



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA INTEGRADA**  
**MESTRADO EM ODONTOLOGIA INTEGRADA**

**ALESSANDRO GAVAZZONI**

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA CICATRIZAÇÃO DE DEFEITOS  
ÓSSEOS DE TAMANHO CRÍTICO EM CALVÁRIA DE RATOS USANDO  
SULFATO DE CÁLCIO COMO SUBSTITUTO ÓSSEO**

**MARINGÁ**  
**2014**

**ALESSANDRO GAVAZZONI**

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA CICATRIZAÇÃO DE DEFEITOS  
ÓSSEOS DE TAMANHO CRÍTICO EM CALVÁRIA DE RATOS USANDO  
SULFATO DE CÁLCIO COMO SUBSTITUTO ÓSSEO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos do Programa de Pós-graduação em Odontologia Integrada, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Liogi Iwaki Filho

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luzmarina Hernandes

**MARINGÁ  
2014**



**Universidade Estadual de Maringá**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada**

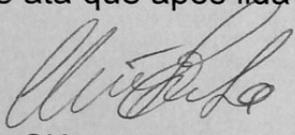


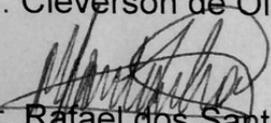
ATA Nº 048

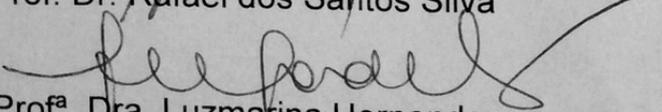
**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ALESSANDRO GAVAZZONI, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA INTEGRADA, DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ (UEM).**

Aos vinte e seis dias do mês de março do ano de dois mil e quatorze, às quatorze horas, na sala de Interpretação Radiológica, do Departamento de Odontologia da UEM, localizada na Avenida Mandacarú, 1550, reuniu-se a Banca Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. LIOGI IWAKI FILHO, do Departamento de Odontologia/Universidade Estadual de Maringá (UEM); Prof<sup>a</sup>. Dra. LUZMARINA HERNANDES, do Departamento de Ciências Morfológicas/Universidade Estadual de Maringá (UEM); Prof. Dr. RAFAEL DOS SANTOS SILVA, Departamento de Odontologia/Universidade Estadual de Maringá (UEM); e, Prof. Dr. CLÉVERSON DE OLIVEIRA E SILVA, Departamento de Odontologia/Universidade Estadual de Maringá (UEM), sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **Alessandro Gavazzoni**, intitulada: "AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA CICATRIZAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS DE TAMANHO CRÍTICO EM CALVÁRIA DE RATOS USANDO SULFATO DE CÁLCIO COMO SUBSTITUTO ÓSSEO". Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Banca Examinadora, tendo recebido o conceito final: Aprovado. O aluno, após a defesa, terá o prazo de 30 (trinta) dias para entregar à Secretaria do PGO: 7 (sete) exemplares corrigidos da dissertação de Mestrado; 1 CD contendo a Dissertação (formato Word e PDF) previamente corrigida e aprovada pelo orientador juntamente com os formulários utilizados para a pesquisa, o banco de dados da pesquisa (versão Word ou Excel); comprovação de aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa, quando pertinente; os artigos enviados para publicação ou em andamento (versão Word e PDF) gerados durante o mestrado; e, cópia da carta de submissão do artigo à publicação em periódico indexado em bancos de dados reconhecidos (LILACS, SCIELO, MEDLINE e ISI), referente à dissertação defendida. Nada mais havendo a relatar, a Banca Examinadora considera encerrados os trabalhos, lavrando a presente ata que após lida e apreciada, segue devidamente assinada.

Maringá, 26 de março de 2014.

  
Prof. Dr. Cléverson de Oliveira e Silva

  
Prof. Dr. Rafael dos Santos Silva

  
Profª. Dra. Luzmarina Hernandes

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à Deus que com Sua imensurável sabedoria, nos conduz a todas as experiências materiais, morais e intelectuais para que possamos evoluir e nos aproximarmos cada vez mais da Sua imagem e semelhança.

Ao Professor Doutor Liogi Iwaki Filho pela orientação, disponibilidade e por ter aceitado me orientar nesta jornada.

Ao Thiago Modolo Azevedo Martins pela ajuda no início dos trabalhos *in vitro* que foram importantíssimos para o direcionamento deste do início ao fim do trabalho, nas pesquisas e na elaboração dos testes laboratoriais.

Ao Bruno Viotto, Humberto Pasquinelli, Jonathan Ferezini e Marcelo A. Seron pela ajuda durante os procedimentos de cirurgia com os animais.

Às técnicas Maria Euride Carlos Cancino, Maria dos Anjos Moreira Fortunato e Maria Angela Moreira por todo apoio, ensinamento e orientações durante o procedimento de obtenção das lâminas. Sem a colaboração de vocês, este trabalho não seria possível.

Aos colegas de mestrado, em especial à Aline Gabriela Candido por me auxiliar nas fases iniciais dos cuidados com os animais e processamento histológico.

Ao meu filho João que nasceu durante o processo de execução deste trabalho e que com seu sorriso sempre revigorava minhas energias para prosseguir.

À minha esposa Alexandra, por ser uma mãe preocupada, cuidadosa e com dedicação excepcional ao nosso filho.

Aos meus pais, Ezio e Maria José pelo amor, dedicação e suporte que sempre demonstraram em todas as minhas escolhas, mesmo que muitas vezes somente em pensamento devido à distância.

Aos meus familiares, principalmente meu irmão (Marlus), minha cunhada (Adriana), meu afilhado (João Vitor) e sobrinha (Marina) pelos momentos que compartilhamos juntos.

À Sonia Maria Borean Borghi, secretária do Programa de Pós-graduação em Odontologia Integrada pela organização e orientações referentes ao processo de ensino do programa de mestrado.

Aos integrantes da banca pela disponibilidade de horário e compartilhar seus conhecimentos para a valorização do meu trabalho.

## **AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS**

À Universidade Estadual de Maringá, na pessoa do seu Magnífico Reitor Prof. Dr. Júlio Santiago Prates Filho.

Ao Departamento de Odontologia da Universidade Estadual de Maringá, na pessoa da Chefe, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marina Lourdes Calvo Fracasso.

Ao Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá, na pessoa da Chefe, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eneri Vieira de Souza Leite Mello.

À Pró-reitoria de Pós-graduação da Universidade Estadual de Maringá, na pessoa do Prof. Dr. Mauro Antonio da Silva Sá Ravagnani.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada, na pessoa das Coordenadoras, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Corrêa Pascotto e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mitsue Fujimaki.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Quero agradecer à Professora Luzmarina Hernandez por sua orientação no decorrer deste trabalho. A cada novo contato a Professora mostrava o quão dedicada, atenciosa, paciente e inteligente você é com seus alunos demonstrando que seu exemplo deveria ser seguido por todos que decidem se dedicar ao ensino, quer seja durante a pré-escola ou dentro das universidades. Muito obrigado por nossas conversas pois sempre procurou passar suas ideias de forma clara, humilde, buscando trabalhar com honestidade e muita qualidade. Muito obrigado!!

*“Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós!”*

*Francisco Cândido Xavier (Chico Xavier)*

## RESUMO

Os implantes osseointegráveis são uma alternativa de tratamento que necessita, dentre vários fatores, de uma quantidade adequada de tecido ósseo. Em casos de quantidade insuficiente podemos utilizar enxertos de diferentes materiais. Dentre eles podemos destacar os substitutos ósseos, como o sulfato de cálcio (SCa). O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel do SCa frente à regeneração óssea, em defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos. Foram utilizados 40 ratos *Wistar*, machos, com peso entre 180 e 200 g divididos em 2 grupos contendo 20 animais cada (teste – SCa; controle – *Bio-Oss*®). Posteriormente, cada um dos 2 grupos foram divididos em 4 outros baseado nos períodos de espera para cicatrização (15, 30, 45 e 60 dias) totalizando 8 sub-grupos (4 sub-grupo teste e 4 sub-grupo controle). Realizou-se defeito circular de 8 mm de diâmetro que foi preenchido com SCa (teste) ou osso bovino liofilizado – *Bio-Oss*® (controle) e recobertos por uma membrana de colágeno reabsorvível. Após o período de cicatrização os animais foram mortos, as amostras coletadas, fixadas, descalcificadas e submetidas ao processamento histológico para inclusão em parafina. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. Os defeitos preenchidos por SCa desenvolveram nucleações centrais, aos 15 dias de observação, não apresentaram resposta inflamatória importante e não desenvolveram fibrose. O SCa foi rapidamente reabsorvido e nenhum dos defeitos apresentou total regeneração ao final dos 60 dias de observação. Os defeitos preenchidos por *Bio-Oss*® apresentaram aos 15 dias formação óssea sobre a membrana de colágeno. Os grânulos de *Bio-Oss*® induziram osteocondução e ao final de 60 dias alguns defeitos apresentaram-se substituídos por osso. Concluimos que o SCa apresentou resultados piores do que o osso bovino liofilizado em termos de osso neoformado em todos os tempos de observação.

