trabalho orientado por:**

**Prof.<sup>a</sup> Doutora Fabiana Paim Rosa e Prof.<sup>a</sup> Doutora Gabriela Silva**

**2012**

# **ESTUDO DO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DE BIOMATERIAL XENOGÉNICO EM DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO**

## **DECLARAÇÃO DE AUTORIA DE TRABALHO**

Declaro ser autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Assinatura:



Copyright ©2012 Lilian Souza Campos

A Universidade do Algarve tem o direito perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio que seja conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus familiares e amigos, que me apoiaram durante esta caminhada, especialmente, ao meu querido esposo, Tadeu e à minha adorada filha, Sabrina, pelo amor, compreensão e incentivo, em todos os momentos de minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço às minhas orientadoras Prof<sup>a</sup> Doutora Fabiana Paim Rosa e Prof<sup>a</sup> Doutora Gabriela Silva.

Aos professores do Mestrado Integrado em Ciências Biomédicas da UALG.

À Sra. Conceição José, sempre atenciosa.

Aos amigos José Raul, Vera e Fabrício, pela ajuda na revisão e impressão deste trabalho.

Ao Dr. Aryon pela disponibilidade nos laboratórios do IPAC, como também, pela leitura das lâminas histológicas.

Ao médico veterinário Horestes responsável pelo biotério da UEFS.

Aos colegas do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais no ICS da UFBA, especialmente à Ana Emília e à Eliana, pelo auxílio e incentivo.

Ao Júnior, técnico do biotério, pela colaboração e dedicação no cuidado com os animais.

Às técnicas, Cristina e Elisângela, pela ajuda na confecção das lâminas histológicas.

Aos membros da Comissão de Ética da UEFS pela aprovação do projeto.

À FAPESB e à CNPq, agências financiadoras deste trabalho.

À Universidade Federal da Bahia.

E, acima de tudo, à Deus, sempre presente em meu ser.

## RESUMO

Dentre as várias opções de biomateriais para a regeneração óssea, os de origem xenogénica são considerados como uma das alternativas ao autoenxerto, devido às suas propriedades biológicas e físico-químicas, além da grande disponibilidade, e de seu uso contribuir com a diminuição da morbidade ao indivíduo. Vários autores consideram o BioOss<sup>®</sup>, uma hidroxiapatite bovina, como padrão de excelência entre os biomateriais de substituição óssea independentemente de sua forma ser macro ou microgranular, apesar do tamanho da partícula ser também um fator importante nas reações tissulares envolvidas na neoformação óssea. O presente estudo teve como objetivo verificar o comportamento biológico de BioOss<sup>®</sup> na forma microgranular, com partículas entre 0,25 a 1,00 mm e 0,4 a 0,6 mm, implantadas em defeito ósseo crítico nos grupos GB e GBS, respectivamente, e analisados comparativamente a um controlo negativo, GC, com defeito preenchido apenas por coágulo sanguíneo, avaliados nos pontos biológicos de 15 e 45 dias. Como resultados, no grupo GC, ocorreu neoformação óssea reacional restrita às bordas e presença de tecido fibroso na área do defeito. Nos grupos GB e GBS, observou-se mínima reação inflamatória, abundante angiogênese e alguma osteogênese, além das bordas, ao longo do defeito, em continuidade à dura-máter. Como conclusão, o BioOss<sup>®</sup> foi biocompatível, promoveu osteogênese por osteocondução e integrou-se parcialmente ao osso neoformado, com melhores resultados para o grupo GBS.

Palavras-chave: biomaterial; bioengenharia tecidual; defeito ósseo crítico; regeneração óssea; xenoenxerto;

## **ABSTRACT**

Among the various types of biomaterials in use for bone regeneration, those with xenogeneic origin have shown up as an alternative to autografts. Beyond the wide availability, its biological and physical-chemical properties, and its ability to reduce the morbidity of the individual, BioOss<sup>®</sup>, a bovine hydroxyapatite, has been considered the gold standard among biomaterials. In its macro, as well as, in its microgranular form, it is primarily used for bone replacements, although attention has to be paid to the fact that the particle size also is an important factor regarding tissue reactions, involved in bone formation. The present study aimed to verify the biological behavior of BioOss<sup>®</sup> in its microgranular form, with particles sizes ranging from 0.25 mm to 1.00 mm (GB group) and 0.4 mm to 0.6 mm (GBS group). The materials were implanted in critical bone defects in rat calvarias. The results were analyzed, by comparing them to a negative control group, GC (filled only with defective blood clot), at the biological time points of 15 and 45 days. In the control group (GC) reactive bone neoformation, restricted to the edges of the defect, as well as the presence of fibrous tissue in parts of the defect area was observed. The groups GB and GBS showed only a minimal inflammatory response. Abundant angiogenesis and in parts osteogenesis as well, were observed beyond the edges of the defect., These processes were detected especially in proximity to the dura mater. In conclusion, BioOss<sup>®</sup> is biocompatible, osteoconductive and promotes osteogenesis. Its particles also were integrated in the newly formed bone. In this study, the GBS group showed, regarding the point mentioned above, the best results.

**Keywords:** biomaterials, tissue bioengineering; critical bone defect, bone regeneration; xenograft;

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>µm</b>	Micrómetro
<b>Bm</b>	Biomaterial
<b>BMP</b>	Proteína Óssea Morfogenética
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>EDTA</b>	Ácido Etileno Diamina Tetra Acético
<b>FAPESB</b>	Fundação para o Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia
<b>Fc</b>	Fibras colagénicas
<b>GB</b>	Grupo BioOss <sup>®</sup>
<b>GBS</b>	Grupo BioOss <sup>®</sup> com partículas selecionadas
<b>GC</b>	Grupo Controle
<b>HA</b>	Hidroxiapatite
<b>HE</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>ICS</b>	Instituto de Ciências da Saúde
<b>LBTB</b>	Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetros
<b>Mo</b>	Matriz osteoide
<b>Neo</b>	Neoformação óssea
<b>Ob</b>	Osteoblasto
<b>Obj</b>	Objetiva
<b>Oc</b>	Osteocito
<b>PIFG</b>	Picrosírius Red Fast Green



<b>Rc</b>	Região cutânea
<b>Rdm</b>	Região da dura-máter
<b>Rpm</b>	Rotações por minuto
<b>Tcd</b>	Tecido conjuntivo denso
<b>Tcf</b>	Tecido conjuntivo fibroso
<b>Tcfx</b>	Tecido conjuntivo fibroso frouxo
<b>Tm</b>	Tecido mineralizado
<b>UALG</b>	Universidade do Algarve
<b>UEFS</b>	Universidade Estadual de Feira de Santana
<b>UFBA</b>	Universidade Federal da Bahia
<b>Vc</b>	Veia central
<b>Vs</b>	Vaso sanguíneo

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1** - Número de animais segundo grupo e ponto biológico

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.1** Representação esquemática da integração de um enxerto de hidroxiapatite bovina com o tecido ósseo; A) Tecido ósseo; B) Angiogênese e células osteoprogenitoras a permear o biomaterial; C) Estrutura porosa do enxerto de hidroxiapatita bovina - BioOss<sup>®</sup> 22
- Figura 2.1** Biomaterial: A) Apresentação do BioOss<sup>®</sup>; B) Grânulos do BioOss<sup>®</sup>; C) Conjunto de tamizes para seleção do tamanho das partículas do grupo GBS. 25
- Figura 2.2** Sequência cirúrgica após anestesia, tricotomia e assepsia. A) Espécime posicionado em decúbito ventral; B) Divulsão dos tecidos; C) Incisão do perióstio; D) Descolamento e remoção do Perióstio; E) Exposição da calvária; F) Instrumentação cirúrgica; G) Deslocamento do fragmento ósseo; H) Remoção do fragmento; I) Defeito ósseo crítico de 8,5mm de diâmetro; J) Inserção do biomaterial; K) Espécime suturado e identificado; L) Identificação e acomodação das caixas onde foram mantidos os animais deste estudo. 27
- Figura 2.3** Padronização dos espécimes e áreas de corte - (A) Vista dorsal do espécime com biomaterial preenchendo a região do defeito; área de corte; (B) Vista ventral do espécime; (C) Preparação dos espécimes para inclusão em resina e parafina 28
- Figura 2.4** Desenho esquemático de defeito crítico em calvária de rato (A) Linha de referência para o corte transversal dos espécimes; (B). Corte transversal da extensão linear e da área seccional (Adaptado de Rolim, 2010) 29
- Figura 3.1** Neoformação óssea (Neo) restrita às bordas ósseas, com formação de abundante tecido conjuntivo fibroso (Tcf) na região do defeito observado aos 15 dias de pós-operatório e que se mantém no ponto biológico de 45 dias – HE – Obj. 10x 31

<b>Figura 3.2</b>	Tecido fibroso ao longo do defeito - veia central (Vc) – HE – Obj. 4x	<b>31</b>
<b>Figura 3.3</b>	Defeito crítico preenchido com biomaterial (Bm) particulado de 0,25mm a 1,0mm – 15 dias – Borda direita – HE – Obj. 2,5x	<b>33</b>
<b>Figura 3.4</b>	Neoformação óssea (Neo) reacional na borda e defeito preenchido por partículas de biomaterial (Bm) de vários tamanhos já fragmentadas, encapsuladas por tecido conjuntivo fibroso (Tcf) com presença de vasos sanguíneos (Vs) – 15 dias – HE – Obj. 10x.	<b>33</b>
<b>Figura 3.5</b>	Interação entre a partícula de biomaterial e a matriz osteóide em formação – 15 dias – HE – Obj. 40x	<b>34</b>
<b>Figura 3.6</b>	Partícula de cerca de 1,0 mm a ocupar praticamente toda a espessura do defeito e outra de cerca de 0,25 mm, com muitas fissuras, encapsuladas por tecido fibroso – 15 dias – HE – Obj. 10x.	<b>34</b>
<b>Figura 3.7</b>	Concentração de pequenas partículas de biomaterial já reabsorvidas ou em processo de reabsorção a serem encapsuladas por fibras colagênicas – 45 dias – HE – Obj. 10x.	<b>35</b>
<b>Figura 3.8</b>	Poros e fragmentação da partícula do biomaterial, com osteoblastos a sintetizarem matriz osteóide - 45 dias - HE – Obj. 40x.	<b>35</b>
<b>Figura 3.9</b>	Partícula de biomaterial na borda totalmente integrada com a matriz osteóide e artefato de retração - 45 dias – PIFG – Obj. 40x	<b>36</b>

<b>Figura 3.10</b>	Degradação da partícula de biomaterial e síntese de matriz osteoide. Osteoblastos e osteócitos já aprisionados na matriz. Presença de vasos sanguíneos no estroma, com tecido conjuntivo denso de um lado e frouxo de outro – 45 dias -HE – Obj. 40x.	<b>36</b>
<b>Figura 3.11</b>	Osteogênese sobre a região da dura-máter (Rdm), com incorporação de partículas e formação de vasos (Vs) – 45 dias – HE – Obj. 10x	<b>37</b>
<b>Figura 3.12</b>	Partícula de biomaterial integrada com a matriz osteoide com osteócitos e vasos sanguíneos – 45 dias – HE – Obj. 40x	<b>37</b>
<b>Figura 3.13</b>	Defeito preenchido por partículas com pouca variação de tamanho, neoformação óssea reacional na borda – 15 dias – PIFG – Obj. 2,5x	<b>39</b>
<b>Figura 3.14</b>	Neoformação óssea reacional na borda – Partículas encapsuladas por tecido fibroso, com formação de matriz osteoide e vasos – PIFG – 15 dias – Obj. 10x	<b>39</b>
<b>Figura 3.15</b>	Partículas de biomaterial envolto por matriz osteoide, fibras colagênicas e vasos – HE – 15 dias – Obj. 40x	<b>40</b>
<b>Figura 3.16</b>	Partícula encapsulada por tecido fibroso, com formação de matriz osteoide e vasos – PIFG – 15 dias – Obj. 40x	<b>40</b>
<b>Figura 3.17</b>	Partículas de biomaterial encapsuladas por tecido fibroso, matriz osteoide e vasos – PIFG – 15 dias – Obj 40x	<b>41</b>
<b>Figura 3.18</b>	Partículas de biomaterial com espículas agudas, encapsuladas por tecido fibroso – 15 dias - HE – Obj. 10x	<b>41</b>

<b>Figura 3.19</b>	Partículas encapsuladas por tecido fibroso, com grande formação de fibras colagênicas e vasos – PIFG – 15 dias – Obj. 10x.	<b>42</b>
<b>Figura 3.20</b>	Biomaterial, vasos e fibras colagênicas orientadas de forma a encapsular a partícula já fragmentada próximo à borda com neoformação óssea reacional – 15 dias – PIFG – Obj. 40x	<b>42</b>
<b>Figura 3.21</b>	Neoformação óssea partindo da borda em direção ao centro guiada por partículas de biomaterial com arestas arredondadas - 45 dias – HE – Obj.10x	<b>43</b>
<b>Figura 3.22</b>	Partículas osseointegradas por um lado e encapsuladas por fibras colagênicas por outro - 45 dias - HE – Obj. 10x	<b>43</b>
<b>Figura 3.23</b>	Partículas osseointegradas na matriz osteoide com osteócitos incorporados, osteoblastos, fibras colagênicas e vasos sanguíneos - 45 dias - HE – Obj. 40x	<b>44</b>
<b>Figura 3.24</b>	Partícula fragmentada, com arestas arredondadas pela ação biológica – 45 dias – PIFG – Obj. 40x	<b>44</b>
<b>Figura 3. 25</b>	Partículas de biomaterial arredondadas incorporadas à matriz osteoide - PIFG – Obj. 40x	<b>45</b>
<b>Figura 3.26</b>	Matriz osteoide próxima a partícula em desintegração – 45 dias – HE – 40x	<b>45</b>
<b>Figura 3.27</b>	Neoformação óssea no centro do defeito com as partículas integradas – 45 dias – PIFG – 40x	<b>46</b>
<b>Figura 3.28</b>	Neoformação óssea no centro do defeito, próxima à dura-máter, guiada por partículas integradas – 45 dias – PIFG – Obj. 40x	<b>46</b>

## ÍNDICE

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>23</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>AMOSTRA.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2</b>	<b>BIOMATERIAL.....</b>	<b>24</b>
<b>2.3</b>	<b>TÉCNICA CIRÚRGICA.....</b>	<b>25</b>
<b>2.4</b>	<b>PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....</b>	<b>28</b>
<b>2.5</b>	<b>ANÁLISE HISTOLÓGICA.....</b>	<b>29</b>
<b>2.6</b>	<b>FONTES DE FOMENTO.....</b>	<b>29</b>
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1</b>	<b>GRUPO GC.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2</b>	<b>GRUPO GB.....</b>	<b>32</b>
<b>3.3</b>	<b>GRUPO GBS.....</b>	<b>38</b>
<b>4.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>51</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>
	<b>ANEXO.....</b>	<b>56</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O osso é constituído por um tecido conjuntivo especializado, com características particulares, que conferem-lhe resistência e plasticidade para que possa exercer suas funções, além de ser um grande reservatório de minerais [1, 2].

Quando traumatizado, em pequenas dimensões e sob condições estáveis, se regenera, devido à capacidade osteogênica de células locais e de outras trazidas pela circulação, desde que haja amplo suprimento sanguíneo. Nesse processo, células osteogénicas residentes e células osteoprogenitoras trazidas pela circulação sanguínea, após diferenciação, produzem matriz extracelular que será mineralizada e sofrerá remodelação e adaptação funcional. Por outro lado, se a lesão for grande, com fragmentos instáveis ou se o indivíduo possuir deficiências metabólicas locais ou sistêmicas, o reparo pode não ocorrer espontaneamente, muitas vezes com a ocorrência de formação de um tecido conjuntivo fibroso, que perpetua ao longo de sua vida, o que caracteriza um defeito ósseo crítico [1, 2, 3].

A partir do conceito de defeito crítico, torna-se possível sua reprodução em modelos de investigação animal, para avaliar o real potencial osteogênico de um material implantado, como estimulador de reparação tecidual ou substituto ósseo, em função da sua capacidade em induzir ou promover maior osteogênese em relação a um grupo controle. O padrão e o tempo de reparo variam de acordo com a espécie do animal utilizado e de acordo com a região anatômica deste defeito, assim, podem existir diferentes tamanhos e localizações anatômicas para o defeito ser considerado crítico. Em calvária, o menor diâmetro de defeito de dimensão crítica é no rato, com cerca de 8 mm, enquanto no cão é de 20 mm, no macaco é de 25mm e no coelho é de 15mm [4, 5].

Assim, o defeito crítico em calvária de rato, com dimensões de 8,5 mm de diâmetro, simula deficiências advindas de diversas etiologias como traumas e remoção de lesões císticas ou de tumores, que podem estar associadas não apenas às dimensões do defeito, mas também, às características relacionadas ao metabolismo da região, vascularização deficiente, instabilidade de fragmentos ou problemas sistêmicos do indivíduo. Ao implantarmos materiais nestes defeitos,



objetivamos avaliar a eficácia terapêutica e as consequências fisiopatológicas decorrentes dos procedimentos de regeneração tecidual, com o objetivo de contribuir com o desenvolvimento de novas técnicas e de novos materiais de enxerto ósseo [4, 5, 6, 7, 8].

Os enxertos ósseos podem ser classificados quanto à sua fonte em autoenxerto, homoenxerto, xenoenxerto e enxerto aloplástico. O autoenxerto é oriundo do próprio indivíduo e descrito como padrão-ouro com relação ao reparo obtido, porém tem como desvantagens a elevada morbidade pela necessidade de uma cirurgia para remoção do enxerto, com frequente limitação da quantidade óssea disponível, com aumento do risco de infecção. O homoenxerto é obtido de outro indivíduo, da mesma espécie e o xenoenxerto tem como fonte animais de espécies diferentes, enquanto o enxerto aloplástico é de origem sintética. Quando processados em laboratório antes de serem utilizados em organismos vivos, com propósitos biológicos tanto de substituição como auxiliares de reparo tecidual ou de órgãos, estes materiais passam a ser considerados biomateriais [9, 10, 11, 12].

O conceito de biomaterial, segundo Boretos e Eden (1984), refere-se à qualquer nova substância desenvolvida, exceto drogas medicamentosas, ou à elaboração de uma combinação estável de substâncias, com origem sintética ou natural, que deve poder ser usada sobre ou em parte de um sistema orgânico, o qual se trata ou se repara cirurgicamente [13].

Assim, um biomaterial para enxerto ósseo se configura num produto que pode substituir ou até mesmo beneficiar o ganho e reequilíbrio da função do tecido ósseo, e pode ser apresentado em diferentes formas, particulado ou em bloco, denso ou poroso, isolado ou na forma de compósito, a terem cada um vantagens e desvantagens quando comparados ao enxerto ósseo autógeno, mas nenhum, até o momento, com o mesmo potencial osteogênico, o que motiva a busca por um substituo ósseo ideal [14, 15, 16].

Muitas investigações têm sido realizadas e com o avanço da ciência dos biomateriais e do cultivo de células surgiu a Bioengenharia Tecidual, que concentra-se na resolução de problemas relacionados a regeneração de tecidos

naturais e órgãos, e tem estimulado o aprimoramento de procedimentos, como o isolamento, a purificação e a aplicação de diferentes materiais para esta finalidade, com resultados promissores em terapias para restabelecer a função e estética perdidas. Neste momento, encontra-se frente ao desafio de mimetizar tecidos, com características físico-químicas ideais, para serem carreados com células, proteínas adsorvidas ou medicamentos, com o propósito da otimização da regeneração tecidual [17,18, 19, 20].

Biocompatibilidade e biofuncionalidade são as principais características necessárias para que esses biomateriais exerçam suas funções. A biocompatibilidade é a aceitação do biomaterial pelo organismo enquanto a biofuncionalidade representa sua habilidade em desempenhar a função desejada. Seus aspectos críticos são dependentes, entre outros fatores, das propriedades da superfície e do volume básico da estrutura do biomaterial [21, 22, 23].

Bioatividade e osseointegração são também requisitos importantes e estão relacionados com a capacidade do biomaterial formar uma forte ligação com os tecidos, com consequente aumento da atividade celular e maior auxílio em sua neoformação [24, 25].

Quando aplicados *in vivo*, os biomateriais podem promover osteogênese por meio de três mecanismos: osteocondução, osteopromoção e osteoindução. Na osteocondução o biomaterial serve como arcabouço e propicia a migração, a adesão, a inserção e a proliferação celular. Na osteopromoção há estimulação das células osteogênicas do leito receptor ou do próprio enxerto ósseo no sentido de promoverem a síntese de matriz osteoide, com consequente mineralização. Na osteoindução, o biomaterial incita células mesenquimais indiferenciadas a diferenciarem-se em células osteoprogenitoras e formar osso, inclusive em sítios ectópicos [26, 27].

Os biomateriais para enxerto ósseo devem servir tanto como arcabouço para a aderência de células osteoprogenitoras como fonte de cálcio e fósforo para a mineralização da matriz óssea. São apresentados sob diversas formas, como pasta, pó, partículas ou blocos, densos ou porosos, de tamanho e porosidade

diferentes. Todos os aspectos básicos da manufatura, acabamento, esterilização, embalagem, transporte, entrega, além da inserção cirúrgica e cuidados pré e pós-operatórios, devem ser adequadamente controlados, a fim de manter as capacidades biomecânicas do material com integração no sítio receptor, para obtenção de resultados satisfatório [28, 29, 30].

Biocompatibilidade, disponibilidade, ser osteogénico, osteoindutor, osteocondutor, além de garantir suporte mecânico ao novo osso pelo período de tempo necessário, suficiente para manutenção da estrutura tridimensional desejada enquanto é substituído por osso neoformado, não apresentar potencial carcinogénico, genotoxicidade e toxicidade local ou sistêmica, são características desejáveis aos biomateriais para regeneração óssea e para isso diferentes combinações de materiais têm sido desenvolvidas, de origem animal ou sintética, reabsorvíveis ou não reabsorvíveis, que continuam sendo testadas até que o substituto ósseo ideal seja desenvolvido [30, 31, 32].

A semelhança estrutural da hidroxiapatite bovina com a hidroxiapatite humana é uma das vantagens dos biomateriais de origem animal. Além disso, fornecem alto conteúdo de cálcio e fósforo, essenciais na neoformação óssea e podem ainda ser associadas a fatores de crescimento e a cultura de células com o intuito de melhorar a resposta no local implantado, o que os torna substitutos do osso humano [14, 15].

Estudos *in vivo* e clínicos baseados em análises histomorfométricas demonstraram melhor performance de xenoenxertos em relação aos materiais aloplásticos, possivelmente em função das propriedades inerentes da apatite natural e, ainda, da arquitetura porosa naturalmente desenhada. Estudos recentes têm avaliado a associação de xenoenxertos a fatores de crescimento e células osteoprogenitoras, com o intuito de aproximar a sua resposta tecidual à dos enxertos autógenos, com bons resultados [33, 34].

Ao analisarmos a porosidade do material, percebemos que trata-se de uma característica muito importante. Apesar de isoladamente a presença de poros diminuir a resistência mecânica do material, quando em um sistema biológico, a

existência de poros com dimensões adequadas, favorece o crescimento de tecido, que propicia um forte entrelaçamento com o enxerto com conseqüente aumento de sua resistência, além de favorecer a angiogênese, que consiste na formação de novos vasos, que irão nutrir o tecido em regeneração e permitirá a chegada de células osteoprogenitoras para o sítio necessário [32, 33].

A morfologia e o tamanho de cada poro, da ordem de 100 micrômetros, além de sua interconectividade, tanto intragranular como intergranular, também influenciam nas respostas tissulares. Se os poros forem muito pequenos, não forem interligados ou micromovimentações ocorrerem em sua interface, a irrigação sanguínea pode ser prejudicada, com ocorrência de inflamação, morte dos tecidos e perda da estabilidade do enxerto [34, 35, 36].

Inúmeros trabalhos descritos na literatura têm demonstrado que a matriz mineral do osso bovino, é formada basicamente por hidroxiapatite similar à do tecido ósseo humano, com estrutura porosa, capaz de cumprir papel osteogênico, com a vantagem de sua grande disponibilidade e de possuir boa resistência biomecânica. Entre os substitutos ósseos de origem bovina existentes no mercado, encontram-se, em diversas apresentações, o osso desmineralizado, o osso mineralizado, o osso composto e a proteína óssea morfogenética, cada um com uma indicação específica, a serem utilizados sozinhos ou combinados com outros biomateriais ou mesmo com o osso autógeno, a ter-se em consideração o respeito aos limites biológicos que o material apresenta [37, 38, 39, 40].

Apesar de muito utilizado em procedimentos de aumento de altura e volume ósseo em cirurgias de levantamento de seio maxilar para futura reabilitação com implantes dentários, os enxertos xenogênicos têm como desvantagem uma baixa resistência às forças mecânicas. Assim, não é possível sua fixação com parafusos, nem a submissão de carga imediata, necessitando-se de um período relativamente longo para que a neoformação óssea ocorra, em geral de 6 a 9 meses, a depender da extensão do enxerto, com um índice maior de perda quando comparado a situações de suficiente quantidade e qualidade óssea originais, o que limita sua utilização [32].

A estrutura mineral óssea bovina desproteïnizada para aplicações como enxerto ósseo é obtida por meio de processo termoquímico, com remoção completa de proteínas, restos celulares e lipídios, com eliminação de risco imunológico e de contaminação bacteriológica, inclusive com a desativação da proteína Príon, responsável pela encefalopatia espongiforme bovina [17, 18].

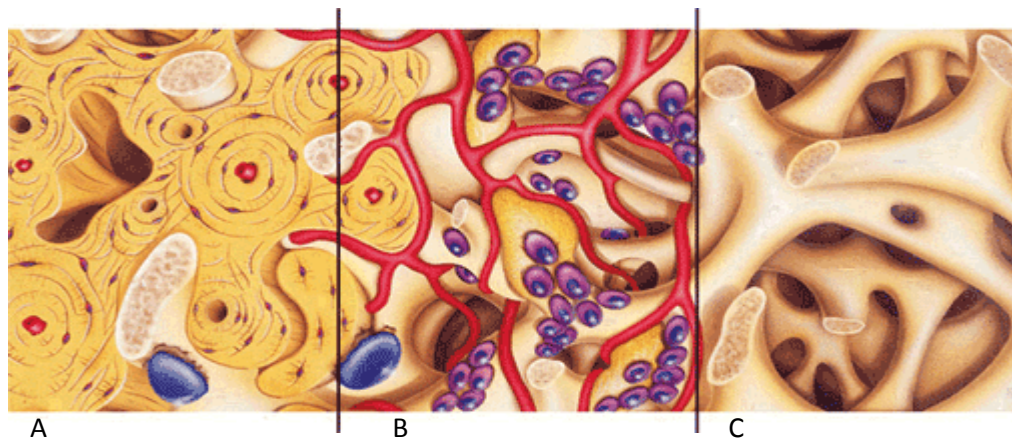
O caráter térmico do processo de obtenção do biomaterial é um dos fatores que define sua capacidade em ser reabsorvido, ou seja, quanto maior a temperatura utilizada no processo, maior o seu grau de cristalinidade e consequentemente maior sua resistência a ação de degradação pelo organismo, seja por dissolução ou desintegração, para possibilitar ser fagocitado [34, 35].

O BioOss<sup>®</sup> é produzido por Geistlich Biomaterials e consiste de uma matriz óssea mineral obtida após a remoção de componentes orgânicos de osso medular bovino. Possui estrutura química e física comparável à matriz mineral do osso humano, com arquitetura constituída de 70 a 75% de porosidade, com poros biologicamente desenhados, de tamanho variáveis, que favorecem a invasão celular e vascular até o centro do defeito, e é distribuído na forma de bloco ou como grânulos de 0,25 a 1mm e de 1 a 2mm de diâmetro [26, 27, 28].

O elevado padrão de segurança do Geistlich Bio-Oss<sup>®</sup>, segundo o fabricante, baseia-se nos seguintes aspectos de fabricação:

- Origem definida do material bruto e processamento controlado;
- O país de origem é a Austrália, um dos países mais seguros quanto a um potencial risco de BSE;
- Matadouros selecionados e certificados cumprem as diretrizes exigentes das autoridades veterinárias australianas;
- Testes de saúde: Processamento do material bruto só após teste de saúde pré e pós-morte de cada animal individual;
- Seleção do osso: Uso exclusivo de ossos das extremidades que, segundo as diretivas da União Europeia, são classificados como “tecido isento de priões” e, portanto, seguro;

- Métodos de inativação efetivos: Este processo cientificamente comprovado inclui um tratamento de 15 horas a altas temperaturas e uma limpeza com soluções fortemente alcalinas. É obtido um mineral ósseo altamente purificado;
- Esterilização: Após a embalagem do Geistlich BioOss<sup>®</sup> realiza-se a esterilização com raios gama. Geistlich BioOss<sup>®</sup> é embalado numa embalagem estéril dupla;
- Controles oficiais: Os certificados de autoridades internacionais confirmam que a fabricação do Geistlich BioOss<sup>®</sup> atende aos requisitos de segurança mais elevados.



**Figura 1.1: Representação esquemática da integração de um enxerto de hidroxiapatite bovina com o tecido ósseo. A) Tecido ósseo; B) Angiogênese e células osteoprogenitoras a permear o biomaterial ; C) Estrutura porosa do enxerto de hidroxiapatita bovina - BioOss<sup>®</sup>.**

As controvérsias científicas sobre qual o tamanho do grânulo de hidroxiapatite seria ideal para a diferenciação e proliferação de células osteoprogenitoras são muitas. Enquanto alguns estudos citam que partículas menores são mais osteogênicas, outros afirmam que não, por deflagrarem maior resposta inflamatória, e ainda, que partículas maiores estabilizam melhor o enxerto enquanto a regeneração óssea ocorre [19].

O tamanho das partículas do biomaterial relaciona-se diretamente com a velocidade de reabsorção e a conseqüente substituição pelo tecido do hospedeiro

[19, 20, 21]. Embora estudos comparativos entre as duas formas granulares comercializadas do BioOss<sup>®</sup> não tenham resultado diferenças significativas, a influência do tamanho de suas partículas na osteogênese continua a ser discutida e a busca por uma faixa ótima é também uma preocupação da bioengenharia tecidual, que visa a regeneração de forma a restabelecer a anatomia, morfologia, fisiologia, biomecânica e estética do indivíduo, com previsibilidade de sucesso por um longo período de tempo.

## **1.1 OBJETIVO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar histologicamente o comportamento biológico de uma Hidroxiapatite Bovina, o BioOss<sup>®</sup>, na forma de grânulos, em dois intervalos diferentes, 0,4 a 0,6 mm e 0,25 a 1,0 mm, implantados em defeitos ósseos críticos em calvária de rato, com o uso de microscopia de luz comum.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 AMOSTRA**

Os procedimentos cirúrgicos deste estudo foram executados no Biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS, Bahia, Brasil, após aprovação pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) desta Instituição e de acordo com as Normas Éticas de Pesquisas em Animais e as Normas Nacionais de Biossegurança, conforme ofício 07/2012 em anexo.

A amostra foi composta por 30 ratos *Rattus Norvegicus* da linhagem *Wistar albinus*, jovens adultos, machos, com massa corpórea entre 350 e 400 gr, de 3 a 4 meses de idade. Esta amostra foi distribuída em três grupos, avaliados em dois pontos biológicos, aos 15 dias e 45 dias pós-operatório.

- Grupo GC: controle negativo com defeito preenchido apenas por coágulo sanguíneo.
- Grupo GB: defeito preenchido com grânulos de Hidroxiapatite Bovina - BioOss<sup>®</sup> com partículas de 0,25 a 1,0 mm.
- Grupo GBS: defeito preenchido com grânulos de Hidroxiapatite Bovina - BioOss<sup>®</sup> com partículas de 0,4 a 0,6 mm.

**Tabela 1. Número de animais de acordo com o grupo e ponto biológico**

Grupo \ Ponto Biológico	GC	GB	GBS	Total
<b>15 dias</b>	5	5	5	<b>15</b>
<b>45 dias</b>	5	5	5	<b>15</b>
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>30</b>

## **2.2 BIOMATERIAL**

O BioOss<sup>®</sup>, hidroxiapatite bovina, foi adquirido no tamanho de partícula de 0,25 a 1,0 mm. Uma parte foi utilizada como originalmente comercializada e outra parte foi tamisada, por meio de seleção com tamiz manual em condições ideais, para o tamanho de partícula compreendido entre 0,4 e 0,6 mm de diâmetro e esterilizados em autoclave a 121°C com 1 atmosfera de pressão, durante 30 minutos (este procedimento não é recomendado pelo fabricante para uso clínico).





**Figura 2.1: Biomaterial; A) Apresentação do BioOss®; B) Grânulos do BioOss®; C) Conjunto de tamizes para seleção do tamanho das partículas do grupo GBS.**

### **2.3 TÉCNICA CIRÚRGICA**

Durante todo o tempo do estudo, os animais foram mantidos em caixas plásticas autoclavadas, identificadas com o grupo e o ponto biológico, forradas com maravalha de Pinus autoclavada, trocada diariamente. Na ficha de identificação dos animais ainda constava a data da cirurgia, o peso do animal, a data do sacrifício e o nome do investigador responsável. Os animais foram alimentados com ração sólida e água à vontade, mantidos em regime de luminosidade de claro e escuro de 12 horas com temperatura adequada.

Anteriormente aos procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados e sedados por injeção intramuscular de cloridrato de ketamina na proporção de 0,08 mL por 100 mg de peso e cloridrato de xilazina na proporção de 0,04 mL por 100 mg de peso. Na sequência, os animais foram tricotomizados na região da calvária e efetuada assepsia do campo operatório com solução de iodo.

Os animais foram posicionados em decúbito ventral e o acesso à calvária efetuado por meio de uma incisão cutânea bicoronal, semilunar, com extensão aproximada de 3 cm, com lâmina de bisturi nº 15. Divulsionou-se os tecidos com tesoura curva de ponta romba e elevou-se o retalho, com pinças mosquito. O perióstio foi incisado com lâmina de bisturi nº 15 e todo removido com o auxílio

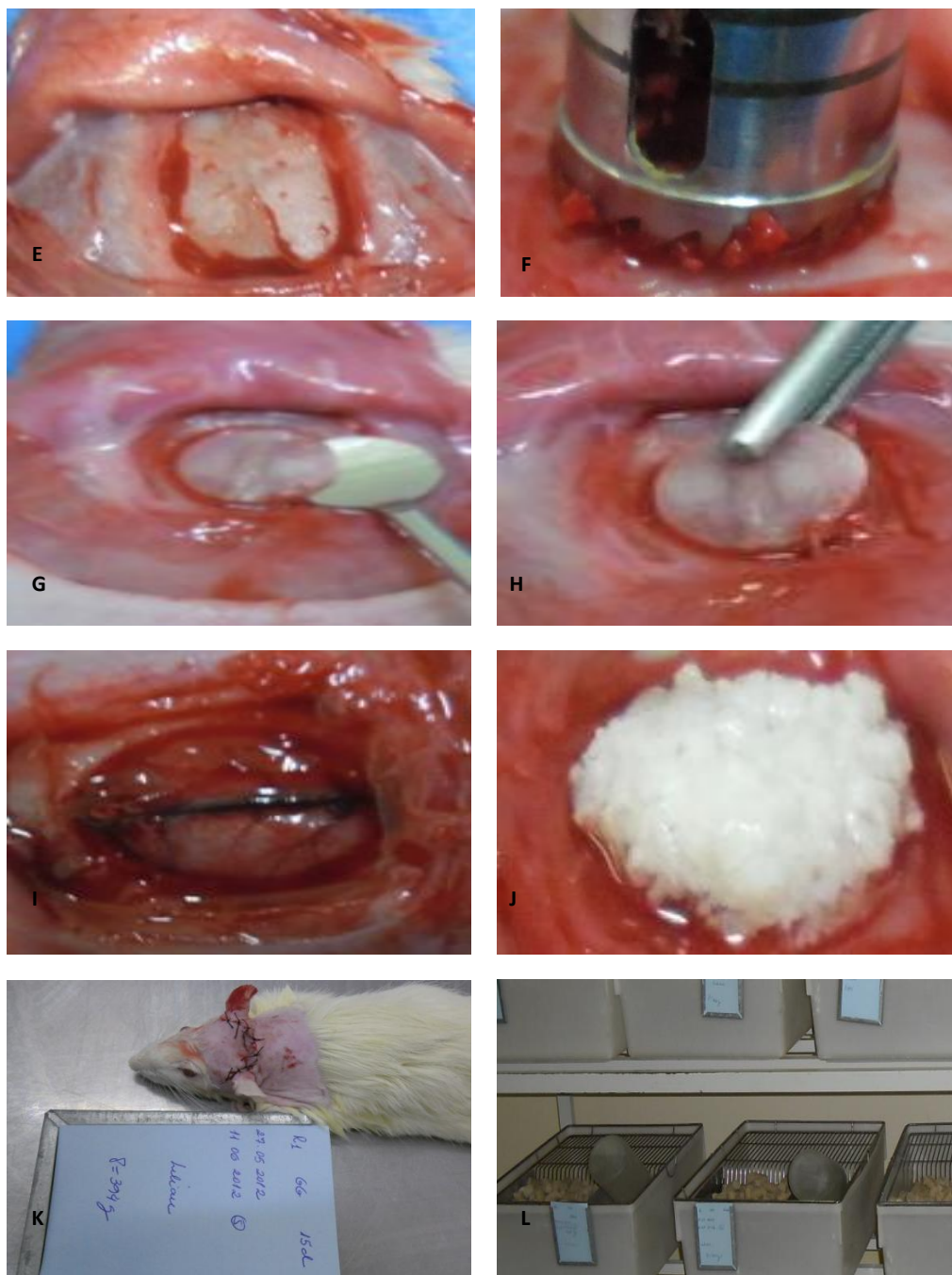
de curetas Molt na região da execução do defeito, com limite de segurança ao redor do defeito.