Palavras-chave: Sulfato de cálcio. Calvária. Xenoenxerto. Regeneração óssea.

## ABSTRACT

The dental implant is a bone-level dependent treatment that requires, among other factors, an adequate amount of bone tissue. In case of insufficient bone, grafts could be utilized to preserve/restore this bone using different materials. Among them, it is possible to highlight the bone substitutes, such as calcium sulfate (CS). The objective of this paper was to evaluate the CS material in critical-size bone defects in calvarial bone of rats. Forty Wistar rats (180 to 200 g), male, were divided into 2 groups. Each group was subdivided into 4 other based on the period of healing (15, 30, 45 and 60 days). In each animal a circular defect with 8 mm in diameter was made and filled with CS (test) or Bio-Oss® (control). In all animals the defect filled with the respective material was covered by resorbable collagen membrane. After the healing period, the animals were killed, samples were collected, fixed, decalcified and were embedding in paraffin. The sections were stained with hematoxylin and eosin stain. The defects filled with CS developed nucleation centers at 15 days of observation, showed no significant inflammatory response and they did not develop fibrosis. CS was quickly resorbed and none of the defects showed complete regeneration after 60 days of observation. The defects filled with Bio-Oss® showed bone formation at 15 days on collagen membrane. The granules of Bio-Oss® induced osteoconduction and after 60 days some defects presented bone replacement. We conclude that the CS had worse results in comparison with Bio-Oss® material in terms of new bone formation in all observation periods.

Keywords: Calcium sulfate. Skull. Heterografts. Bone regeneration.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Fotografia do procedimento cirúrgico nos animais para confecção de defeito de tamanho crítico na calvária de ratos *Wistar* ..... 19
- Figura 2 – Fotomicrografia de defeito de tamanho crítico preenchido com sulfato de cálcio na calvária de ratos *Wistar*, aos 15 dias de observação ..... 23
- Figura 3 – Fotomicrografia de defeito de tamanho crítico na calvária de ratos *Wistar* preenchidos com *Bio-Oss*® após o tempo de observação de 15 dias ..... 24
- Figura 4 – Fotomicrografia de defeito de tamanho crítico na calvária de ratos *Wistar* após o tempo de observação de 30 dias ..... 25
- Figura 5 – Fotomicrografia de defeito de tamanho crítico na calvária de ratos *Wistar* após 45 dias ..... 26
- Figura 6 – Fotomicrografia de defeito de tamanho crítico na calvária de ratos *Wistar* após 60 dias ..... 27

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\beta$	Beta
cm	Centímetro
g	Grama
°C	Graus Celsius
h	Hora
Kg	Quilograma
®	Marca registrada
$\mu\text{m}$	Micrômetro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
3.1. Procedimento experimental em animais .....	18
3.2. Estudo microscópico .....	20
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>21</b>
4.1. Observação macroscópica.....	21
4.2. Observação microscópica .....	21
4.2.1. <i>Tempo de observação de 15 dias</i> .....	21
4.2.2. <i>Tempo de observação de 30 dias</i> .....	24
4.2.3. <i>Tempo de observação de 45 dias</i> .....	25
4.2.4. <i>Tempo de observação de 60 dias</i> .....	26
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>33</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>41</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças bucais, dentre elas a perda dentária, são um problema de saúde pública devido a sua alta prevalência e incidência no mundo (PETERSEN, 2003; WENNSTRÖM *et al.*, 2013). Na Europa, aproximadamente metade da população adulta necessita de algum tipo de prótese dentária (ZITZMANN; HAGMANN; WEIGER, 2007). No Brasil, o levantamento mais recente mostrou que 68,8% dos adultos entre 35 a 44 anos perdeu pelo menos um elemento dentário. Quando se avalia os resultados em idades mais avançadas, dentro da faixa etária de 65 a 74 anos, a porcentagem de pessoas que necessitam de algum tipo de prótese aumenta para 92,7% (BRASIL, 2012).

Com a perda do elemento dentário ocorre a diminuição da quantidade disponível de osso na região do rebordo alveolar (ARAÚJO; LINDHE, 2005; VIGNOLETTI *et al.*, 2012) e, como consequência, diminui as taxas de sucesso do tratamento com implantes osseointegráveis (KHOJASTEH; MORAD; BEHNIA, 2013; PAGNI *et al.*, 2012; ROCHIETTA; FONTANA; SIMION, 2008). Na tentativa de intervir nesta situação, diversos materiais de enxerto são sugeridos para minimizar a atrofia do rebordo alveolar ou formar novo osso na região afetada (BARTEE, 2001; BECKER; HUJOEL; BECKER, 2002), dentre eles destaca-se o sulfato de cálcio (CHOY *et al.*, 2012; TSAI *et al.*, 2013; HOROWITZ; HOLTZCLAW; ROSEN, 2012). Entretanto, não existem trabalhos avaliando histologicamente a cicatrização do tecido ósseo quando se utiliza o sulfato de cálcio (SCa), na forma de gesso tipo II (AMERICAN NATIONAL STANDARDS INSTITUTE, 2000), como material de enxerto.

Neste contexto, o osso autógeno continua sendo considerado o “padrão ouro” para os enxertos ósseos devido às suas características osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras (KLIJN *et al.*, 2010a; KOLK *et al.*, 2012; SPIN-NETO *et al.*, 2013). Todavia, devido às limitações em termos de quantidade de osso disponível, maior morbidade, dor, desconforto aos pacientes e possível desvitalização dos dentes adjacentes à cirurgia (GALINDO-MORENO *et al.*, 2007; KAHNBERG; WALLSTROM; RASMUSSEN, 2011), procuram-se materiais alternativos que apresentem resultados clínicos aceitáveis (CORDADO *et al.*, 2008; FROUM *et al.*, 2006; KLIJN *et al.*, 2010b; NKENKE; STELZLE, 2009; SCHLEGEL *et al.*, 2006;

SCHLEGEL *et al.*, 2007) como o osso alógeno (SBORNE *et al.*, 2014; VISCIONNI *et al.*, 2010), enxerto xenógeno (ARAÚJO *et al.*, 2008; ARAÚJO; LINDER; LINDHE, 2011; CANEVA *et al.*, 2012) além dos substitutos ósseos, dentre os quais temos o SCa (ALGHAMDI, 2013; CHEN *et al.*, 2013; IEZZI *et al.*, 2007; MAZOR *et al.*, 2011).

O SCa é um material considerado biocompatível (PETERS *et al.*, 2006), reabsorvível (SCARANO *et al.*, 2007), pode auxiliar no controle da hemostasia (SCARANO *et al.*, 2012) e apresenta características osteocondutoras (THOMAS; PULEO, 2009). Ele foi avaliado na regeneração óssea guiada (KIM *et al.*, 2013), preservação de tecido ósseo (MACHTEI *et al.*, 2013), cirurgia paraendodôntica (APAYDIN; TORABINEJAD, 2004) além de ser utilizado em diversos modelos animais (ORSINI *et al.*, 2004; NAGATA *et al.*, 2010; CORTEZ *et al.*, 2012).

Os enxertos xenógenos, sendo o de origem bovina o mais conhecido, são biocompatíveis, osteocondutores e reabsorvidos pelo organismo (CALASANS-MAIA *et al.*, 2009; ACCORSI-MENDONÇA *et al.*, 2011). O osso bovino, assim como o SCa, não possui componente orgânico e grandes quantidades de material podem ser utilizados em defeitos de maior extensão (KOLK *et al.*, 2012; BEURLEIN; MCKEE, 2010).

Existem alguns estudos que demonstraram vantagens na utilização do SCa para o crescimento ósseo *in vivo*, sendo que uma delas seria promover o aumento da vascularização na região de defeito ósseo sugerindo, desta forma, um efeito positivo na angiogênese (STROCCHI *et al.*, 2002). Pode ainda, se ligar ao osso e após sua reabsorção guiar seu crescimento (COETZEE, 1980). Também foi constatado o aumento na concentração de BMP-2 (*Bone Morphogenetic Protein*), BMP-7, TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor*) e PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) quando o SCa foi empregado em defeitos medulares de osso femoral, concluindo que o SCa pode apresentar um papel biológico no processo de cicatrização (WALSH *et al.*, 2003). Além disso, o aumento nos níveis de cálcio extracelular ( $Ca^{+2}$ ), resultante da dissolução do SCa *in vitro*, pode ser percebido por receptores sensíveis presentes nos osteoblastos, estimulando a sua diferenciação (YAMAUCHI *et al.*, 2005).

Um estudo da bioatividade do SCa utilizando uma solução de fluido corpóreo simulado (SBF- *Simulated Body Fluid*) mostrou que este material, *in vitro*, possui uma intensa bioatividade, o que favoreceria o crescimento de tecido ósseo sobre sua

superfície (MARTINS *et al.*, 2013). Desta forma, este trabalho avaliou, por meio de estudo histológico qualitativo, a hipótese de que o SCa pode favorecer a regeneração óssea em defeitos ósseos de tamanho crítico, na calvária de ratos.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o papel do sulfato de cálcio frente à regeneração óssea, em defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos.

Como objetivos específicos temos:

1. Avaliar por meio de microscopia óptica a região do defeito ósseo preenchida com sulfato de cálcio;
2. Avaliar por meio de microscopia óptica o comportamento da membrana de colágeno reabsorvível em defeitos de tamanho crítico, preenchidos com sulfato de cálcio;
3. Comparar os resultados do sulfato de cálcio com àqueles obtidos a partir do *Bio-Oss*®.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Procedimento experimental em animais

Para este estudo foram utilizados 40 ratos da linhagem Wistar, machos, com peso variando entre 180 e 200g. Os animais foram divididos em 2 grupos denominados grupo teste (T) e grupo controle (C) contendo 20 animais cada. Dentro de cada grupo os animais foram sacrificados após 15, 30, 45 ou 60 dias de intervalo para que ocorresse a cicatrização (MORESCHI *et al.*, 2010). Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá (047/2013-CEEA).

Antes da tricotomia e do procedimento cirúrgico os ratos foram pesados e anestesiados com uma injeção intramuscular de uma solução 1:1 de Quetamina (Dopalen®, Sespo®, Paulínia, Brasil) e Xilazina (Rompun®, Bayer®, São Paulo, Brasil). Ambas as soluções na concentração de 1,0 mL.Kg<sup>-1</sup>. A antisepsia da região da cabeça do animal foi realizada com solução de iodo a 2% previamente à incisão (Riodine®, Rioquímica®, São José do Rio Preto, Brasil).

Uma incisão no sentido transversal de aproximadamente 4,5 cm de comprimento foi feita na região da calvária seguindo uma linha imaginária que une as bases das orelhas (Figura 1a). Posteriormente, a pele e periósteo foram rebatidos para a região anterior expondo o tecido ósseo subjacente. Um defeito de tamanho crítico de 8 mm de diâmetro (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; VAJGEL *et al.*, 2013) e profundidade total foi realizado na região da calvária com uma broca trefina (Neodent®, Curitiba, Brasil) (Figura 1b), específica para tecido ósseo adaptada a contra-ângulo cirúrgico (Micro Mega®, Besaçon, França) com velocidade controlada de 800 rpm sob irrigação abundante com soro fisiológico (LBS Laborasa, São Paulo, Brasil) (MORESCHI *et al.*, 2010).

O defeito no grupo teste (T) foi preenchido com sulfato de cálcio hemi-hidratado (Asfer®, São Caetano do Sul, Brasil) (Figura 1c), previamente descontaminado através do processo de esterilização usando o calor úmido em autoclave (Dabi-Atlante®, Ribeirão Preto, Brasil), manipulado, seguindo as recomendações do fabricante, na

proporção de 40 g de pó e 100 mL de soro fisiológico estéril (LBS Laborasa, São Paulo, Brasil). Para o grupo controle o defeito foi totalmente preenchido por osso bovino liofilizado (*Bio-Oss*®, Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça). Após o preenchimento completo da cavidade a região foi recoberta por membrana de colágeno reabsorvível de origem bovina (*GenDerm*®, *Baumer*®, Mogi Mirim, Brasil) em todos os animais. Após a colocação da membrana o tecido mole e periósteo foram reposicionados e suturados com fio de nylon 4.0 (*Shalon*®, *Sertix*®, Goiânia, Brasil) e procedeu-se a desinfecção da região com solução de iodo a 2% (*Riodine*®, *Rioquímica*®, São José do Rio Preto, Brasil) (Figura 1d).

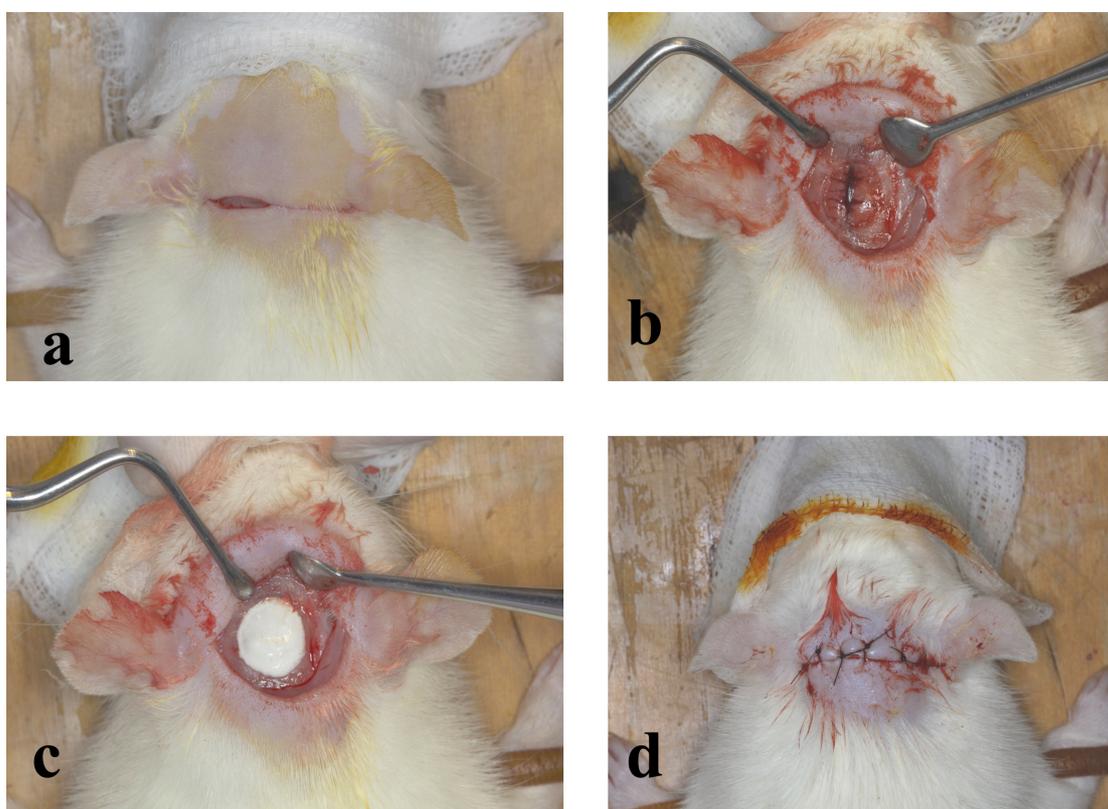


Figura 1 – Fotografia do procedimento cirúrgico nos animais para confecção de defeito de tamanho crítico na calvária de ratos *Wistar*. Em (a) incisão dos tecidos moles para promover acesso ao tecido ósseo. Em (b) tecido mole afastado mostrando o defeito de tamanho crítico de 8 mm de diâmetro. Em (c) imagem mostra defeito preenchido por sulfato de cálcio. Na imagem (d) a sutura foi realizada.

Os animais permaneceram em observação sob temperatura controlada até a completa recuperação da anestesia. Posteriormente, os mesmos foram colocados em caixas plásticas individuais e mantidos sob temperatura controlada ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ), com água e comida (*Nuvilab*®/*Nuvital*®, *Sogorb*®, São Paulo, Brasil) *ad libitum*, sob ciclo

claro/escuro de 12h.