O defeito ósseo crítico na porção mediana da calvária foi efetuado entre os vértices da sutura anterior e posterior, com a utilização de uma fresa tipo trefina com 8 mm de diâmetro interno em contra ângulo cirúrgico com redução de 16:1 acoplado em motor elétrico com rotação de 1.500 rpm (rotações por minuto), com torque de 55 N/cm (Newtons por centímetro quadrado), sob constante irrigação com solução fisiológica estéril. Após a transfixação da calvária, o fragmento foi removido, juntamente com a dura-máter com o auxílio de cureta multi e pinça mosquito. Irrigou-se abundantemente o defeito para remoção de espículas ósseas e foram implantados os biomateriais nos grupos GB e GBS. O grupo GC foi mantido somente com o coágulo sanguíneo formado após a confecção do defeito.

Por fim, o retalho foi reposicionado e a incisão suturada com pontos simples, com fio de seda montado em agulha 4.0 de secção triangular.

Após os pontos biológicos de 15 e 45 dias pós-operatórios, os animais foram mortos com dose letal de anestésicos e toda a porção superior da calvária foi removida em bloco para processamento histológico.



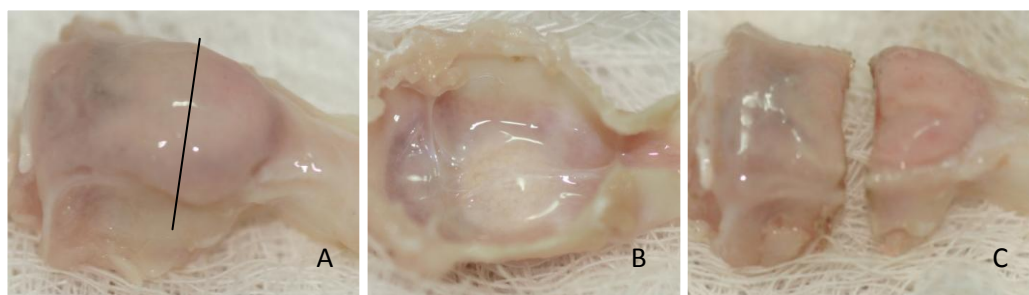


**Figura 2.2:** Sequência cirúrgica após anestesia, tricotomia e assepsia. A) Espécime posicionado em decúbito ventral; B) Divulsão dos tecidos; C) Incisão do periósteo; D) Descolamento e remoção do Periósteo; E) Exposição da calvária; F) Instrumentação cirúrgica; G) Deslocamento do fragmento ósseo; H) Remoção do fragmento; I) Defeito ósseo crítico de 8,5mm de diâmetro; J) Inserção do biomaterial; K) Espécime suturado e identificado; L) Identificação e acomodação das caixas onde foram mantidos os animais deste estudo.

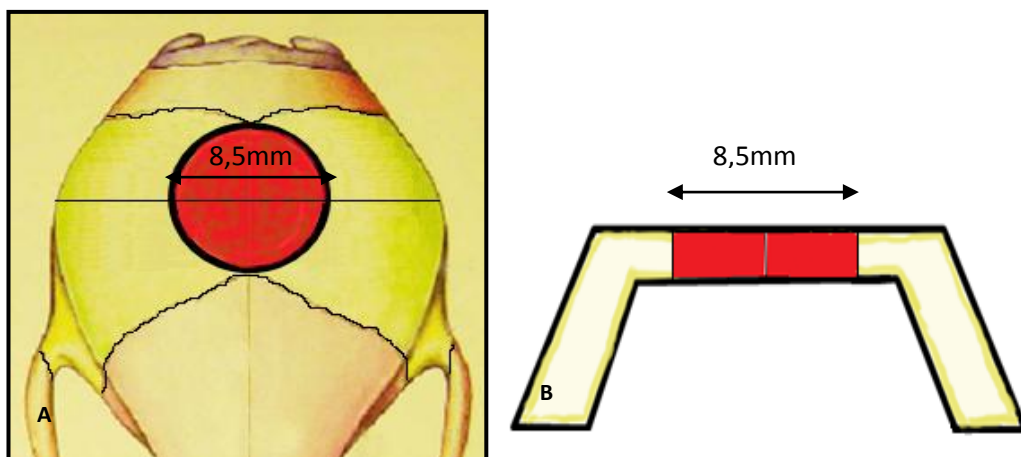
## 2.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

O processamento histológico dos espécimes obtidos foi realizado no Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia - UFBA, Salvador, Bahia, Brasil.

Após a remoção de tecidos moles, as calvarias foram fixadas em Formol tamponado a 4%, durante 3 dias e divididas em duas metades com discos diamantados de granulação fina, em motor elétrico de modo que fossem obtidas amostras de dimensões de 5 mm de altura, 15 mm de largura e 15 mm de comprimento, com a região do defeito no maior diâmetro, entre 7,5 a 8,5 mm de extensão. A porção anterior foi descalcificada em solução de ácido etileno diamina tetra-acético (EDTA) a 5% para inclusão em parafina e a porção posterior foi incluída em resina e reservada a estudos futuros. A seguir, as amostras descalcificadas foram incluídas em parafina, os blocos planificados e cortes seriados foram realizados em micrótomo com 4 micrômetros de espessura, corados em Hematoxilina-eosina e Picrossírius-vermelho, para evidenciar células ósseas, células inflamatórias, fibras colagênicas e a deposição de matriz osteoide. Os cortes histológicos foram analisados em microscópio de luz comum.



**Figura 2.3: Padronização dos espécimes e áreas de corte - (A) Vista dorsal do espécime com biomaterial preenchendo a região do defeito; área de corte; (B) Vista ventral do espécime; (C) Preparação dos espécimes para inclusão em resina e parafina.**



**Figura 2.4:** Desenho esquemático de defeito crítico em calvária de rato (A) Linha de referência para o corte transversal dos espécimes; (B). Corte transversal da extensão linear e da área seccional (3). (Adaptado de Rolim, 2010) [4].

## 2.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Foi realizada análise histológica no Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia – LBTB/ICS/UFBA. Como parâmetros histológicos foram observados: infiltrado inflamatório, vascularização, tecido conjuntivo fibroso, atividade osteoblástica e neoformação óssea.

## 2.6 FONTE DE FOMENTOS

Os recursos necessários para a realização deste trabalho foram suportados pela investigadora, pelo Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia – LBTB/ICS/UFBA, pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB.

### **3 RESULTADOS**

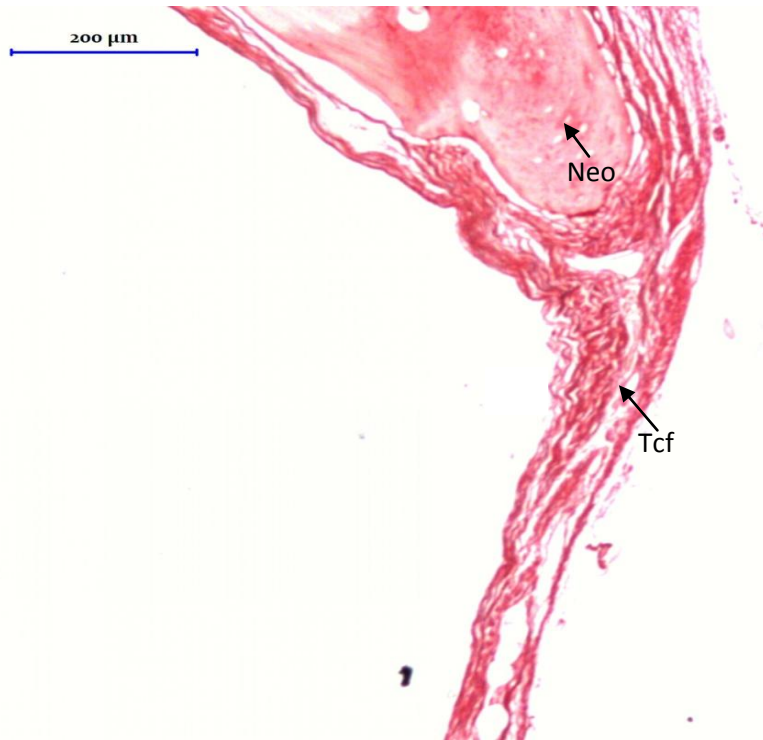
Neste estudo foram observados diferentes tamanhos de partículas de osso bovino inorgânico morfológicamente irregulares implantados em defeito crítico em calvária de ratos, por método visual, com o uso de microscópio óptico de luz comum, por avaliação de aspectos morfológicos do reparo ósseo, evolução do fechamento do defeito e presença ou não do biomaterial, por comparação destes eventos entre os 3 (três) grupos experimentais, em cada ponto biológico.

#### **3.1. GRUPO GC – CONTROLE**

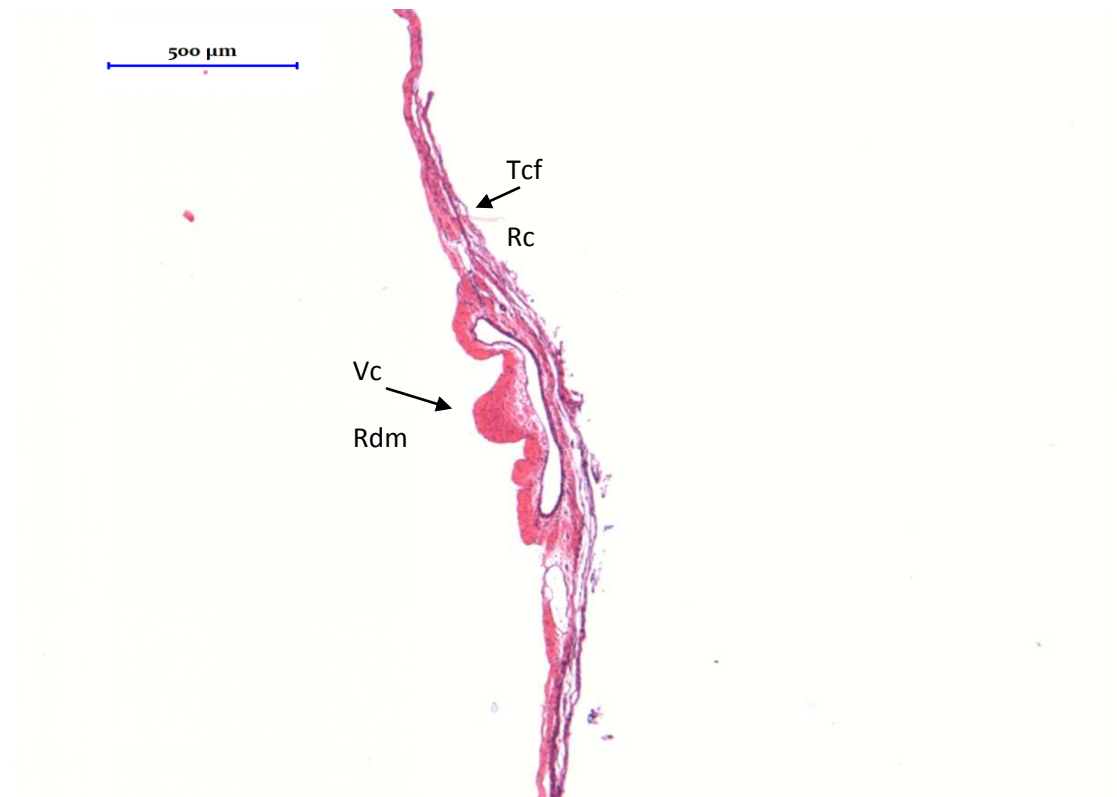
No grupo GC, aos 15 dias observou-se neoformação óssea reparativa restrita às bordas do defeito, com a presença de osteoblastos ativos. Aos 45 dias, esta neoformação permaneceu restrita às bordas, porém em maior extensão, com presença de osteoblastos e osteócitos. Nas demais regiões não são observados núcleos de mineralização.

Na região central do defeito, aos 15 dias, houve a formação de tecido conjuntivo frouxo com capilares sanguíneos e proliferação de células fusiformes, especialmente na região voltada para a dura máter. Aos 45 dias, essa região apresentava-se preenchida por tecido conjuntivo denso, de espessura menor que a espessura das margens ósseas e menor formação vascular, com predomínio nas proximidades das bordas ósseas. O tecido conjuntivo formado preencheu toda a extensão do defeito e manteve espessura delgada, bem aquém da espessura do osso remanescente nas bordas do defeito.

Em ambos os pontos biológicos de 15 e 45 dias observou-se a presença de um infiltrado inflamatório mononuclear difuso, porém com redução progressiva ao longo do tempo.



**Figura 3.1:** Neoformação óssea (Neo) restrita às bordas ósseas, com formação de abundante tecido conjuntivo fibroso (Tcf) na região do defeito observado aos 15 dias de pós-operatório e que se mantém no ponto biológico de 45 dias – HE – Obj. 10x



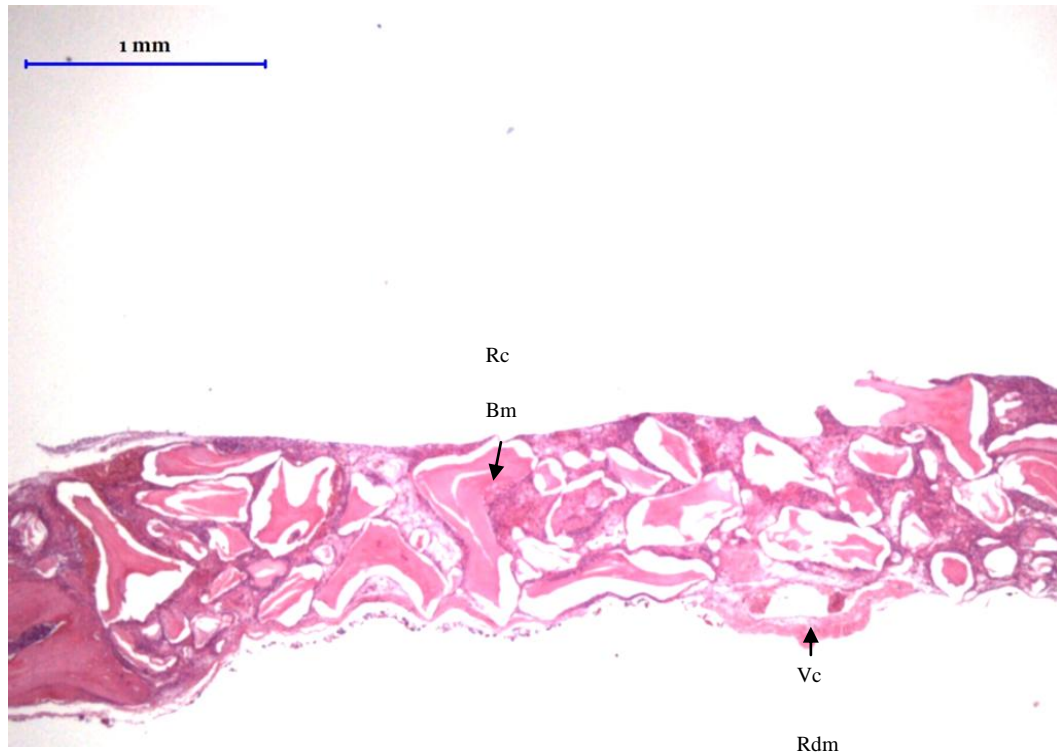
**Figura 3.2 :** Tecido conjuntivo fibroso ao longo do defeito - veia central (Vc) – HE – Obj. 4x

### **3.2 GRUPO GB – PARTÍCULAS DE 0,25 A 1,0mm**

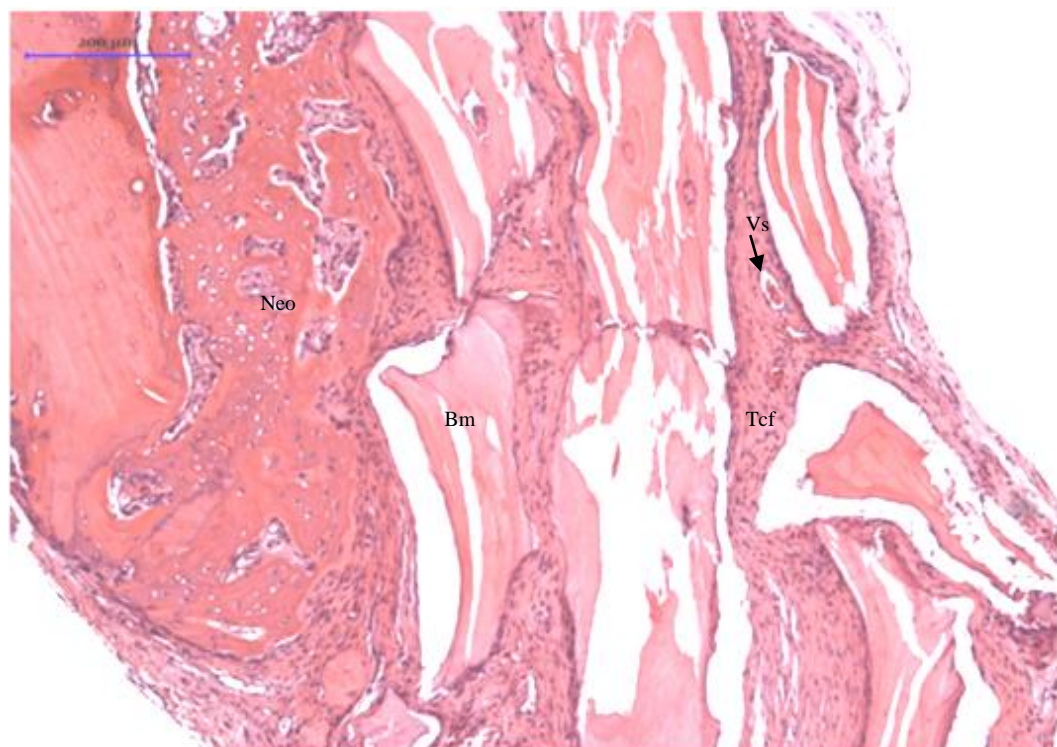
No grupo GB, aos 15 dias, observou-se neoformação óssea reacional nas bordas ósseas, com o defeito totalmente preenchido pelo material em espessura de 1 a 4 camadas, a depender do tamanho e das formas das partículas, diversificadas, muito variável entre os animais do grupo, com arestas evidentes, artefatos de retração, ocasionalmente com fissuras longitudinais, circundadas por um estroma formado por tecido conjuntivo frouxo, discretamente edemaciado, com muitos fibroblastos, capilares sanguíneos e diminuto infiltrado inflamatório mononuclear linfocitário. A escassa matriz osteoide observada ocorre em continuidade às bordas ósseas e especialmente sobre a dura-máter, com presença de osteócitos e osteoblastos em quantidade considerável.