Decorrido os períodos de cicatrização para cada subgrupo, os animais sofreram eutanásia utilizando uma dose equivalente ao triplo da dose anestésica (3,0 mL.Kg<sup>-1</sup> de solução 1:1 de Quetamina e Xilazina). Após a morte dos animais, amostras de tecido ósseo, com margem de segurança, contendo os defeitos, foram retirados e incluídos em paraformaldeído 4%, durante 48h. Decorrido este tempo, os materiais foram lavados e armazenados em álcool 70%.

Posteriormente, os tecidos fixados foram descalcificados em solução de Morse modificada (MORSE, 1945) que consiste de citrato de sódio a 20% e ácido fórmico a 50% por um período de 2 a 3 semanas. Após a descalcificação as amostras de calvária foram cortadas transversalmente, a partir da região central do defeito. A seguir foram processadas para inclusão em parafina.

### 3.2. Estudo microscópico

A análise microscópica foi realizada de forma descritiva utilizando-se cortes semi-seriados de 7 µm corados com Hematoxilina e Eosina.

As lâminas foram analisadas qualitativamente em microscópio óptico Nikon® (Eclipse 80i, Shimjuku, Japão) acoplado a uma câmera de alta resolução (Nikon® DS-Fi1c, Shimjuku, Japão). Foi utilizado programa para aquisição de imagem específico para a marca Nikon® (NIS-Elements versão 4.0, Praga, República Checa).

## 4 RESULTADOS

### 4.1. Observação macroscópica

Após o procedimento cirúrgico, os animais apresentaram boa recuperação. Não ocorreu a morte de nenhum animal. A sutura permaneceu em posição até aproximadamente o 10º dia sem a necessidade de intervenção para removê-la. Alguns animais desenvolveram edema nas primeiras 72 horas de pós-cirúrgico. Após este período a região apresentou aspecto de normalidade.

Após a morte dos animais, os blocos de tecido contendo os defeitos ósseos foram removidos com margem de segurança de aproximadamente 0,5 cm. Após a dissecação da pele, foi possível visualizar parcialmente a membrana de colágeno nos animais dos grupos de 15 e 30 dias. Nos grupo de 45 e 60 dias não foi possível visualizar a membrana macroscopicamente.

### 4.2. Observação microscópica

#### *4.2.1. Tempo de observação de 15 dias*

Os animais do grupo teste exibiram discreta língua de crescimento ósseo a partir das margens do defeito e um crescimento aposicional nas superfícies superior e inferior da tábua óssea remanescente (Figura 2a). Em alguns animais houve o desenvolvimento de osso nas áreas mais centrais do defeito (nucleações), independentemente das margens (Figura 2b).

Na microscopia, o sulfato de cálcio apresentou aspecto de grânulos esparsamente distribuídos no interior do defeito e também nas margens (Figura 2c), e em alguns casos foram observados acima da membrana de colágeno. Neste período de avaliação os grânulos apresentaram-se no interior de macrófagos ou na matriz extracelular. Não houve formação de cápsula fibrosa ao seu redor.

O tecido conjuntivo que preenchia o interior do defeito apresentou-se bastante celularizado e vascularizado (Figura 2d). Foram identificados fibroblastos, muitos macrófagos isolados ou na forma de células gigantes e neutrófilos, caracterizando uma inflamação leve e difusa em algumas áreas; especialmente acima da membrana de colágeno, observou-se um processo inflamatório mais intenso. Uma maior frequência de células com núcleos condensados, fortemente basofílicos eram observadas em áreas mais próximas ao material. Células em apoptose, especialmente macrófagos multinucleados, foram identificadas neste período (Figura 2e).

Houve deposição de fibras colágenas no tecido de reparo e a presença de vasos sanguíneos permeando os grânulos de sulfato de cálcio. Entretanto não havia sinais de fibrose. A membrana de colágeno encontrava-se em processo de reabsorção, infiltrada por polimorfonucleares (Figura 2f).

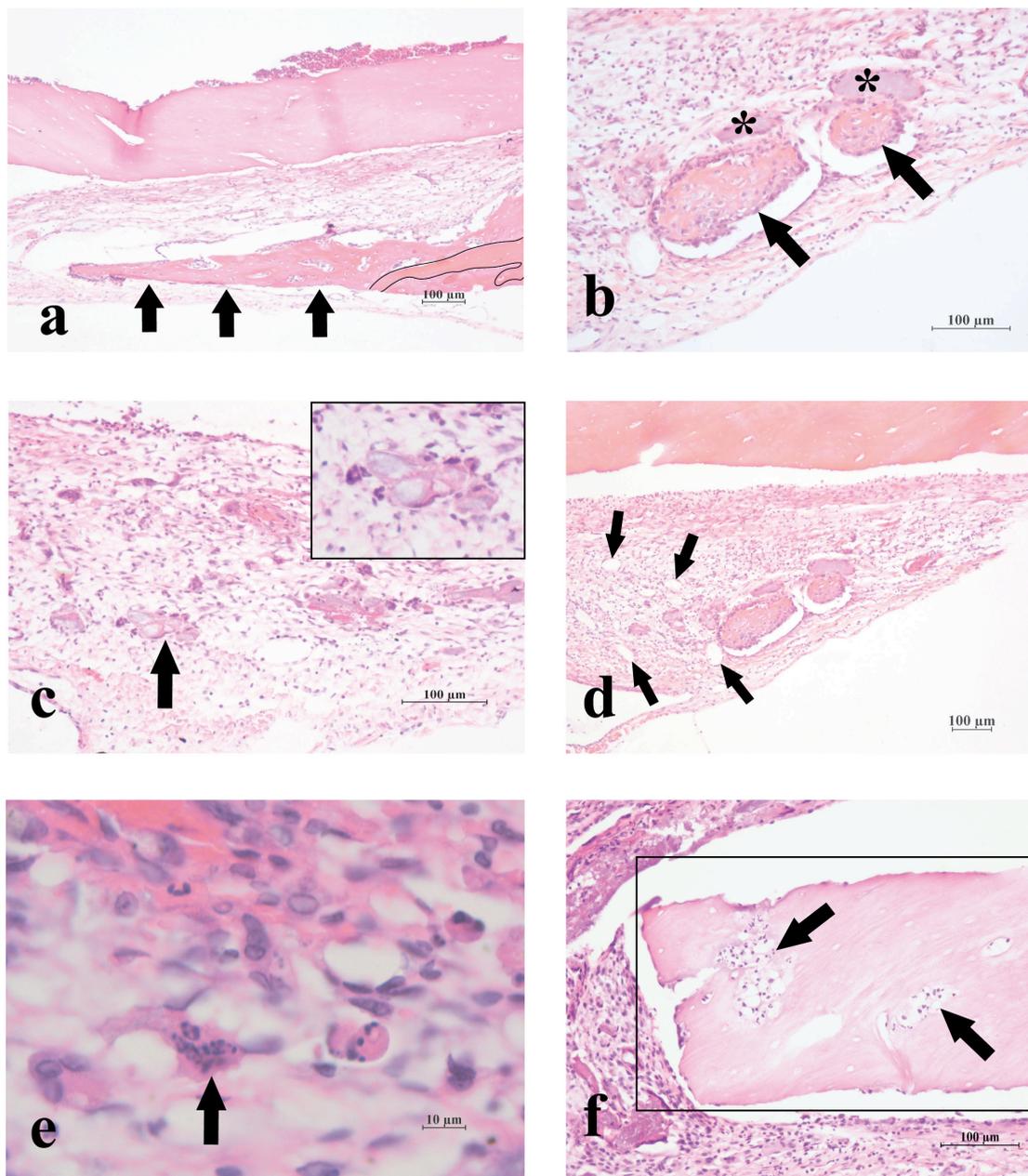


Figura 2 – Fotomicrografia de defeito de tamanho crítico preenchido com sulfato de cálcio na calvária de ratos *Wistar*, aos 15 dias de observação. Em (a) observar a língua de crescimento ósseo a partir das margens do defeito (setas) e presença de osso maduro na margem (área delimitada). Em (b) centro de nucleação (setas) no meio do defeito ao lado do sulfato de cálcio (\*). Em (c) a seta indica uma região onde ocorreu deposição de matriz óssea adjacente ao sulfato de cálcio. Na imagem acima e ao lado, detalhe da região indicada pela seta. Na imagem (d) pode-se notar presença de tecido bastante vascularizado (setas). Em (e) presença de núcleos apoptóticos. A imagem (f) mostra membrana de colágeno (delimitada pelo retângulo) sendo infiltrada por células inflamatórias (setas). Hematoxilina e Eosina.