Aos 45 dias, houve formação óssea reparativa às bordas, com osteogênese contígua, mais acentuada que aos 15 dias, que ocorreu de forma centrípeta, a partir da borda em direção ao centro, e ocupou aproximadamente dois terços do defeito, especialmente ao lado da dura-máter, com o biomaterial integrado à matriz osteoide. Foi evidenciada ainda a presença de grande quantidade de material, com diferentes formas e arestas arredondadas, além de artefatos de retração. As partículas ocupavam toda a extensão do defeito em 2 a 3 camadas e eram menores que as observadas aos 15 dias, com menor variabilidade de tamanho e volume entre si. Esporadicamente, em torno de pequenas partículas do material, observou-se a presença de discreta reação granulomatosa inflamatória. Por todo o defeito observou-se o encapsulamento de partículas por um tecido conjuntivo fibroso, denso na sua maioria, com abundante formação de fibras colagênicas e presença de vasos sanguíneos.





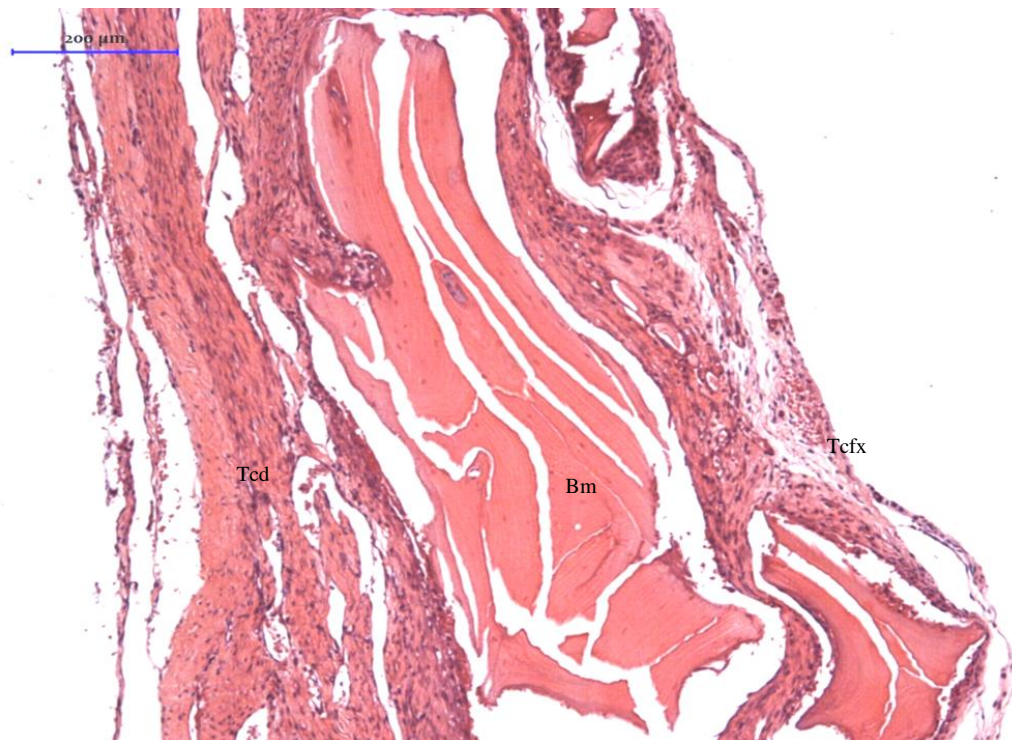
**Figura 3.3: Defeito crítico preenchido com biomaterial (Bm) particulado de 0,25mm a 1,0mm – Borda e veia central (Vc) – 15 dias – HE – Obj. 2,5x**



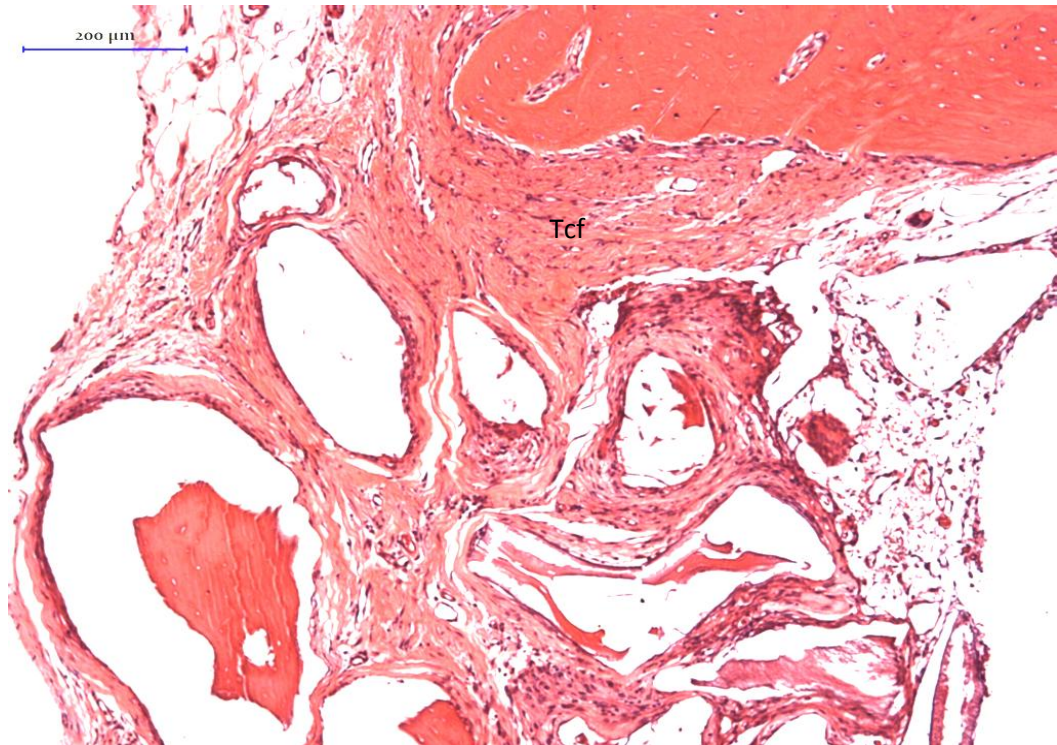
**Figura 3.4: Neoformação óssea (Neo) reacional na borda e defeito preenchido por partículas de biomaterial (Bm) de vários tamanhos, já fragmentadas, encapsuladas por tecido conjuntivo fibroso (Tcf) com presença de vasos sanguíneos (Vs) – 15 dias – HE – Obj. 10x.**



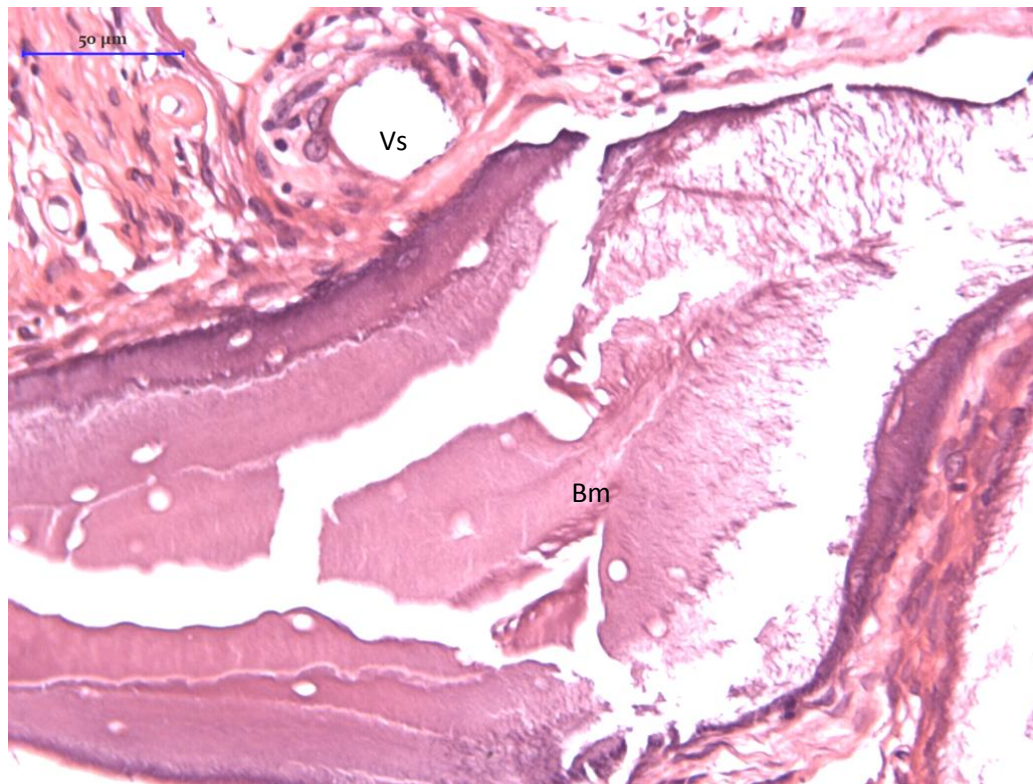
**Figura 3.5: Interação entre a partícula de biomaterial (Bm) e a matriz osteoide (Mo) em formação – 15 dias – HE – Obj. 40x**



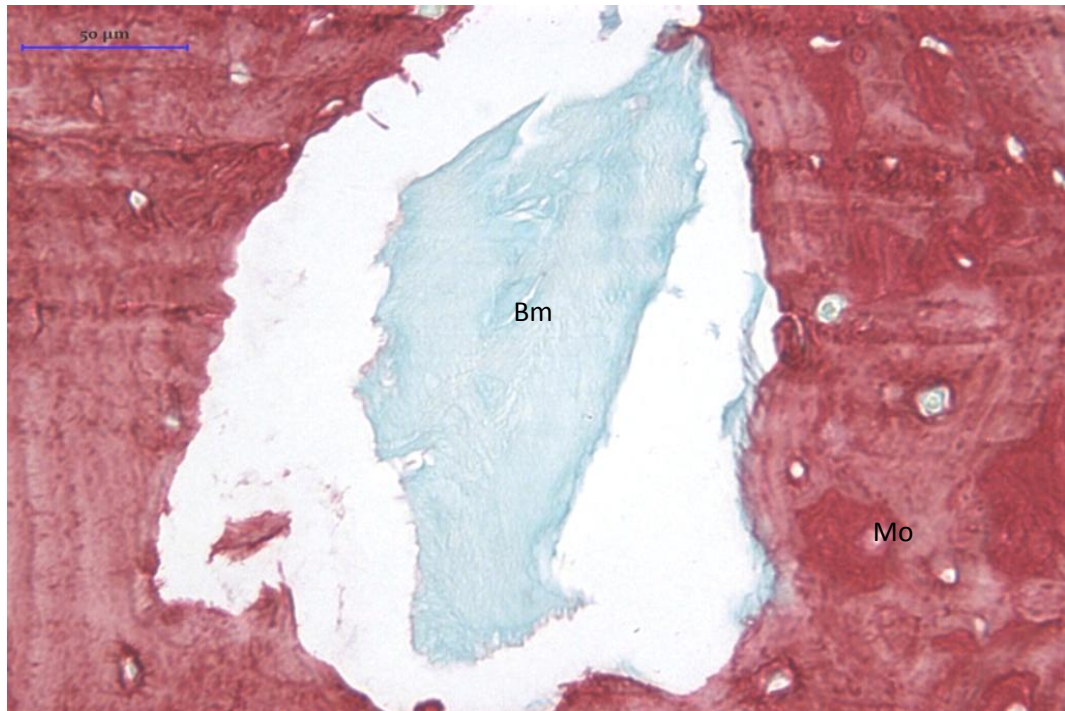
**Figura 3.6: Partícula de cerca de 1,0 mm a ocupar praticamente toda a espessura do defeito e outra de cerca de 0,25 mm, com muitas fissuras, encapsuladas por tecido fibroso – 15 dias – HE – Obj. 10x**



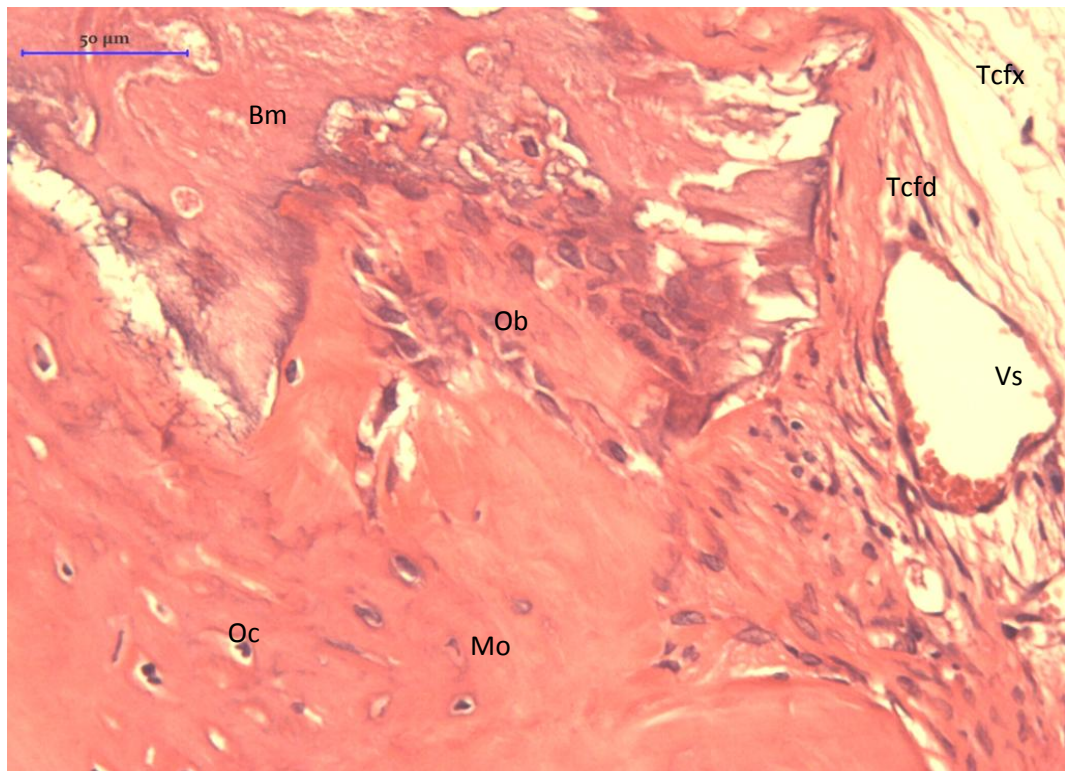
**Figura 3.7:** Concentração de pequenas partículas de biomaterial já reabsorvidas ou em processo de reabsorção a serem encapsuladas por fibras colagénicas – 45 dias – HE – Obj. 10x.



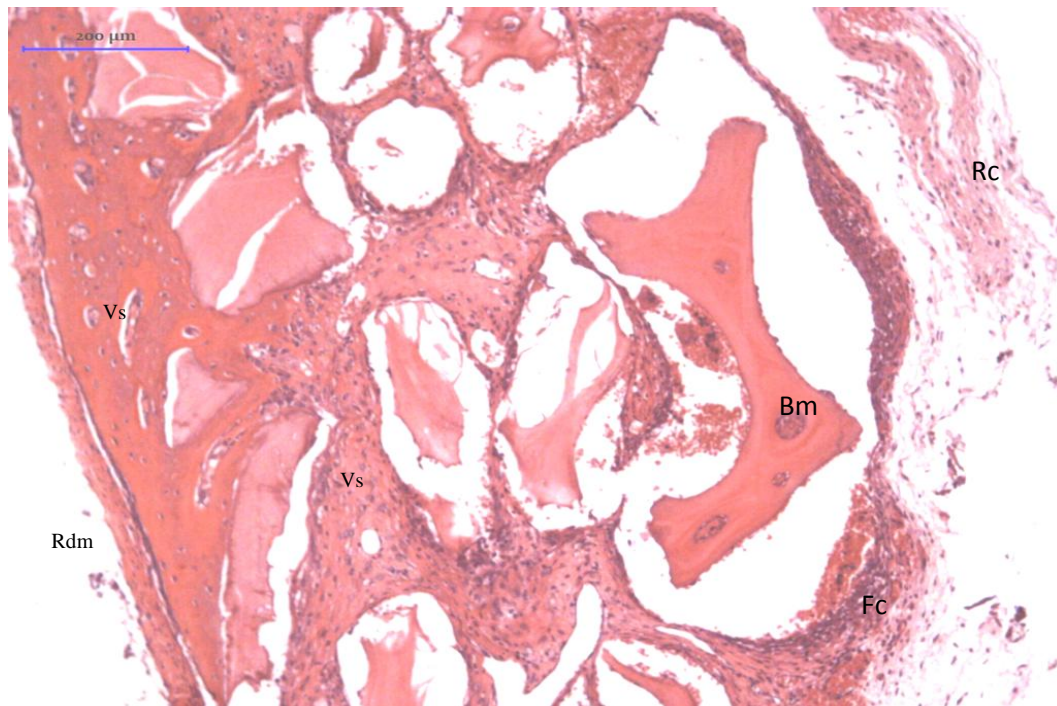
**Figura 3.8:** Poros e fragmentação da partícula do biomaterial, com osteoblastos a sintetizarem matriz osteoide - 45 dias - HE – Obj. 40x.



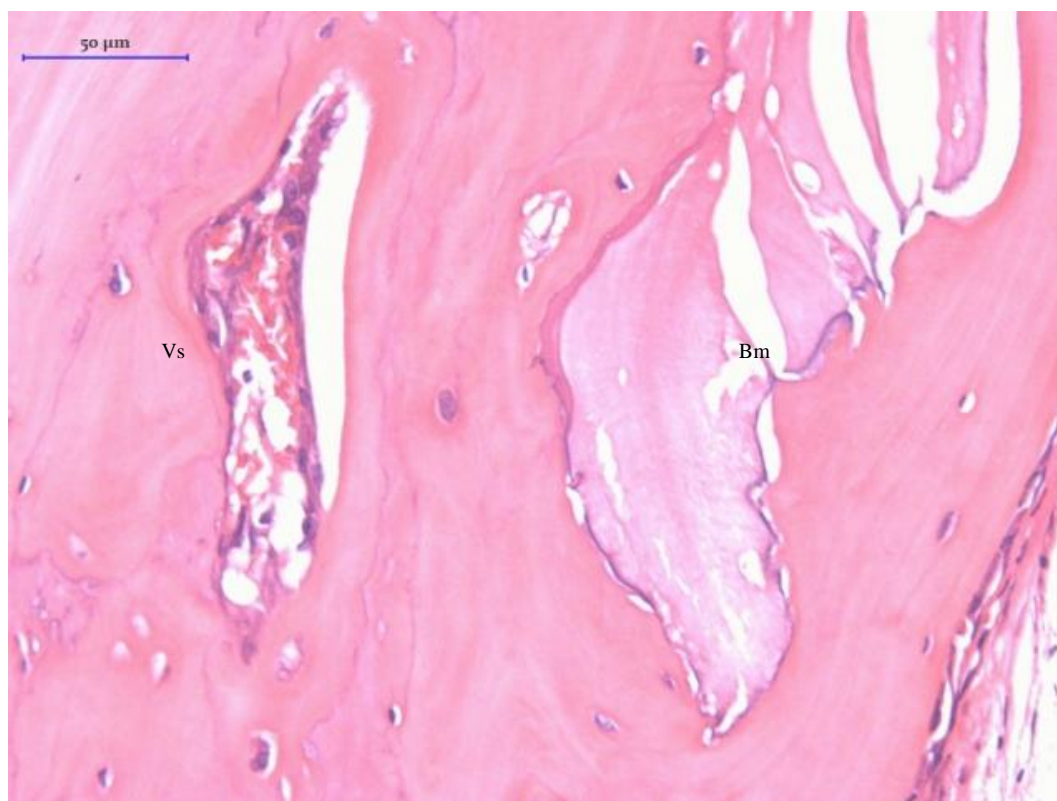
**Figura 3.9:** Partícula de biomaterial na borda totalmente integrada com a matriz osteoide e artefato de retração - 45 dias – PIFG – 40x



**Figura 3.10:** Degradação da partícula de biomaterial (Bm) e síntese de matriz osteoide (Mo). Osteoblastos (Ob) e osteócitos (Oc) já aprisionados na matriz. Presença de vasos sanguíneos (Vs) no estroma, com tecido conjuntivo denso (Tcd) de um lado e frouxo (Tcfx) de outro – 45 dias -HE – Obj. 40x.



**Figura 3.11: Osteogênese sobre a região da dura-máter (Rdm), com incorporação de partículas e formação de vasos (Vs) – 45 dias – HE – Obj. 10x**

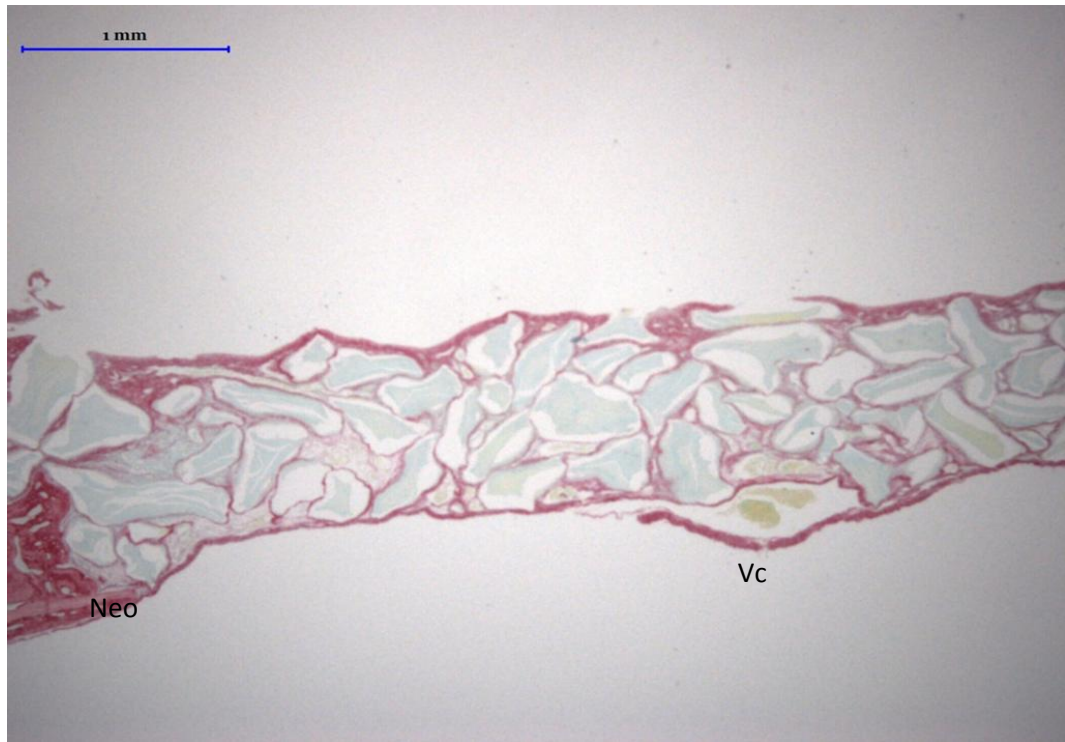


**Figura 3.12: Partícula de biomaterial integrada com a matriz osteoide com osteócitos e vasos sanguíneos – 45 dias – HE – Obj. 40x**

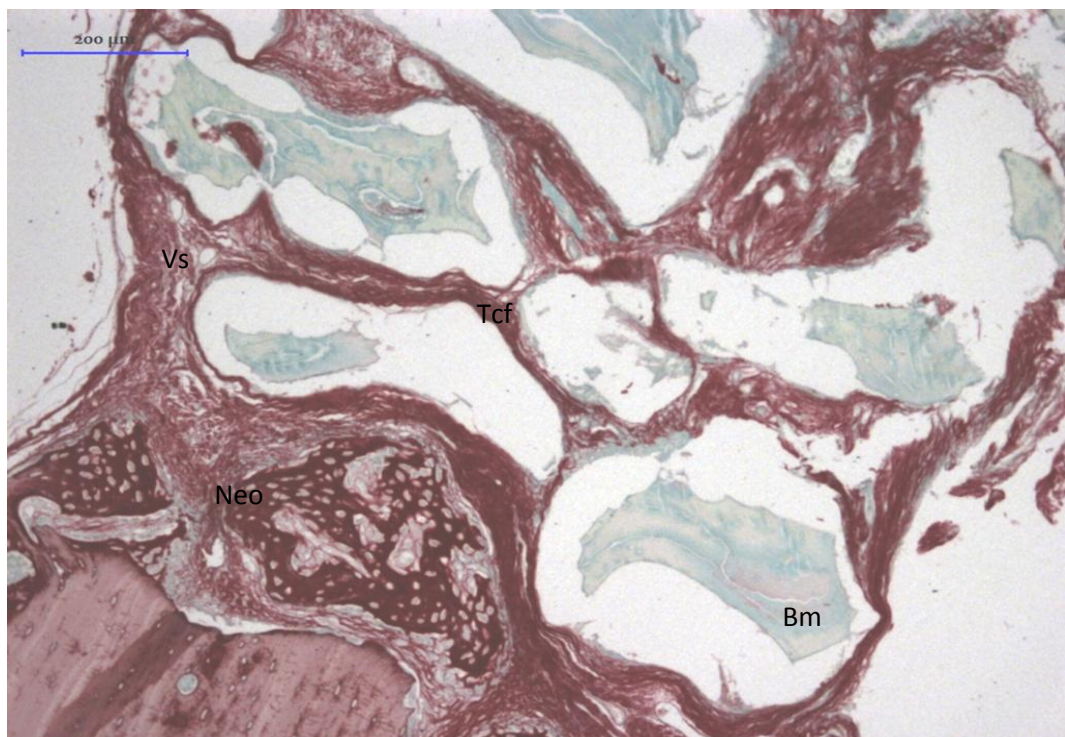
### **3.1 GRUPO GBS – PARTÍCULAS DE 0,4 A 0,6mm**

No Grupo GBS, aos 15 dias, observou-se neoformação óssea reacional nas bordas do defeito, com seu preenchimento completo pelo material em espessura de 3 a 4 camadas de partículas de tamanho diversificado, porém semelhantes em todos os animais do grupo, com arestas evidentes, artefatos de retração e fissuras longitudinais. Existiam septos fibrosos entre o material, porém observou-se escassa permeação, em razão de as partículas encontrarem-se encapsuladas por tecido conjuntivo frouxo, com presença de fibroblastos, discreta fibrose e escassa matriz osteoide, além da presença de vasos capilares de permeio. Havia moderado infiltrado inflamatório mononuclear com predomínio linfocitário, e ausência de reação granulomatosa.

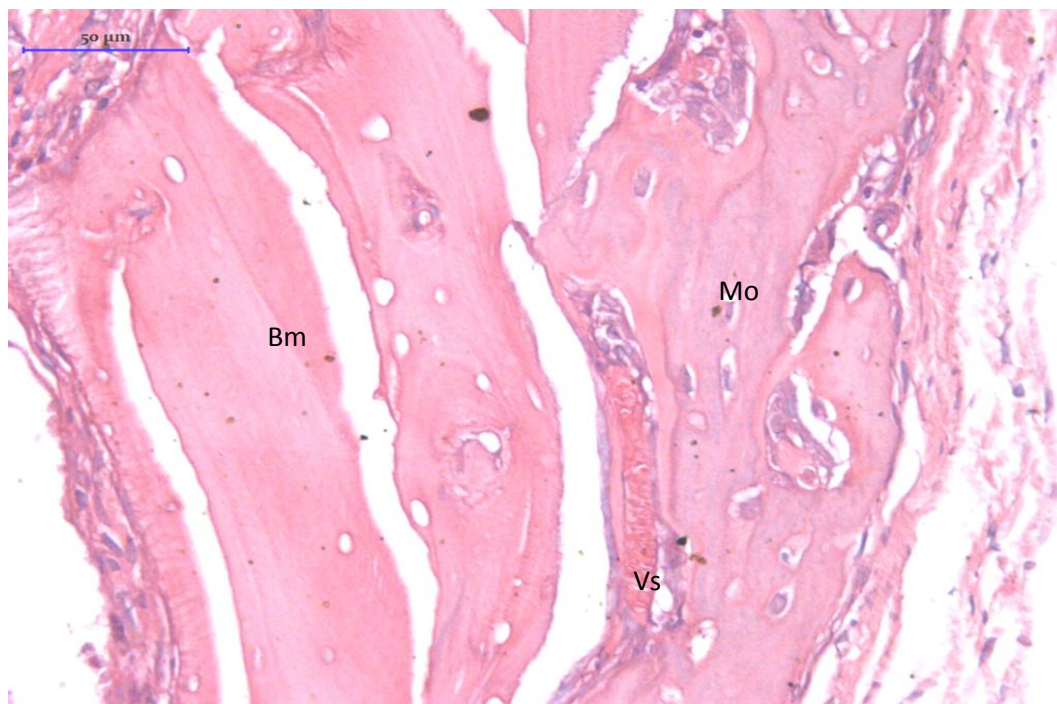
Aos 45 dias, a formação óssea nas bordas estava intensificada, com matriz osteoide entre as partículas, especialmente na região em contacto com a dura-máter, de forma centrípeta, mas também em espessura. O infiltrado inflamatório é menos conspícuo que aos 15 dias. O material sofreu ação biológica, apresentava uma superfície mais arredondada, com presença de partículas encapsuladas por um tecido conjuntivo mais denso (fibroso) e grande quantidade de vasos. A fragmentação do material persistia, bem como os artefatos de retração.



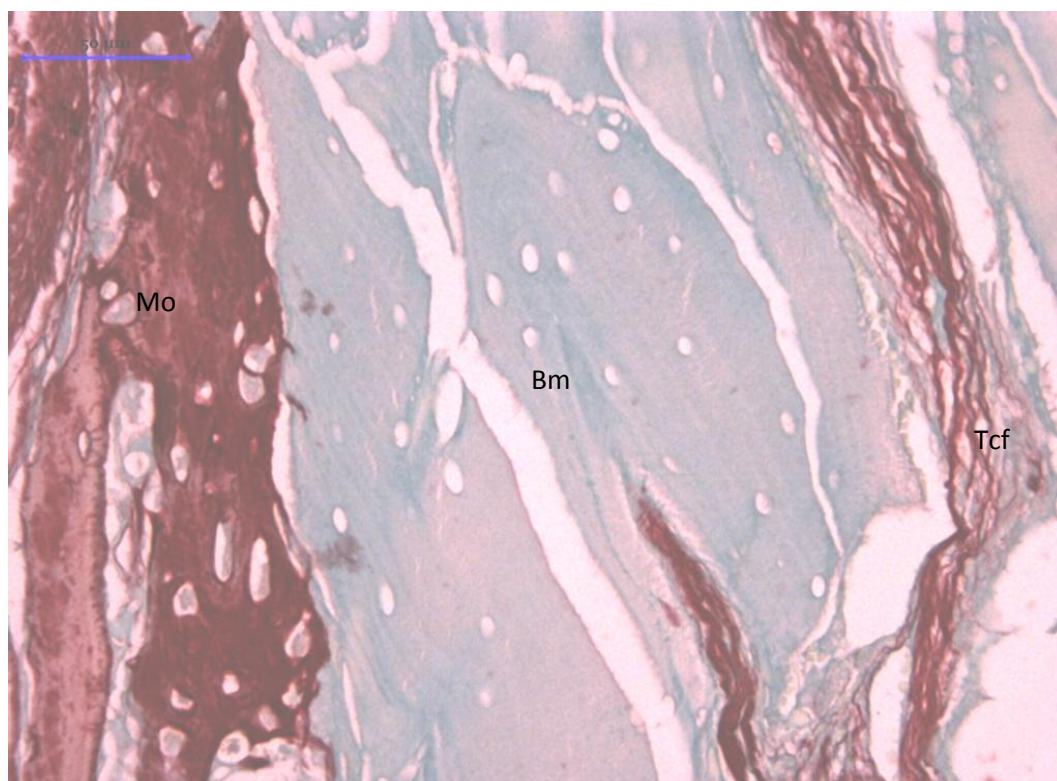
**Figura 3.13: GBS - Defeito preenchido por partículas com pouca variação de tamanho, neoformação óssea reacional na borda – 15 dias – PIFG – Obj. 2,5x**



**Figura 3.14: Neoformação óssea reacional na borda – Partículas encapsuladas por tecido fibroso, com formação de matriz osteoide e vasos – PIFG – 15 dias – Obj. 10x.**



**Figura 3.15: Partículas de biomaterial envolto por matriz osteoide, fibras colagênicas e vasos – HE – 15 dias – Obj. 40x**



**Figura 3.16: Partícula porosa, encapsulada por tecido fibroso, com formação de matriz osteoide e vasos – PIFG – 15 dias – Obj. 40x**



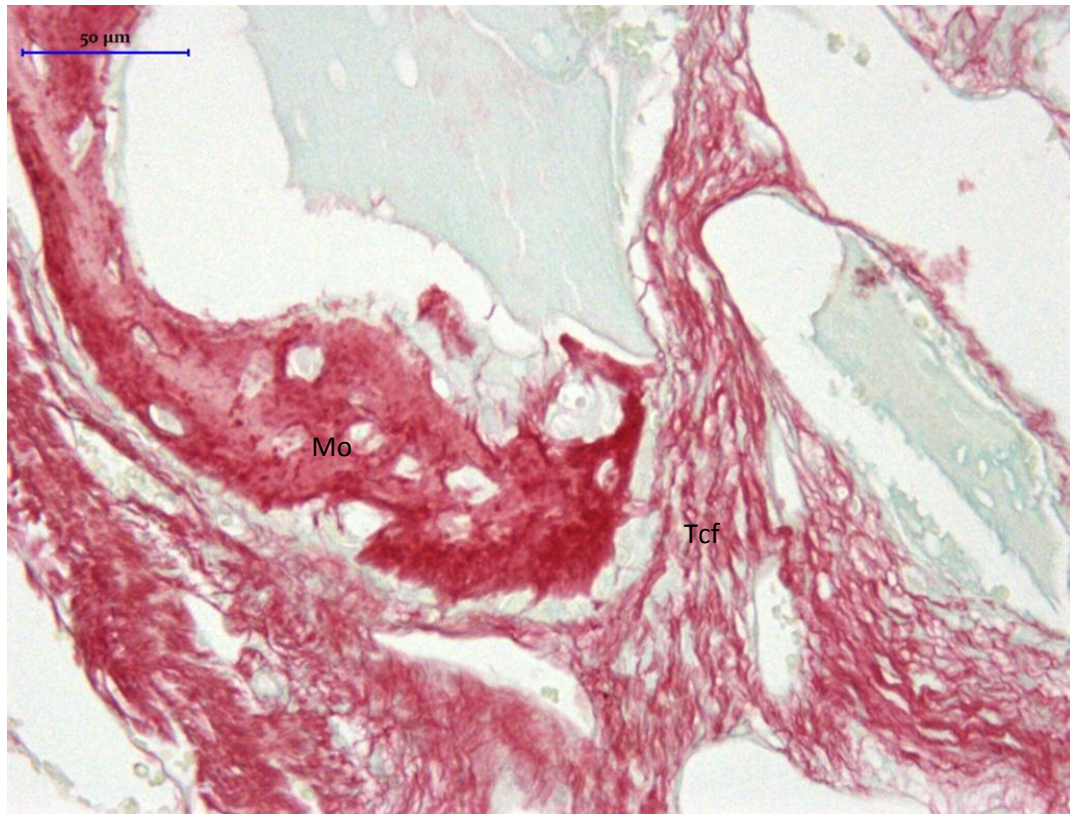


Figura 3.17: Partículas de biomaterial encapsuladas por tecido fibroso, matriz osteoide e vasos – PIFG – 15 dias – Obj 40x