No grupo controle, não houve fechamento do defeito ósseo em nenhum animal. Além disso, verificou-se uma organização do tecido conjuntivo ao redor dos grânulos de osso bovino liofilizado, com discreto infiltrado inflamatório e formação de tecido ósseo a partir das margens do defeito, em contato direto com o osso bovino (*Bio-Oss*®) (Figura 3a). Além disso, foi possível perceber o início da deposição de tecido ósseo em substituição à membrana de colágeno (Figura 3b).

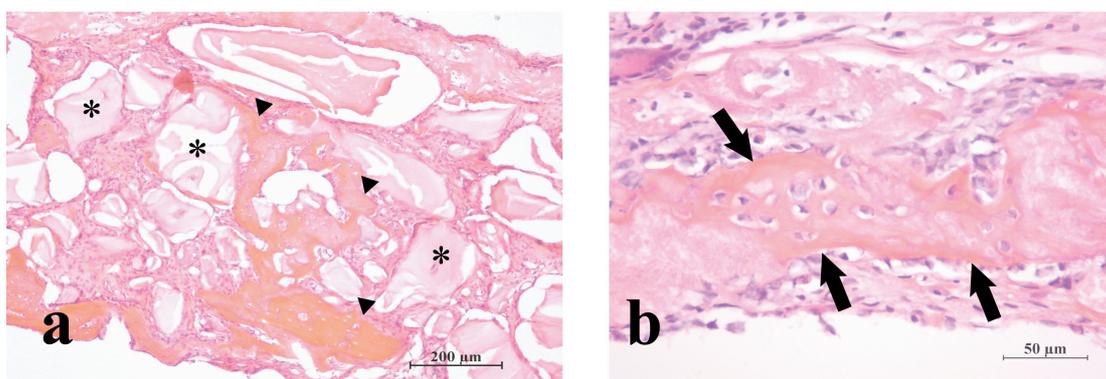


Figura 3 – Fotomicrografia de defeito de tamanho crítico na calvária de ratos *Wistar* preenchidos com *Bio-Oss* após o tempo de observação de 15 dias. Em (a) nota-se os grânulos do material (\*) e tecido neoformado em contato com os grânulos (cabeça de seta). Em (b) a membrana de colágeno foi substituída por tecido ósseo recém formado (setas). Hematoxilina e Eosina.

#### 4.2.2. Tempo de observação de 30 dias

Após 30 dias de observação os defeitos preenchidos com sulfato de cálcio exibiram o crescimento longitudinal, a partir das margens do defeito, e o crescimento aposicional, semelhante àquele dos 15 dias. Neste período, o desenvolvimento ósseo destacou-se pela maior quantidade de tecido ósseo substituindo a superfície interna da membrana de colágeno que apresentou-se ainda, infiltrada por pequeno número de células inflamatórias.

A região mais central do defeito apresentou-se preenchida por uma pequena quantidade de sulfato de cálcio mergulhado num tecido conjuntivo frouxo. Não houve

encapsulamento do material (Figura 4a). Próximo aos grânulos observou-se maior concentração de células mononucleadas (Figura 4a).

Os animais do grupo controle apresentaram a membrana de colágeno com elevado grau de reabsorção e um infiltrado celular caracterizado como leve a moderado. Neste grupo também houve deposição óssea sobre a membrana de colágeno. Parte dos grânulos de *Bio-Oss*® sofreu reabsorção parcial ou apresentou-se circunscritos por macrófagos (Figura 4b).

Entre os grânulos houve o predomínio de tecido fibroso. No tecido conjuntivo localizado sobre a superfície externa da membrana de colágeno observou-se uma quantidade importante de hemáceas. Não houve reparo do defeito em nenhum animal.

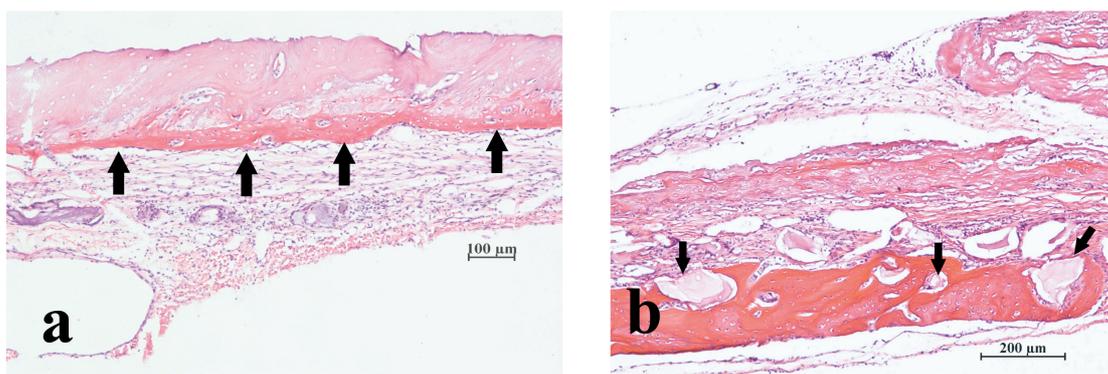


Figura 4 – Fotomicrografia de defeito de tamanho crítico na calvária de ratos *Wistar* após o tempo de observação de 30 dias. Na imagem (a) o defeito foi preenchido por sulfato de cálcio e observa-se a substituição da membrana por tecido ósseo (setas). Em (b) o defeito foi preenchido por *Bio-Oss*. Nesta imagem pode-se notar a presença de tecido ósseo ao redor dos grânulos do material (setas). Hematoxilina e Eosina.

#### 4.2.3. Tempo de observação de 45 dias

Aos 45 dias, a membrana de colágeno dos animais teste apresentou-se bem reabsorvida com menor formação de tecido ósseo sobre a membrana (principalmente na região externa, oposta ao defeito) em comparação com os animais do grupo controle, nos quais a membrana foi quase totalmente substituída por tecido ósseo (Figura 5a).

Neste período, o maior crescimento a partir das margens do defeito foi observado no grupo controle. Observou-se uma resposta inflamatória pouco importante em ambos os grupos e pequena quantidade de sulfato de cálcio no interior do defeito. No grupo controle, parte dos grânulos de *Bio-Oss*® apresentaram-se envolvidos por macrófagos e parte em processo de reabsorção. Não houve o completo reparo do defeito por tecido ósseo (Figura 5b).

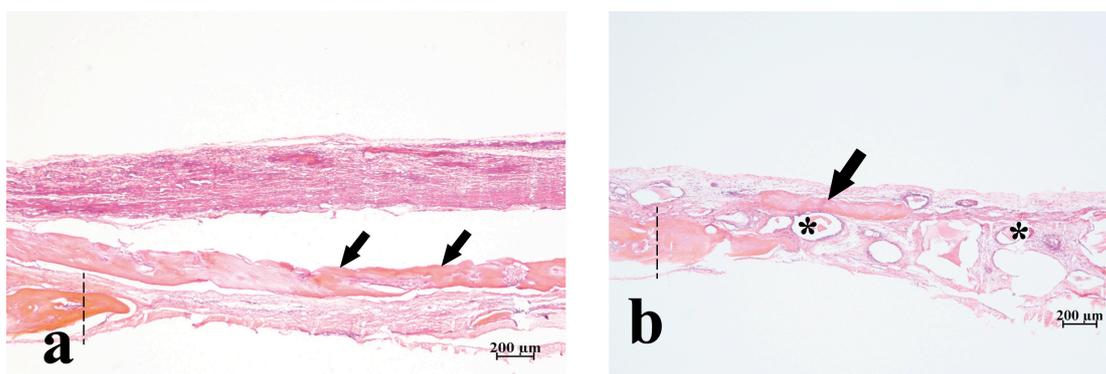


Figura 5 – Fotomicrografia de defeito de tamanho crítico na calvária de ratos *Wistar* após 45 dias. Em (a) o defeito foi preenchido por sulfato de cálcio e pode-se notar a formação de tecido ósseo a partir da margem (limite entre osso maduro e novo osso marcado por linha vertical tracejada), além da substituição da membrana por osso (setas). Em (b) o defeito foi preenchido por *Bio-Oss* (\*) mostrando a membrana de colágeno sendo substituída por tecido ósseo (seta). Hematoxilina e Eosina.