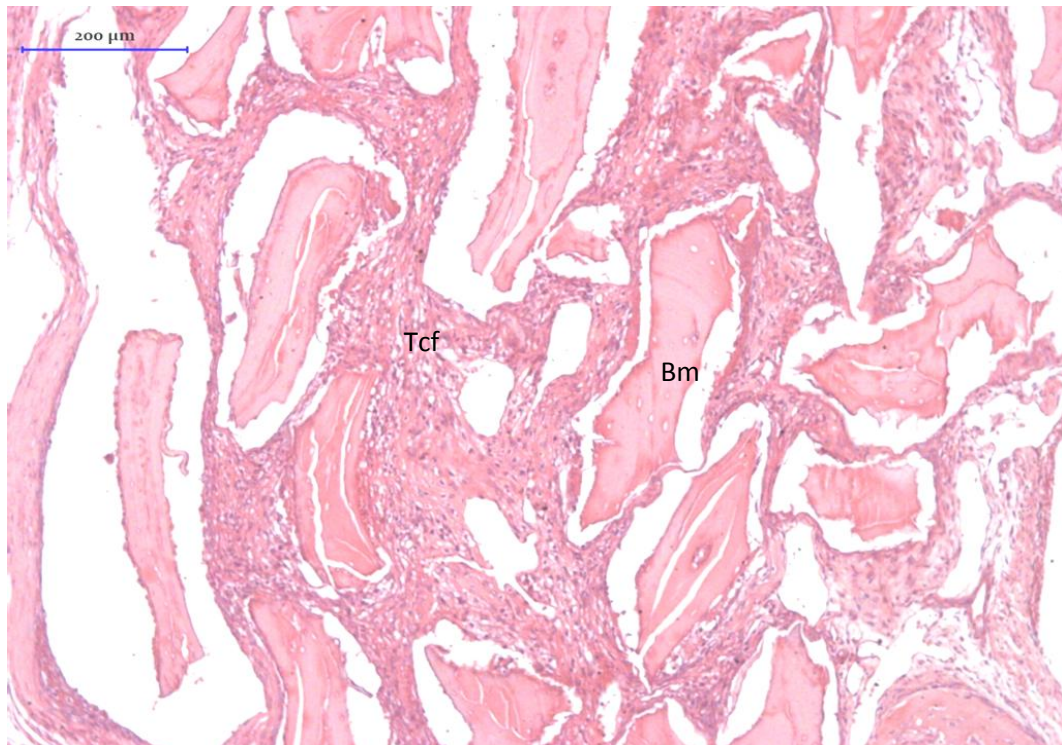
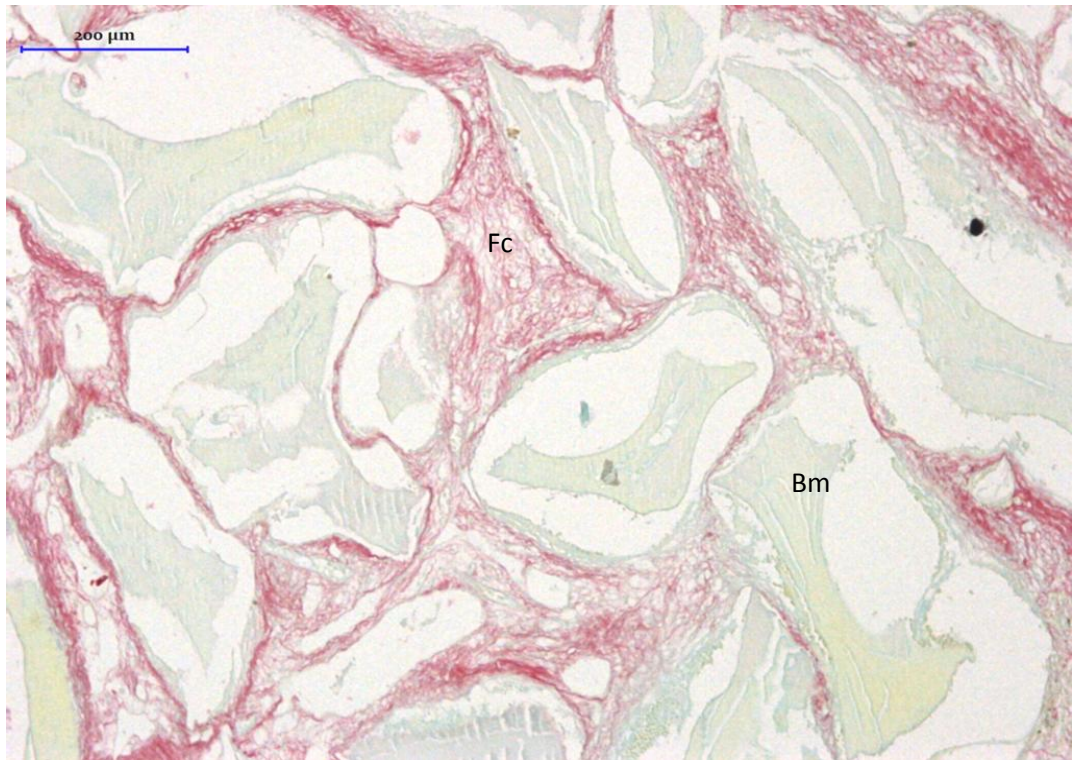
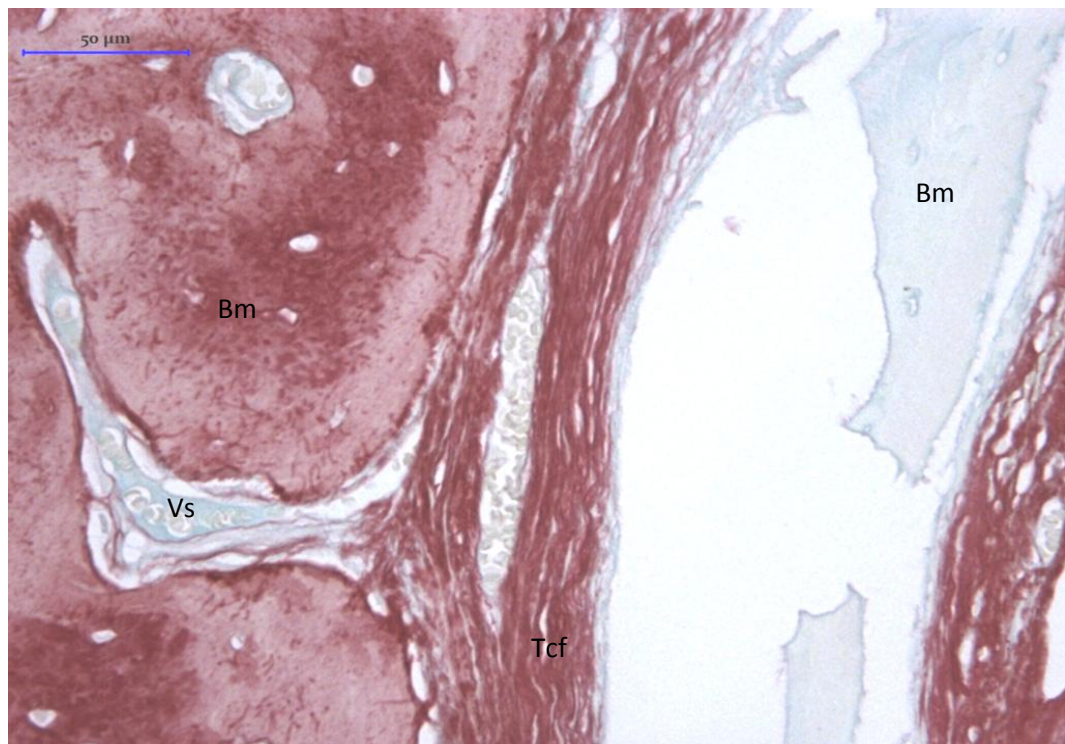


Figura 3.18: Partículas de biomaterial com espículas agudas, encapsuladas por tecido fibroso – 15 dias - HE – Obj. 10x



**Figura 3.19:** Partículas encapsuladas por tecido fibroso, com grande formação de fibras colagênicas e vasos – PIFG – 15 dias – Obj. 10x



**Figura 3.20:** Biomaterial, vasos e fibras colagênicas orientadas de forma a encapsular a partícula já fragmentada próximo à borda com neoformação óssea reacional – 15 dias – PIFG – Obj. 40x

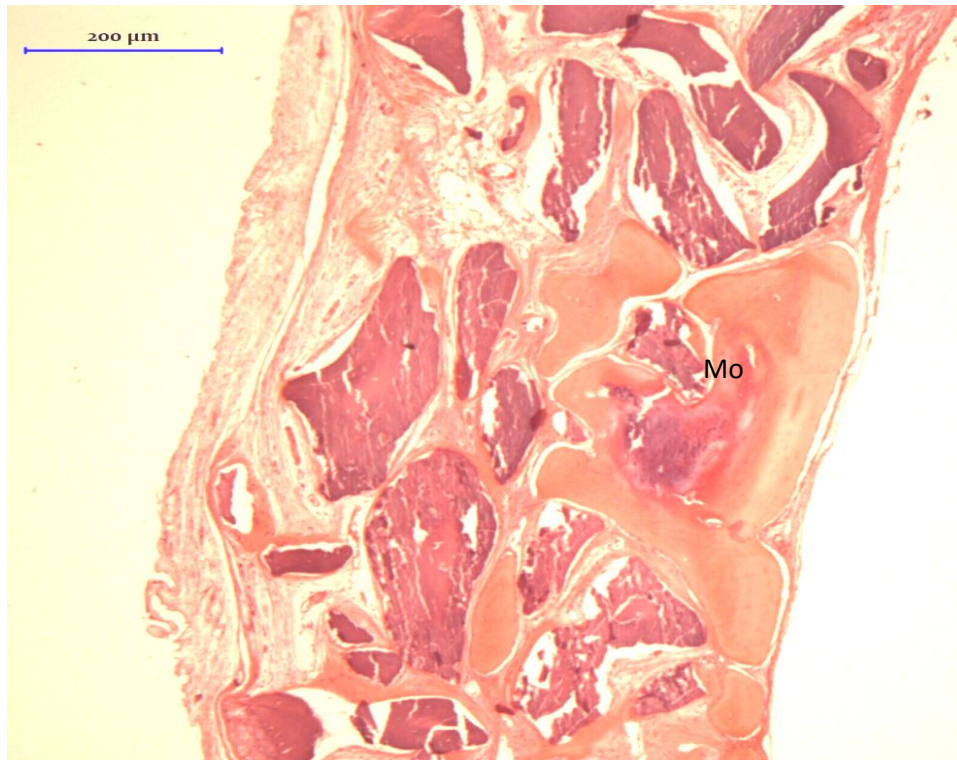


Figura 3.21: Neoformação óssea partindo da borda em direção ao centro guiada por partículas de biomaterial com arestas arredondadas - 45 dias - HE - Obj.10x

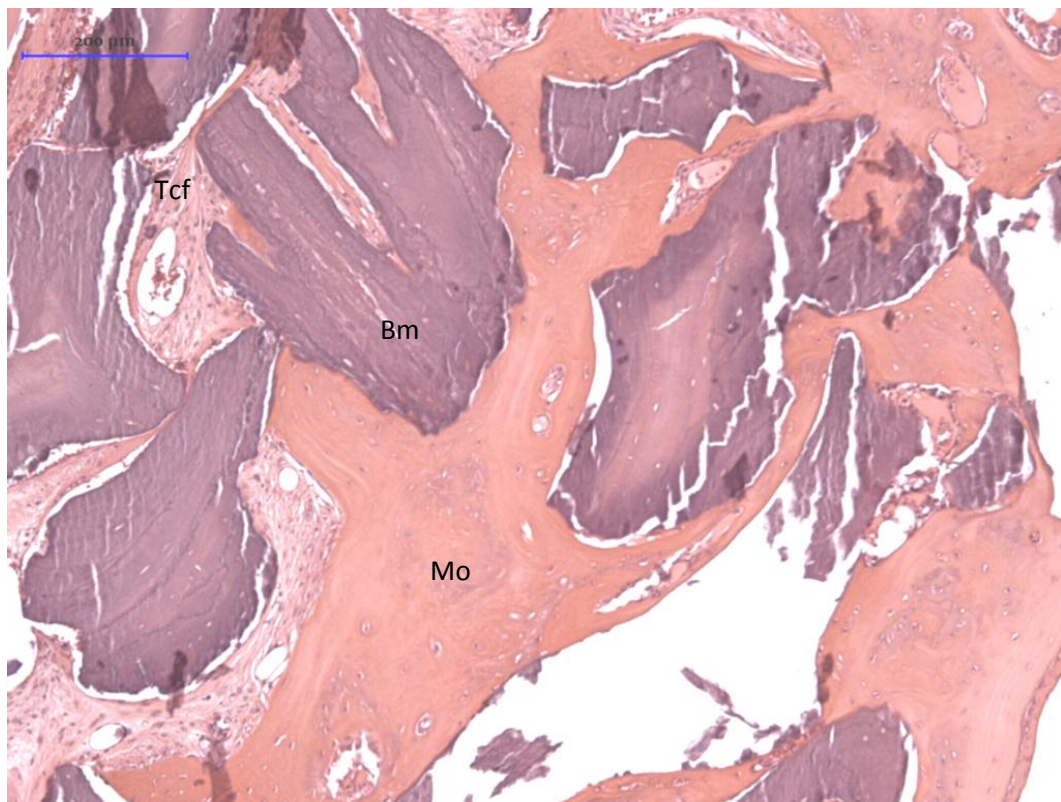
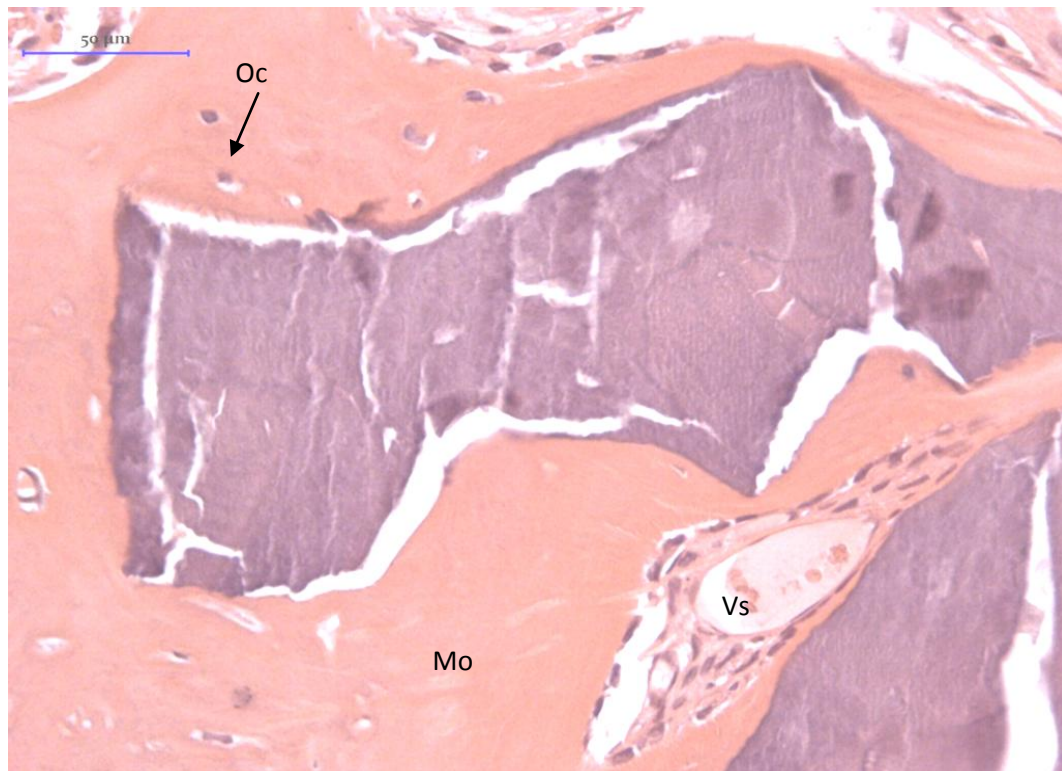
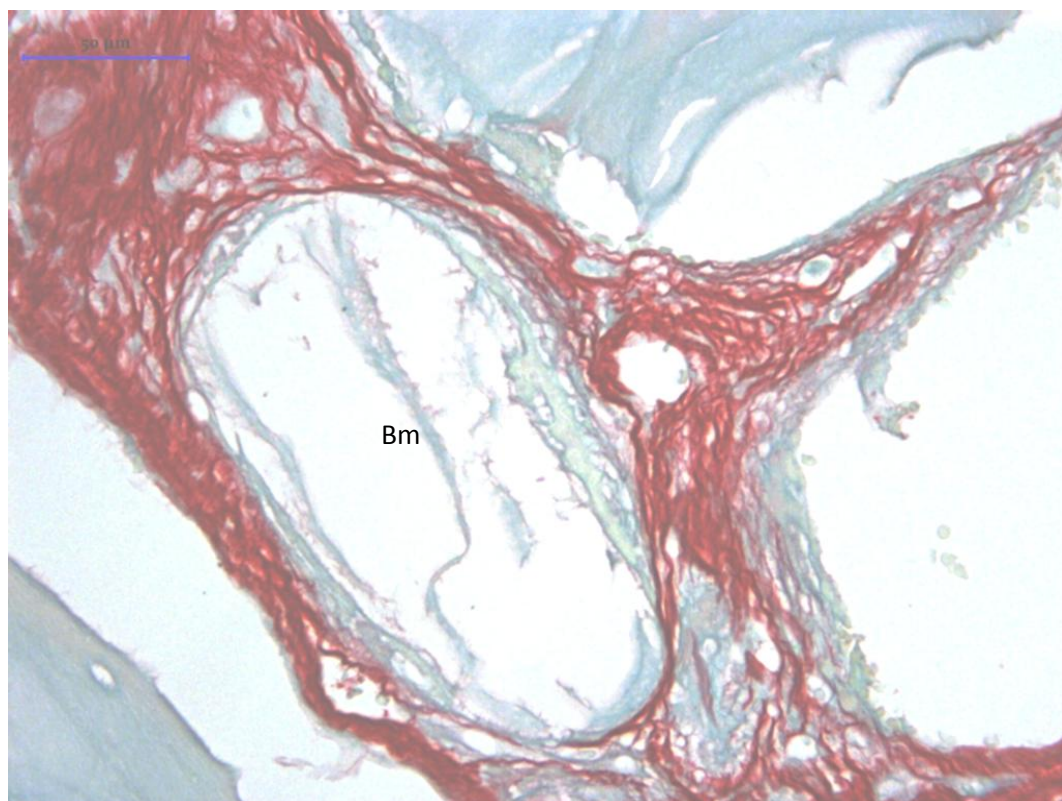