#### 4.2.4. Tempo de observação de 60 dias

Aos 60 dias de observação, o SCa foi quase completamente reabsorvido. As partículas remanescentes encontravam-se envolvidas por células fagocitárias. O defeito foi então preenchido por um tecido conjuntivo frouxo na sua maioria, mas com algumas áreas fibróticas. Este grupo apresentou pouca ou nenhuma formação óssea a partir do osso pré-existente. Aqueles animais nos quais houve osteogênese, o tecido se desenvolveu no interior e/ou sobre a membrana de colágeno. Neste período, aparentemente, houve menor formação óssea, em comparação com os defeitos preenchidos com o osso bovino liofilizado. Neste período de observação, nenhum defeito encontrava-se preenchido por tecido ósseo (Figura 6a).

Em comparação com os defeitos preenchidos com sulfato de cálcio, no grupo controle houve maior crescimento de osso para o interior do defeito, a partir das margens. Houve também evidente formação óssea por osteocondução, em direção aos grânulos de *Bio-Oss*®. Abundante osteogênese foi observada em substituição à maior parte da membrana de colágeno; nas regiões onde a membrana foi reabsorvida e não ocorreu formação de tecido ósseo, ela foi substituída por tecido conjuntivo frouxo. Neste grupo alguns animais apresentaram fechamento completo do defeito por tecido ósseo (Figura 6b).

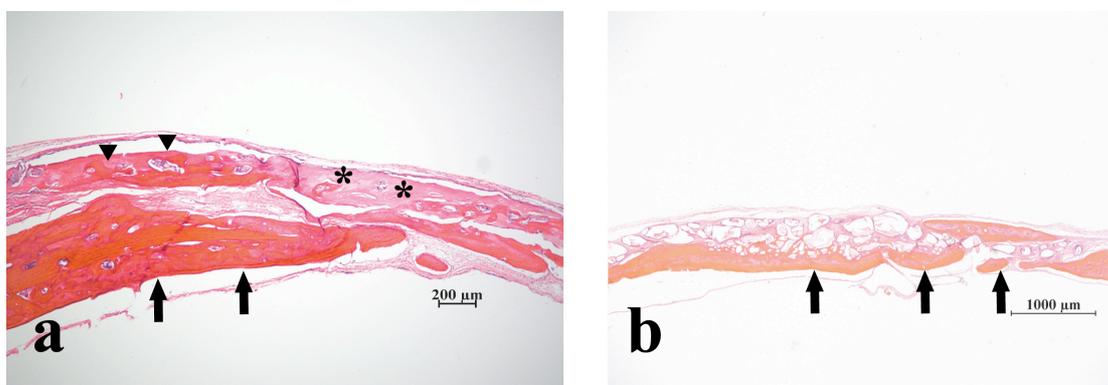


Figura 6 – Fotomicrografia de defeito de tamanho crítico na calvária de ratos *Wistar* após 60 dias. Em (a) o defeito foi preenchido por sulfato de cálcio e nota-se a membrana de colágeno (\*) parcialmente substituída por tecido ósseo (cabeça de seta) além de formação de tecido ósseo a partir das margens do defeito (setas). Em (b) o defeito foi preenchido por *Bio-Oss* e se apresentou quase completamente regenerado, com tecido ósseo formado a partir das margens do defeito (setas). Hematoxilina e Eosina.

## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo, o SCa foi empregado como material de enxerto em um defeito ósseo de tamanho crítico realizado na calvária de ratos, e seu papel frente ao reparo ósseo foi avaliado, do ponto de vista morfológico. Como biomaterial controle foi utilizado o *Bio-Oss*® (ACCORSI-MENDONÇA *et al.*, 2008), que consiste de uma matriz óssea mineralizada, de origem bovina, obtida pela remoção da porção orgânica por meio de tratamento térmico, a 300 °C (THALLER *et al.*, 1994). Por sua reconhecida ação osteocondutora, o *Bio-Oss*® é muito empregado em procedimentos regenerativos, de forma geral. (CARMAGNOLA *et al.*, 2003; BERGLUNDH; LINDHE, 1997; SHIN *et al.*, 2004).

Embora o resultado clínico dos xenoenxertos inorgânicos tenha sido confirmado e amplamente aceito por profissionais e pacientes (CARMAGNOLA *et al.*, 2003; ZITZMANN *et al.*, 2001), eles apresentam desvantagens como seu alto preço, processo de fabricação demorado, além dos aspectos éticos envolvidos com o uso de animais para sua obtenção (AMIRFEYZ; STALENY, 2011; MELLOR; LITTIN, 2004; YANG; SYKES, 2007). Por esta razão, têm-se procurado um substituto ósseo seguro, efetivo, aceito eticamente, de baixo custo e sustentável para ser utilizado em procedimentos regenerativos (ZHANG *et al.*, 2012).

O SCa (gesso tipo II) utilizado neste estudo é usualmente empregado na Odontologia para a confecção de modelos de estudo. Normalmente não é empregado em procedimentos cirúrgicos. Entretanto, quando analisado *in vitro*, num meio de Fluido Corpóreo Simulado - SBF (*Simulated Body Fluid*) mostrou um aspecto de bioatividade muito intensa pois ocorreu sua reabsorção e a formação de grande quantidade de apatita em sua superfície (MARTINS *et al.*, 2013). A formação de apatita sobre a superfície do material, na presença do SBF, é uma condição essencial para que ocorra sua ligação com o tecido ósseo vivo (KOKUBO e TAKADAMA, 2006).

Além do teste de bioatividade, o SCa mostrou bons resultados para outros testes *in vitro*, como o teste de compressão e análise dos valores de pH em diferentes fluidos. A avaliação por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) confirmou a formação de apatita na superfície do SCa após a imersão por 8 dias no SBF (MARTINS *et al.*, 2013).

Quando o sulfato de cálcio é usado como material de enxerto, o mecanismo de reabsorção é químico e o material é convertido em íons (cálcio e sulfato). Acredita-se

que o potencial osteocondutor do SCa seja devido à sua capacidade de se dissolver rapidamente e se converter em depósitos de fosfato de cálcio (FCa), uma apatita biológica, que aparece quando os íons cálcio são liberados do SCa para reagir com os fluídos corpóreos e funcionando, provavelmente, como uma matriz osteocondutora para o osso em crescimento (DASMAH *et al.*, 2012).

Ricci *et al.* (2000) demonstraram que além do processo de conversão do SCa, existem alguns depósitos que não foram convertidos e podem se incorporar ao osso recém formado, caracterizando uma ação osteocondutora do SCa propriamente dito.

No presente estudo, os testes *in vivo* demonstraram que o SCa, na forma de gesso tipo II, foi biocompatível, favoreceu o desenvolvimento de vasos sanguíneos no local do enxerto e não induziu resposta inflamatória importante. Entretanto nos defeitos preenchidos pelo SCa, a regeneração óssea se deu em menor quantidade em comparação com àqueles preenchidos por *Bio-Oss*®. No material analisado não foram encontrados sinais de atividade osteocondutora. Alguns animais apresentaram nucleações ósseas na face dural do perióstio, em localização central, desvinculada das margens ósseas. Essas pequenas formações ósseas podem representar um indício de estimulação da atividade osteogênica pelo SCa.

Quando se analisa as imagens verificou-se que existe pequena quantidade de sulfato de cálcio na região do defeito e as partículas que estão presentes apresentam-se “espalhadas” em seu interior, acima do osso maduro e até para fora do defeito. Estes resultados podem ser explicados (i) pelo fato do material ter sido colocado na forma de pasta proporcionando um tempo de presa elevado devido à contaminação por proteínas e macromoléculas presentes no tecido que levaram a hidratação excessiva do material *in situ* (RICCI *et al.*, 2000). (ii) Como consequência, este fato provocou uma taxa maior de reabsorção ativa (fagocitose) e reabsorção passiva (dissolução e/ou hidrólise) do sulfato de cálcio (HEIJNEN; HARTMAN, 1991; BOHNER, 2004; KUTKUT *et al.*, 2012; ZIMA *et al.*, 2012), provocando sua remoção do local do defeito prematuramente.

Como consequência da elevada taxa de reabsorção do material, os resultados *in vivo* não puderam confirmar os resultados observados *in vitro*. Aos 15 dias de observação muitos grânulos eram fagocitados por macrófagos e aos 30 dias de observação havia pouca quantidade de material preenchendo o defeito. Nos períodos subsequentes, quantidades mínimas de SCa eram visualizados.