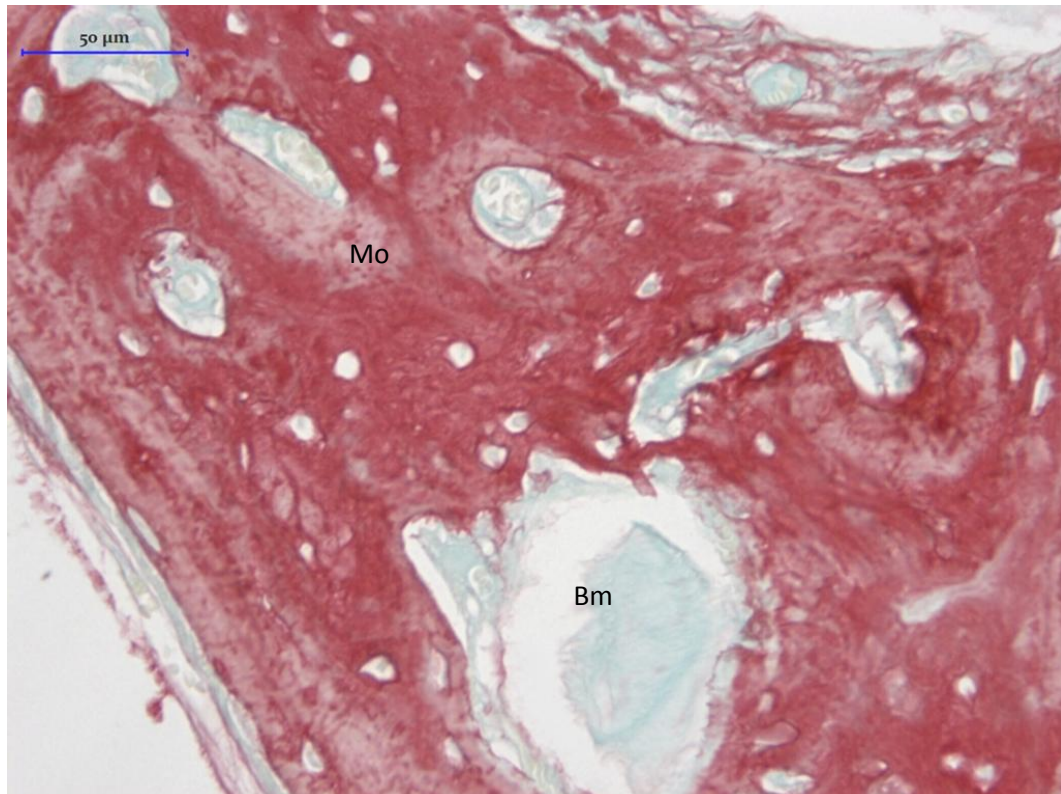
Figura 3.22: Partículas osseointegradas por um lado e encapsuladas por fibras colagénicas por outro - 45 dias - HE - Obj. 10x



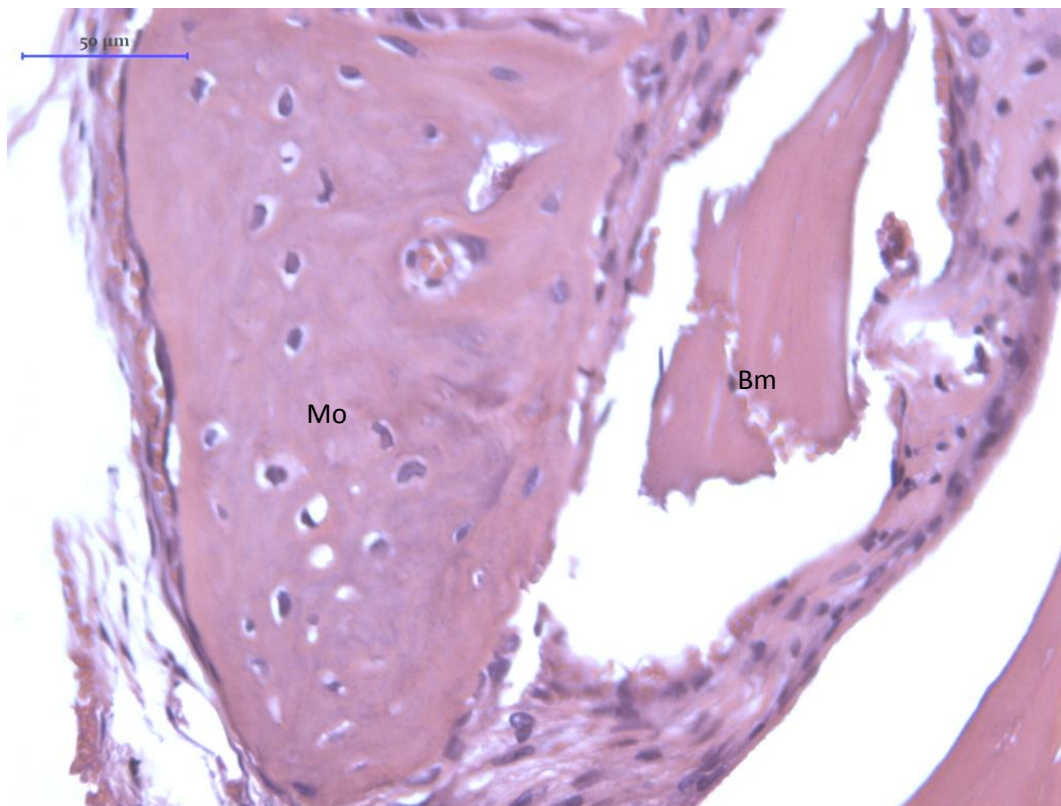
**Figura 3.23:** Partículas osseointegradas na matriz osteoide com osteócitos incorporados, fibras colagénicas e vasos sanguíneos - 45 dias - HE – Obj. 40x



**Figura 3.24:** Partícula fragmentada, com arestas arredondadas pela ação biológica – 45 dias – PIFG – Obj. 40x



**Figura 3.25: Partículas de biomaterial arredondadas incorporadas à matriz osteoide - PIFG – Obj. 40x**



**Figura 3.26: Matriz osteoide próxima a partícula em desintegração – 45 dias – HE – 40x**

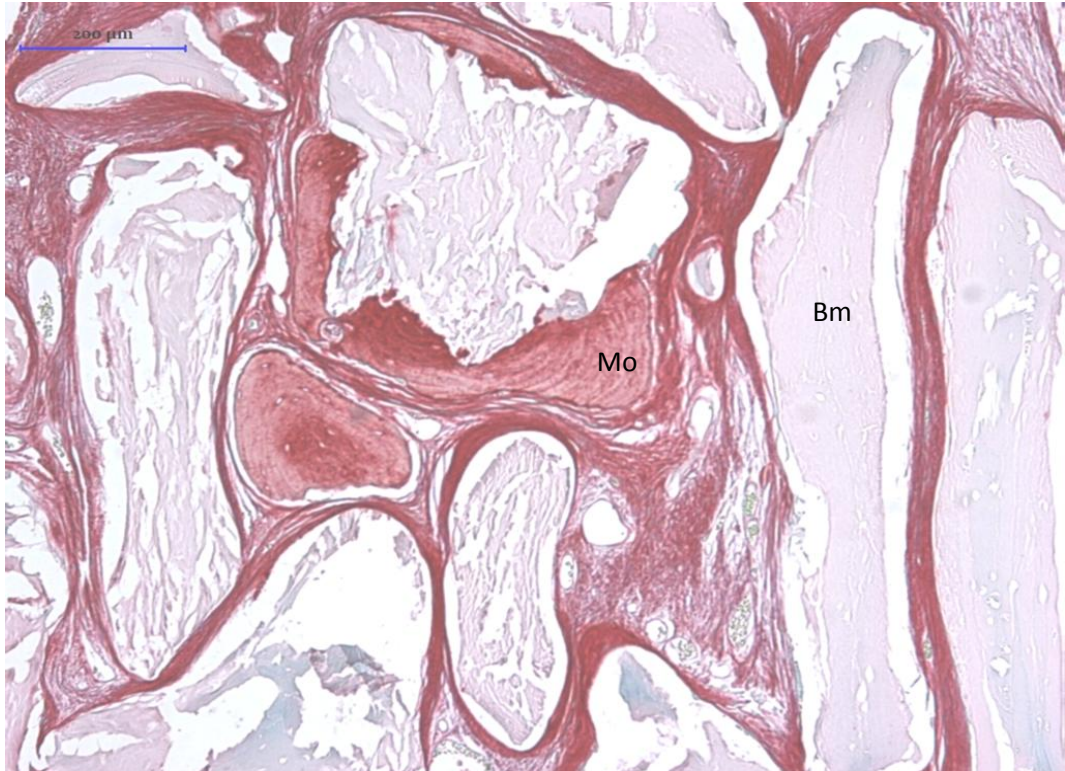


Figura 3.27: Neof ormation óssea no centro do defeito com as partículas integradas – 45 dias – PIFG – 40x

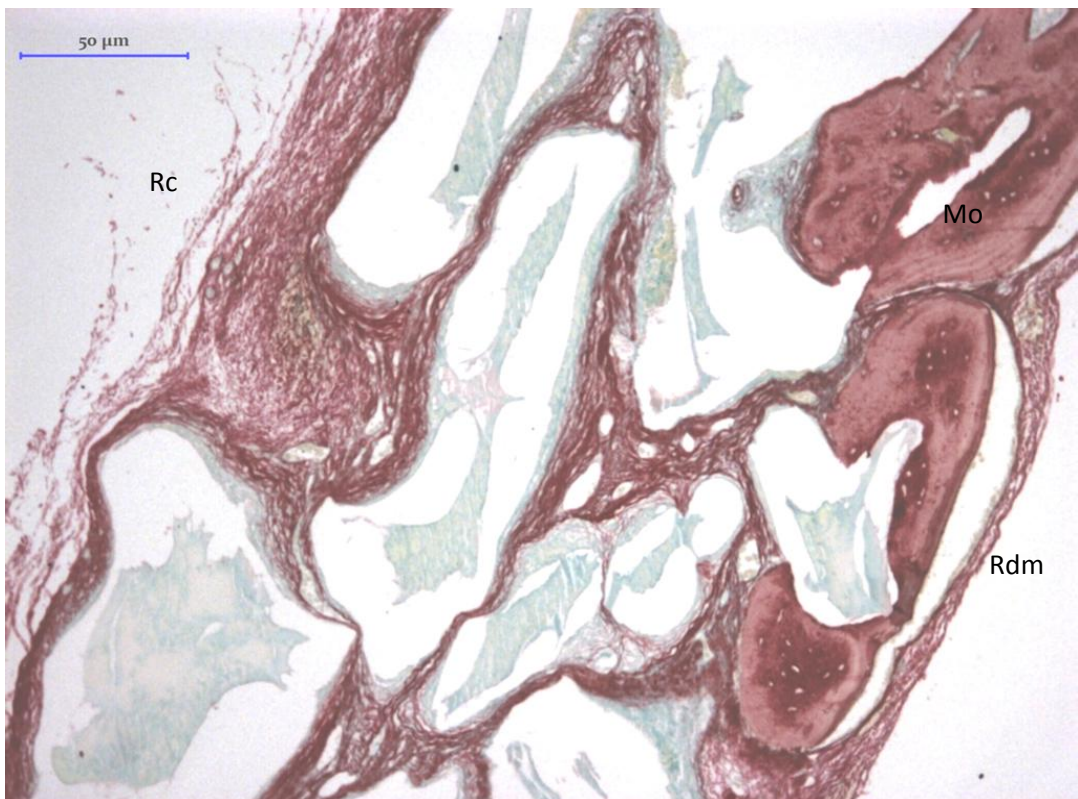


Figura 3.28: Neof ormation óssea no centro do defeito, próxima à dura-máter, guiada por partículas integradas – 45 dias – PIFG – Obj. 40x

## 4 DISCUSSÃO

A aplicação clínica dos biomateriais classificados como substitutos ósseos deve obedecer a um planejamento que envolve todos os cuidados cirúrgicos, além da correta exploração das capacidades dos materiais implantados. Tais procedimentos influenciam muito nos resultados que se pretende obter, assim, o objetivo da investigação experimental em modelos animais é proporcionar o conhecimento das respostas biológicas tanto dos diversos materiais que estão em desenvolvimento como dos que já estão à disposição no mercado, para que sejam aperfeiçoados e aplicados de forma consciente em situações clínicas.

O presente estudo comparou uma hidroxiapatite de origem bovina, comercial, com diferentes tamanhos de grânulos, como arcabouço para o reparo de defeito ósseo crítico em calvária de rato, e possibilitou a compreensão de suas características biológicas bem como da influência do tamanho da partícula na osteocondutividade do material.

A caracterização do defeito ósseo como crítico foi bem evidenciada no grupo controle, GC, no qual um defeito de 8,5 mm foi criado cirurgicamente na calvária do rato e mantido apenas com coágulo sanguíneo, com a observação de formação de tecido ósseo apenas reacional, nas bordas, e tecido conjuntivo fibroso no restante do defeito, devido às suas dimensões do e à capacidade limitada de regeneração da calvária, tanto pelo suprimento inadequado de sangue quanto pela deficiência de medula óssea local, corroborada por vários trabalhos com as mesmas observações [5, 6, 7].

O modelo rato mostrou-se adequado devido às suas características morfológicas e fisiológicas, além de termos tido facilidade de manipulação, alojamento e alimentação. A escolha da região da calvária proporcionou relativa facilidade de acesso cirúrgico, pela ausência de camadas musculares, e boas condições de estabilização da ferida no pós-operatório, apesar de esta cirurgia ser considerada de alto risco de morte, o que demandou elevada habilidade cirúrgica.

Nos grupos GB e GBS, ao compararmos os resultados quanto ao tamanho das partículas, no grupo GB, aos 15 dias, houve uma grande variação de um animal para outro, provavelmente pela dificuldade de uniformização das diferentes alíquotas do biomaterial quando da inserção. Observamos uma grande quantidade de partículas pequenas, da ordem de 0,25mm que ficaram concentradas nos últimos animais operados, o que evidenciou áreas de grande percentagem de partículas pequenas, sem observarmos neoformação óssea, e sim, apenas formação de fibrose, provavelmente por terem sedimentado no fundo do frasco. No grupo GBS, devido à prévia seleção de partículas para uma faixa granulométrica restrita, as partículas apresentaram-se de tamanho semelhante, assim, houve uniformidade no grupo, em ambos os pontos biológicos, e conseqüente melhor avaliação do comportamento biológico do material.

Quanto à biocompatibilidade do material, no grupo GBS, não despertou reação granulomatosa inflamatória, o que também foi observado nos estudos de Traini, *et al.* (2007) [35], Degidi, *et al.* (2006) [37] e Scarano, *et al.* (2006) [38]. No grupo GB, ocorreu alguma reação inflamatória ao redor de partículas diminutas, menores de 0,1 mm, além de aumento de atividade mitótica de fibroblastos nesta proximidade, e pode explicar a diminuição da osteogênese neste local. Tal evidência foi também relatada Evans (1991) [19] em estudo *in vitro* onde, na presença de partículas de hidroxiapatite com tamanhos entre 3,7 e 99µm, ocorreu maior resposta inflamatória.

A capacidade do BioOss<sup>®</sup> em mimetizar a arquitetura óssea foi observada tanto aos 15 dias como aos 45 dias, nos dois grupos implantados, devido à manutenção do arcabouço, com a presença de poros, embora com pouca evidência de permeio. Assim, as considerações de muitos autores sobre o aumento da bioatividade celular com crescimento ósseo no interior das partículas (intragranular), não foram observadas neste estudo [26, 27, 28].

Quanto aos locais de ausência de material e presença de artefatos de retração, tanto no grupo GB, como no grupo GBS, mesmo nas partículas menores, não foi possível afirmar que elas tenham sido reabsorvidas, pois há a possibilidade



de que tenham sido expulsas do defeito ou devido ao processamento histológico da peça.

De forma mais evidente no grupo GBS, mas também no grupo GB, ocorreu osteogênese intergranular, sobre as partículas, por osteocondução, de forma centrípeta, das bordas para o centro, especialmente na região próxima à dura-máter, além de, este interstício, rico em fibras colagênicas, ter permitido a angiogênese e a chegada de células osteoprogenitoras que contribuíram para a neoformação óssea, além de garantir a nutrição deste tecido neoformado.

Assim, o crescimento ósseo no enxerto foi dependente, além da biocompatibilidade do material, das interconexões e dimensões de sua estrutura granular, corroborado por estudos de Wallace, *et al.* (2005) [31], Traini, *et al.* (2007) [35], e Galindo- Moreno, *et al.* (2007) [36] que relataram uma interconectividade entre as partículas de BioOss<sup>®</sup> e o novo tecido ósseo através de pontes trabeculares, com a formação de um enxerto integrado, sólido, de alta densidade, e com uma rica rede de vasos, provavelmente por se tratar de um material oriundo de tecido ósseo [36, 37, 38].

Neste estudo, aos 45 dias, nos grupos GB e GBS, não foi verificada absorção significativa do material, observada apenas pelo arredondamento das espículas das partículas, devido à ação biológica no leito receptor, talvez pelo curto período de tempo pós-operatório, apesar de Artzi *et al.* (2003) [34, 35], ao avaliar enxertos de hidroxiapatite bovina com grânulos de tamanho entre 0,25 mm a 1,00 mm em mandíbula de cão, mesmo após um período de dois anos, ter também observado a presença de partículas de biomaterial nos sítios experimentais, sem absorção considerável, durante o acompanhamento da remodelação óssea, o que nos leva a pensar que, ocorre a incorporação destas partículas de biomaterial no interior do tecido neoformado.

Idealmente, um substituto ósseo deve conduzir ou induzir a osteogênese, ao mesmo tempo em que é completamente absorvido, nem de forma muito lenta, nem muito rápida, assim, por serem parâmetros fundamentais, as propriedades físico-químicas de materiais de substituição óssea, como cristalinidade, área

superficial, rugosidade, composição e tamanho da partícula, influenciam sua taxa de degradação após implantação [12], bem como o tratamento térmico a que o material foi submetido quando de seu processamento para comercialização, que pode ter possibilitado que a rede cristalina do material tenha obtido arranjo ordenado, e assim, dificultado o processo de reabsorção das partículas [17, 18].

Este tratamento térmico pode, ainda, ter modificado a estrutura de seus poros, a dificultar a permeabilidade vascular, embora Rosen *et al.*, (2002), ao utilizar imagens em duas e três dimensões através de microscopia eletrônica de transmissão (MET), afirmar que a hidroxiapatita bovina, mesmo após tratamento térmico para remoção da parte orgânica, manteve sua estrutura porosa compatível ao tecido ósseo humano e ainda conservou arcabouço que refletia a interação entre o colagênio e os seus cristais [21]. Esta observação nos leva a crer que, mesmo após a desproteneização, este biomaterial conserva memória característica de tecidos biológicos, com maior facilidade de adsorção de proteínas específicas, que permitem crescimento e contato com o novo osso, quando implantado.

A qualidade desse novo osso formado também tem sido alvo de investigação. Observamos, em ambos os grupos implantados a deposição de matriz óssea diretamente sobre as partículas de biomaterial, embora parcialmente, não de maneira uniforme, intercalada a ocorrência de fibrose ao redor das partículas, de modo diferente ao observado nos estudos de Degidi, *et al.* (2006) [37] e Scarano, *et al.* (2006) [38], que relataram, inclusive, revitalizações dos Canais de Harvers nas partículas de BioOss<sup>®</sup>.

Ainda com relação à qualidade óssea, apesar de Cordaro, *et al.* (2008) [40], em suas amostras, ter observado, no enxerto, uma alta percentagem de tecido mineralizado, quando comparado ao tecido ósseo remanescente – o que lhe permitiu concluir que o enxerto com BioOss<sup>®</sup> produziu um trabeculado mais denso que o osso pré existente, devido, justamente, à presença residual de partículas de biomaterial –, podemos pensar que, a longo prazo, na interface entre o tecido ósseo e o biomaterial, poderão ocorrer novos processos de reabsorção, a desagregação dessas partículas, com consequente risco ao enxerto e ao que ele vier a suportar, como no caso de implantes dentais ou próteses ortopédicas.

Deste modo a continuidade de estudos experimentais controlados para avaliar a qualidade do tecido ósseo regenerado com o uso de biomateriais, após ser submetido a cargas, em situações de comprometimento sistêmico e a longo prazo, continua a ser necessária, para podermos compreender o verdadeiro significado das partículas osseointegradas, bem como suas consequências nas diversas situações clínicas.

Assim, com a metodologia empregada neste trabalho, pudemos constatar que o BioOss<sup>®</sup> é um material biocompatível, que mimetiza o tecido ósseo, conduz a osteogênese pelo mecanismo de osteocondução, e favorece a formação de tecido ósseo de forma integrada às suas partículas, como um arcabouço poroso e permite a proliferação de novos vasos, porém, é de lenta reabsorção e permanece incorporado pela neoformação óssea.

Apesar de não ser comercializado no tamanho de 0,4 mm a 0,6 mm, foi a granulometria que mostrou melhores resultados. Deste modo, consideramos necessário o prosseguimento deste estudo em outros pontos biológicos, com marcadores ósseos e análises histomorfométricas, para melhor observarmos o comportamento biológico do material em questão e assim compararmos os resultados com outros estudos deste e de outros materiais.

## **5. CONCLUSÃO**

Neste estudo concluiu-se que a hidroxiapatite bovina, BioOss<sup>®</sup>, foi biocompatível, permitiu angiogênese e promoveu osteogênese por osteocondução, mantendo-se integrada ao tecido neoformado em ambos os grupos experimentais, com resultados melhor reproduzidos no intervalo de partícula entre 0,4 a 0,6mm.

## REFERÊNCIAS

1. Colnot C, Skeletal Cell Fate Decisions within Periosteum and Bone Marrow during Bone Regeneration. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2009 Feb; 24 (2): 274-282.
2. Yu Y, Lieu S, Lu C, Colnot C. Bone Morphogenetic Protein 2 Stimulates Endochondral Ossification by Regulating Periosteal Cell Fate During Bone Repair. *Bone*. 2010 July; 47(1): 65–73.
3. Bonewald LF. The Amazing Osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2011 Feb; 26 (2): 229–238.
4. Rolim, AEH. Avaliação de microesferas de hidroxiapatita dopadas ou não com estrôncio no reparo de defeito ósseo crítico em calvária de rato. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia, 2010.
5. Mokbel N, Bou Serhal C, Matni G, Naaman N. Healing patterns of critical size bony defects in rat following bone graft. *Oral Maxillofac Surg*. 2008; 12: 73-78.
6. Park JW, Jang JH, Bae SR, An CH, Suh JH. Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized rat calvarial defect. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Apr; 20 (4): 372-378.
7. Gomes PS, Fernandes MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim*. 2011 Jan; 45(1):14-24.
8. Boretos JW, Eden M. Contemporary biomaterials: Material and host response: clinical application. In: *New Technology and legal aspects*. Park Ridge, NJ: Noyes Med. Publ. 1984.
9. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J*. 2001; 10: 96–101.
10. Habibovic P, Gbureck U, Doillon CJ, Bassett DC, Van Blitterswijk CA, Barralet JE. Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants. *Biomaterials*. 2007; 29 (7): 944–953.
11. Döring H, Schmitt C, Lutz R, Eitner S, Schlegel KA. Bone substitutes used for three-dimensional augmentation. *J. Stomat. Occ. Med*. 2011; DOI 10.1007/s12548-011-0022-7

12. Cancedda R, Giannonic P, Mastrogiacomo M. Biomaterials. Review Tissue Engineering Approach to Bone Repair in Large Animal Models and in Clinical Practice. *Biomaterials*. 2007; 28: 4240–4250
13. Ripamonti U, Ferretti C, Teare J, Blann L. Transforming growth factor-beta isoforms and the induction of bone formation: implications for reconstructive craniofacial surgery. *J Craniofac Surg*. 2009 Sep; 20(5):1544-55.
14. Peetz M. Characterization of xenogeneic bone material. In: Boyne, PJ (ed.). *Osseous Reconstruction of the Maxilla and Mandible*. Quintessence. 1997: 87-93.
15. Mendonça TA; Conz MB, Barros TC, Sena LA, Soares GA, Granjeiro J M. Physicochemical characterization of two deproteinized bovine xenografts. *Braz Oral Res*. 2008; 22(1): 5–10.
16. Deligianni DD, Katsala ND, Koutsoukos PG, Missirlis YF. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials*. 2001 Jan; 22 (1):87-96.
17. Wenz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials*. 2001; 22: 1599 – 1606.
18. Oliveira RC, Sicca CM, Silva TL, Cestari TM, Kina JR, Oliveira DT, Buzalaf MAR, Taga R, Taga EM, Granjeiro JM. Efeito da temperatura da desproteinização no preparo de osso cortical bovino microgranular: avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular em subcutâneo de ratos. *Rev Fac Odontol Bauru*. 1999; 7: 85-93.
19. Evans EJ. Toxicity of hydroxyapatite in vitro: the effect of particle size. *Biomaterials*. 1991 Aug; 12(6):574-6.
20. Sun JS, Liu HC, Chang WH, Li J, Lin FH, Tai HC. Influence of hydroxyapatite particle size on bone cell activities: an in vitro study. *J Biomed Mater Res*. 1998 Mar 5; 39(3):390-7.
21. Rosen VB, Hobbs LW, Spector M. The ultrastructure of anorganic bovine bone and selected synthetic hydroxyapatites used as bone graft substitute materials. *Biomaterials*. 2002 Feb; 23 (3):921-8.
22. Ooi CY, Hamdi M, Ramesh S. Properties of hydroxyapatite produced by annealing of bovine bone. *Ceramics International*. 2007; 33: 1171–1177.

23. Kuroda T. Bone formation and mechanical properties of the cancellous bone defect site filled with hydroxyapatite granules. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi*. 1995 Oct; 69(10):1037-49.
24. Egli PS, Muller WE, Schenk RK. Porous Hydroxyapatite and Tricalcium Phosphate Cylinders with Two Different Pore Size Ranges Implanted in the Cancellous Bone of Rabbits. *Clin. Orthop*. 1998; 232: 127 – 138.
25. Tamimi FM, Torres J, Tresguerres I, Clemente C, López-Cabarcos E, Blanco LJ. Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between Bio-Oss and a novel b-TCP/DCPD granulate. *J clin Periodontol* 2006; 33: 922–928.
26. Chackartchi T, Iezzi G, Goldstein M, Klinger A, Soskolne A, Piattelli A, Shapira L. Sinus floor augmentation using large (1–2mm) or small (0.25–1 mm) bovine bone mineral particles: a prospective, intra-individual controlled clinical, micro-computerized tomography and histomorphometric study. *Clin. Oral Impl. Res.* 2011; 22: 473–480.
27. Mordenfeld A, Hallman M, Johansson CB, Albrektsson T. Histological and histomorphometrical analyses of biopsies harvested 11 years after maxillary sinus floor augmentation with deproteinized bovine and autogenous bone. *Clin. Oral Impl. Res.* 2010; 21: 961–970.
28. Volkov V, Alekseeva IS, Kulakov AA, Goldshtein DV, Shustrov SA, Shuraev AI, Arutyunyan IV, Bukharova TB, Rzhaniyeva AA, Bolshakova GB, Grigoryan AS. Regeneration of Skull Bones in Adult Rabbits after Implantation of Commercial Osteoinductive Materials and Transplantation of a Tissue-Engineering Construct. *Cell Technologies in Biology and Medicine*. 2010; 2:505-510.
29. Zaffe D, Leghissa GC, Pradelli A, Botticelli AR. Histological study on sinus lift grafting by Fisiograft and Bio-Oss. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2005; 16: 789–793.
30. John A, Abiraman S, Varma HK, Kumari TV, Umashankar PR. Bone Growth Response with Porous Hydroxyapatite Granules in a Critical Sized Lapine Tibial-Defect Model. *Bull. Mater. Sci.*, 2002 April; 25 (2): 141-154.
31. Wallace SS, Froum SJ. Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implants. A systematic review. *Annals of Periodontology*. 2003 Dec; 8(1):328-43.
32. Kruse, A. et al. Bone regeneration in the presence of a synthetic hydroxyapatite/silica oxide -based and a xenogenic hydroxyapatite-based bone substitute material. *Clin. Oral Impl. Res.* 2011; 22: 506-11.

33. Artzi Z, Givol N, Rohrer MD, Nemcovsky CE, Prasad HS, Tal H. Qualitative and quantitative expression of bovine bone mineral in experimental bone defects. Part 1: Description of a dog model and histological observations. *J Periodontol.* 2003 Aug; 74 (8):1143-52.
34. Artzi Z, Givol N, Rohrer MD, Nemcovsky CE, Prasad HS, Tal H. Qualitative and quantitative expression of bovine bone mineral in experimental bone defects. Part 2: Morphometric analysis. *J Periodontol.* 2003 Aug; 74(8):1153-60.
35. Traini T, Valentini P, Iezzi G, Piatelli A. A histologic and histomorphometric evaluation of anorganic bovine bone retrieved 9 years after a sinus augmentation procedure. *Journal of Periodontology*, 2007 May; 78(5): 955-61.
36. Galindo-Moreno P, Avila G, Fernandez-Barbero JE, Aguilar M, Sanchez-Fernandez E, Cutando A. Evaluation of sinus floor elevation using a composite bone graft mixture. *Clinical Oral Implants Research.* 2007 Jun; 18(3): 376-82.
37. Degidi M, Artese L, Rubini C, Perrotti V, Iezzi G, Piatelli A. Microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in sinus augmentation using Bio-Oss. *Oral Diseases.* 2006 Sep; 12(5): 469-75.
38. Scarano A, Degidi M, Iezzi G, Pecora G, Piatelli M, Orsini G. Maxillary sinus augmentation with different biomaterials: a comparative histologic and histomorphometric study in man. *Implant Dentistry.* 2006 Jun; 15(2): 197-207.
39. Warnke PH, Springer IN, Acil Y, Julga G, Wiltfang J, Ludwig K, Russo PAJ, Sherry E, Sivanathan S, Hedderich J, Terheyden H. The mechanical integrity of in vivo engineered heterotopic bone. *Biomaterials.* 2006 Mar; 27 (7): 1081-10.
40. Cordaro L, Bosshardt DD, Palattella P, Rao W, Serino G, Chiapasco M. Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumann Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicentre clinical trial. *Clinical Oral Implants Research.* 2008 Aug; 19(8): 796-803.

## ANEXO

Parecer favorável da Comissão de Ética da Universidade Estadual de Feira de Santana para o uso de animais para investigação científica neste trabalho.

Este trabalho é parte integrante do Projeto de Investigação: “Estudo de Comportamento Biológico de Novos Biomateriais como Arcabouço para a Regeneração de Defeitos Ósseos Críticos”. O estudo deste material tem a finalidade de constituir um controle positivo nos estudos de novos biomateriais por ser um biomaterial comercial com muitos estudos publicados e bons resultados clínicos.





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício: 07/2012

Feira de Santana, 21 de março de 2012

DE: Eraldo Medeiro Costa Neto  
Coordenador da CEUA/UEFS

PARA: Fabiana Paim Rosa

Prezada Senhora,

Estamos encaminhando a V.Sa. o parecer final do projeto de pesquisa intitulado "**Estudo do comportamento biológico de novos biomateriais como arcabouços para a regeneração de defeitos ósseos críticos**", de sua autoria, que foi submetido à análise pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UEFS), encaminhado a um parecerista e, por fim, aprovado em reunião. Diante do exposto, o parecer foi FAVORÁVEL para ser executado conforme metodologia proposta ao desenvolvimento da pesquisa.

Atenciosamente,

Prof. Eraldo Medeiros Costa Neto  
Coordenador em exercício da CEUA-UEFS

## PARECER

**Título: “Estudo do comportamento biológico de novos biomateriais como arcabouços para a regeneração de defeitos ósseos críticos”**

**Autores:** Coordenadora responsável Professora Dr<sup>a</sup> Fabiana Paim Rosa e colaboradores Dr. Aryon de Almeida Barbosa Junior, Dr. Raúl García Carrrodeguas, doutorandas: Ana Emilia Holanda Rolim e Eliana dos Santos Câmara Pereira e Lilian Souza Campos.//

### 1- DO PROJETO

O projeto de pesquisa de autoria da professora Dr<sup>a</sup>. Fabiana Paim Rosa e colaboradores têm por objetivos: analisar o comportamento biológico de biomateriais substitutos ósseos, como arcabouços para a regeneração óssea em defeitos críticos e analisar histologicamente, o efeito químico e mineralógico de arcabouços experimentais SiOss no reparo ósseo.//

Os procedimentos serão realizados na sala de experimentação do biotério da UEFS, em ambiente com temperatura de 20 a 22º graus centígrados e luminosidade controlada, com ciclos de 12 h claro e 12 h escuro. O modelo biológico escolhido foi ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Wistar albinus*, sendo em numero de 225 animais machos, adultos, entre 3 a 4 meses de idade, com peso corpóreo variando entre: 350 a 400g. O experimento esta previsto que os animais serão analisados com 15, 45 e 120 dias, sendo divididos em 3 lotes, cada lote será composto por 75 animais, subdivididos em 15 grupos com 5 animais por grupo. Cada caixa acomodará 05 animais, com livre acesso a alimentação e água. As caixas em polipropileno auto-clavável, nas dimensões de (300x193x126 mm), com grade zincada com separador em aço inox (300x109mm), contendo: cama forrada com maravilha de *pinus* auto-clavada e trocada diariamente, cocho para ração sólida Labina e garrafa com bico de inox para o fornecimento de água filtrada.//

O projeto possui suporte financeiro subsidiado pela própria instituição no valor de R\$ 40.000,00 (quarenta mil reais) conforme consta na planilha de orçamento.//

## 2- DA FOLHA ROSTO

Todos os itens que constam na folha rosto se encontram preenchidos adequadamente, bem como as assinaturas dos termos de compromisso e declarações dos responsáveis pelo experimento.//

## 3- DO PROTOCOLO

Os procedimentos experimentais estão bem detalhados no protocolo. A autora apresenta uma literatura consistente, quanto aos procedimentos para obtenção dos resultados, o que justifica o número elevado de animais.//

No item 11.2 (G e J) relacionado com o analgésico e anestésico, fica claro que os animais serão submetidos às drogas anestésicas e analgésicas por via intramuscular. Sendo as drogas: anestésica Dopalen (princípio ativo Cloridrato de quetamina) e analgésico pós-cirúrgico Anasedan (princípio ativo cloridrato de xilazina).//

O item 15 referente à eutanásia, o método por aprofundamento da anestesia me parece o menos traumático para os animais em virtude de que o procedimento além de rápido, causa perda total de sensação dolorosa e morte imediata.//

## PARECER FINAL

Ao analisar o projeto verifiquei que a pesquisa esta em consonância com a norma ética no uso de animais na experimentação. O objetivo proposto pela autora busca responder cientificamente, se as substâncias citadas têm potencial para serem utilizados como **regenerador de defeitos ósseos**. O projeto também vai gerar conhecimento, formando jovens pesquisadores na graduação, mestrado e doutorado, além de ser relevante e exequível. Pelo exposto, salvo melhor juízo sou **FAVORÁVEL** à execução do projeto.//

Feira de Santana, 26 de dezembro de 2011

IRACI GOMES BONFIM