De acordo com Al Ruhaimi (2000), o SCa não deve ser usado isoladamente como um material de preenchimento ósseo. O rápido índice de dissolução do material

faz com que a cavidade óssea se esvazie em um período de tempo menor do que aquele necessário para que o crescimento ósseo ocorra, o que resulta em crescimento inadequado de osso neoformado para os espaços que eram ocupados pelo material reabsorvido, o que explicaria o resultado encontrado na análise histológica.

Neste trabalho, foi utilizado o defeito de tamanho crítico em calvária de ratos Wistar que é um modelo bem estabelecido para o estudo do reparo ósseo (MORESCHI *et al.*, 2010, VERNA *et al.*, 2002, KOCHI *et al.*, 2010). O defeito de tamanho crítico pode ser definido como o defeito ósseo criado em determinada espécie que não cicatriza espontaneamente durante a vida do animal (HOLINGER; KLEINSCHMIDT, 1990). Sua localização na calvária possui algumas vantagens como o osso do crânio ser biologicamente inerte (PROLO *et al.*, 1984), permitir dimensões padronizadas dos defeitos, acesso cirúrgico adequado e suporte para a implantação de biomateriais pela presença da dura-mater e várias camadas de tecido para proteção (GOMES; FERNANDES, 2011). Entretanto, é importante ressaltar que este modelo animal possui algumas desvantagens como não permitir a análise da cicatrização óssea em condições fisiológicas ou de carga biomecânica além da limitada quantidade de tecido ósseo neoformado disponível para avaliação histológica, principalmente durante as fases iniciais do processo cicatricial (VAJGEL *et al.*, 2013).

Uma possível explicação para que os defeitos críticos não cicatrizem espontaneamente durante a vida do animal baseia-se na angiogênese capilar. Nos defeitos críticos ocorre a formação de capilares sanguíneos nas margens do defeito sem, no entanto, que exista a comunicação da rede de capilar de um lado do defeito com o outro lado. Quando se compara a angiogênese de defeitos não-críticos, a rede de capilares se forma com anastomoses entre os capilares de um lado e os do outro lado. Acredita-se que a formação da rede de capilares seja a chave para entender as diferenças da regeneração do osso entre defeitos de tamanho crítico e não-crítico (UDAGAWA *et al.*, 2012).

Devido às características físicas dos dois materiais utilizados no presente estudo (SCa e *Bio-Oss*®), os defeitos ósseos foram associados ao uso de membrana de colágeno reabsorvível. A função da membrana foi baseada na suposição de que ela iria favorecer a regeneração óssea, dificultando a ocupação do defeito por tecido conjuntivo cicatricial (NYMAN *et al.*, 1980; TAGA *et al.*, 2008). O uso das membranas, independente de sua classificação (MURPHY; GUNSOLLEY, 2003), quando utilizadas isoladamente (BARTEE, 2001; LEKOVIC *et al.*, 1998), ou em conjunto com os

substitutos ósseos (BARONE *et al.*, 2008; IASELLA *et al.*, 2003), apresentam resultados positivos.

Quando se emprega materiais de enxerto particulado é interessante usar uma membrana que funcione como barreira cobrindo o local da osteotomia prevenindo, desta forma, a dispersão das partículas e a estabilização do material (YAZDI *et al.*, 2013). Pelo fato das membranas biodegradáveis serem feitas de materiais menos rígidos, a adição de um material de preenchimento parece dificultar o colapso da membrana e mantém o espaço abaixo deles para a formação de coágulo e regeneração óssea (ZITZMANN; NAEF; SCHÄRER, 1997).

Neste estudo constatou-se que embora o SCa tenha sido reabsorvido mais rapidamente do que o *Bio-Oss*®, não houve o colapso da membrana para o interior do defeito. A análise histológica das membranas destacou-se, por outro lado, pelo desenvolvimento de tecido ósseo em substituição à membrana, em ambos os grupos, especialmente nos períodos de 45 e 60 dias, sendo que neste último tempo, o tecido ósseo substituiu a membrana em praticamente toda a sua extensão. Este resultado demonstrou a alta biocompatibilidade e sugeriu que ela possui uma atividade osteocondutora (TAGA *et al.*, 2008). Este padrão de crescimento ósseo substituindo a membrana e sem relação direta com o material utilizado como enxerto já foi relatado em outros estudos (LUNDGREN *et al.*, 1999, 2000; ROMPEN *et al.*, 1999; STAVROPOULOS *et al.*, 2001).

Ao se observar os resultados positivos do SCa *in vitro*, suas características biocompatíveis e os estudos que demonstram sua atividade osteocondutora, faz-se necessário mais estudos com o SCa alterando sua forma de inserção e manipulação, além da possibilidade de associá-lo com outros materiais para minimizar a sua solubilidade, promovendo seu contato com o tecido por tempo prolongado, com a finalidade de melhorar os resultados do SCa.

## 6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados deste estudo podemos concluir que:

1. O melhor resultado para os defeitos preenchidos com SCa foram aos 15 dias quando se observou o desenvolvimento de nucleações ósseas. A partir de 30 dias de observação os defeitos preenchidos com SCa tiveram menor crescimento ósseo se comparado ao *Bio-Oss*®.
2. A membrana de colágeno colocada sobre os defeitos favoreceu o crescimento ósseo em ambos os grupos de estudo.
3. O sulfato de cálcio foi reabsorvido mais rapidamente e seu comportamento quanto a regeneração óssea em defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos foi menos favorável se comparado ao *Bio-Oss*®.

REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

ACCORSI-MENDONÇA, T. et al. Physicochemical characterization of two deproteinized bovine xenografts. **Braz Oral Res**, v. 22, n. 1, p. 5-10, 2008.

ACCORSI-MENDONÇA, T. et al. Biological monitoring of a xenomaterial for grafting: an evaluation in critical-size calvarial defects. **J Mater Sci Mater Med**, v. 22, p. 997-1004, 2011.

AL RUHAIMI, K. A. Effect of adding resorbable calcium sulfate to grafting materials on early bone regeneration in osseous defects in rabbits. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 15, p. 859-864, 2000.

ALGHAMDI, A. S. T. Osteotome maxillary sinus lift using bovine bone and calcium sulfate: a case series. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 15, p. 153-159, 2013.

AMERICAN NATIONAL STANDARDS INSTITUTE. American Dental Association Specification No. 25. **Dental gypsum products**. New York, 2000. p. 244-253.

AMIRFEYZ, R.; STALENY, D. Allograft-prosthesis composite reconstruction for the management of failed elbow replacement with massive structural bone loss: a medium-term follow-up. **J Bone Joint Surg Br**, v. 93, p. 1382-1388, 2011.

APAYDIN, E. S.; TORABINEJAD, M. The effect of calcium sulfate on hard-tissue healing after periradicular surgery. **J Endod**, v. 30, p. 17-20, 2004.

ARAÚJO, M. G.; LINDER, E.; LINDHE, J. Bio-Oss<sup>®</sup> Collagen in the buccal gap at immediate implants: a 6-months study in the dog. **Clin Oral Implants Res**, v. 22, p. 1-8, 2011.

ARAÚJO, M. G.; LINDHE, J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. **J Clin Periodontol**, v. 32, p. 212-218, 2005.

ARAÚJO, M. et al. The influence of Bio-Oss<sup>®</sup> Collagen on healing of an extraction socket: an experimental study in the dog. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 28, p. 123-135, 2008.

BARONE, A. et al. Xenograft versus extraction alone for ridge preservation after tooth removal: a clinical and histomorphometric study. **J Periodontol**, v. 79, p. 1370-1377, 2008.

BARTEE, B. K. Extraction site reconstruction for alveolar ridge preservation. Part 1: rationale and materials selection. **J Oral Implantol**, v. 27, p. 187-193, 2001.

---

<sup>1</sup> Formatação seguindo as Normas da ABNT NBR 6023:2002.

- BECKER, W.; HUJOEL, P.; BECKER, B. E. Effect of barrier membranes and autologous bone grafts on ridge width preservation around implants. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 4, p. 143-149, 2002.
- BERGLUNDH, T.; LINDHE, J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss<sup>®</sup>. An experimental study in the dog. **Clin Oral Implants Res**, v. 8, p. 117-124, 1997.
- BEURLEIN, M. J. S.; MCKEE, M. D. Calcium sulfates: What is the evidence? **J Orthop Trauma**, v. 24(suppl 1), p. S46-51, 2010.
- BOHNER, M. New hydraulic cements based on  $\alpha$ -tricalcium phosphate-calcium sulfate dihydrate mixtures. **Biomaterials**, v. 25, p. 741-749, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais**. Brasília, DF, 2012. 116 p.: il.
- CALASANS-MAIA, M. D. et al. Avaliação histológica comparativa de reparo ósseo em tibia de coelho tratada com xenoenxertos. **Acta Ortop Bras**, v. 17, p. 340-343, 2009.
- CANEVA, M. et al. Deproteinized bovine mineral in marginal defects at implants installed immediately into extraction sockets: an experimental study in dogs. **Clin Oral Implants Res**, v. 23, p. 106-112, 2012.
- CARMAGNOLA, D.; ADRIAENS, P.; BERGLUNDH, T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss<sup>®</sup>. **Clin Oral Implants Res**, v. 14, p. 137-143, 2003.
- CHEN, Z. et al. Improved workability of injectable calcium sulfate bone cement by regulation of self-setting properties. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 33, p. 1048-1053, 2013.
- CHOY, W. et al. Treatment for hand enchondroma with curettage and calcium sulfate pellet (OsteoSet<sup>®</sup>) grafting. **Eur J Orthop Surg Traumatol**, v. 22, p. 295-299, 2012.
- COETZEE, A. S. Regeneration of bone in the presence of calcium sulfate. **Arch Otolaryngol**, v. 106, p. 405-409, 1980.
- CORDADO, L. et al. Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumann Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. **Clin Oral Implants Res**, v. 19, p. 796-803, 2008.
- CORTEZ, P. P. et al. A glass-reinforced hydroxyapatite and surgical-grade calcium sulfate for bone regeneration: In vivo biological behavior in a sheep model. **J Biomater Appl**, v. 27, p. 201-217, 2012.

- DASMAH, A. et al. A clinical and histological case series study on calcium sulfate for maxillary sinus floor augmentation and delayed placement of dental implants. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 14, n. 2, p. 259-265, 2012.
- FROUM, S. J. et al. Comparison of mineralized cancellous bone allograft (Puros) and anorganic bovine bone matrix (Bio-Oss) for sinus augmentation: histomorphometry at 26 to 32 weeks after grafting. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 26, p. 543-551, 2006.
- GALINDO-MORENO, P. et al. Evaluation of sinus floor elevation using a composite bone graft mixture. **Clin Oral Implants Res**, v. 18, p. 376-382, 2007.
- GOMES, P. S.; FERNANDES, M. H. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. **Lab Anim**, v. 45, p. 14-24, 2011.
- HEIJNEN, W.; HARTMAN, P. Structural morphology of gypsum ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) and pharmacolite ( $\text{CaHA} \cdot \text{sO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). **J Cryst Growth**, v. 108, p. 290-300, 1991.
- HOLLINGER, J. O.; KLEINSCHMIDT, J. C. The critical size defects as an experimental model to test bone repair materials. **J Craniofac Surg**, v. 2, p. 237-243, 1990.
- HOROWITZ, R.; HOLTZCLAW, D.; ROSEN, P. S. A review on alveolar ridge preservation following tooth extraction. **J Evid Based Dent Pract**, v. 12, p. 149-160, 2012.
- IASELLA, J. M. et al. Ridge preservation with freeze-dried bone allograft and a collagen membrane compared to extraction alone for implant site development: a clinical and histologic study in humans. **J Periodontol**, v. 74, p. 990-999, 2003.
- IEZZI, G. et al. Histologic evaluation of provisional implant retrieved from man 7 months after placement in a sinus augmentation with calcium sulfate: a case report. **J Oral Implantol**, v. 33, p. 89-95, 2007.
- KAHNBERG, K. E.; WALLSTROM, M.; RASMUSSEN, L. Local sinus lift for single-tooth implant. I. Clinical and radiographic follow-up. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 13, p. 231-237, 2011.
- KHOJASTEH, A.; MORAD, G.; BEHNIA, H. Clinical importance of recipient site characteristics for vertical ridge augmentation: A systematic review of literature and proposal of a classification. **J Oral Implantol**, v. 39, p. 386-398, 2013.
- KIM, Y. et al. Guided bone regeneration using demineralized allogenic bone matrix with calcium sulfate: case series. **J Adv Prosthodont**, v. 5, p. 167-171, 2013.

KLIJN, R. J. et al. A meta-analysis of histomorphometric results and graft healing time of various biomaterials compared to autologous bone used as sinus floor augmentation material in humans. **Tissue Eng Part B Rev**, v. 16, p. 493-507, 2010a.

KLIJN, R. J. et al. Sinus floor augmentation surgery using autologous bone grafts from various donor sites: a meta-analysis of the total bone volume. **Tissue Eng Part B Rev**, v. 16, p. 295-303, 2010b.

KOCHI, G. et al. A comparative study of microfocus CT and histomorphometry in the evaluation of bone augmentation in rat calvarium. **J Oral Sci**, v. 52, p. 203-211, 2010.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, v. 27, n. 15, p. 2907-2915, 2006.

KOLK, A. et al. Current trends and future perspectives of bone substitute materials – From space holders to innovative biomaterials. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 40, p. 706-718, 2012.

KUTKUT, A. et al. Extraction socket preservation graft before implant placement with calcium sulfate hemihydrate and platelet-rich plasma: a clinical and histomorphometric study in humans. **J Periodontol**, v. 83, p. 401-409, 2012.

LEKOVIC, V. et al. Preservation of alveolar bone in extraction sockets using bioabsorbable membranes. **J Periodontol**, v. 69, p. 1044-1049, 1998.

LUNDGREN, A. K. et al. Influence of decortication of the donor bone on guided bone augmentation. An experimental study in the rabbit skull bone. **Clin Oral Implants Res**, v. 11, p. 99-106, 2000.

LUNDGREN, A. K. et al. Influence of surface roughness of barrier walls on guided bone augmentation: experimental study in rabbits. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 1, p. 41-48, 1999.

MACHTEI, E. E. et al. Bone preservation in dehiscence-type defects using composite Biphasic Calcium Sulfate plus Biphasic Hydroxyapatite/ $\beta$ -Tricalcium Phosphate graft: A histomorphometric case series in canine mandible. **Implant Dent**, v. 22, p. 590-595, 2013.

MARTINS, T. M. A. et al. Análise das propriedades físico-químicas e da bioatividade do sulfato de cálcio misturado com diferentes soluções. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, 2013. 40 p.

MAZOR, Z. et al. Bone repair in periodontal defect using a composite of allograft and calcium sulfate (dentogen) and a calcium sulfate barrier. **J Oral Implantol**, v. 37, p. 287-292, 2011.

MELLOR, D. J.; LITTIN, K. E. Using Science to support ethical decisions promoting humane livestock slaughter and vertebrate pest control. **Anim Welf**, v. 13, p. S127-132, 2004.

MORESCHI, E. et al. Effect of dolomite on the repair of bone defects in rats: histological study. **Histol Histopathol**, v. 25, p. 1547-1556, 2010.

MORSE, M. Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectioning in paraffin. **J Dent Res**, v. 24, p. 143-153, 1945.

MURPHY, K. G.; GUNSOLLEY, J. C. Guided tissue regeneration for the treatment of periodontal intrabony and furcation defects. A systematic review. **Ann Periodontol**, v. 8, p. 266-302, 2003.

NAGATA, M. J. H. et al. Bone healing in critical-size defects treated with new bioactive glass/calcium sulfate: A histologic and histometric study in rat calvaria. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 95, p. 269-275, 2010.

NKENKE, E.; STELZLE, F. Clinical outcomes of sinus floor augmentation for implant placement using autogenous bone or bone substitutes: a systematic review. **Clin Oral Implants Res**, v. 20 (suppl. 4), p. 124-133, 2009.

NYMAN, S. et al. Healing following implantation of periodontitis affected roots into gingival connective tissue. **J Clin Periodontol**, v. 7, p. 394-401, 1980.

ORSINI, G. et al. Bone-defect healing with calcium-sulfate particles and cement: An experimental study in rabbit. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 68, p. 199-208, 2004.

PAGNI, G. et al. Postextraction alveolar ridge preservation: biological basis and treatments. **Int J Dent**, 2012. doi: 10.1155/2012/151030.

PETERS, C. L. et al. Biological effects of calcium sulfate as a bone graft substitute in ovine metaphyseal defects. **J Biomed Mater Res A**, v. 76, n. 3, p. 456-462, 2006.

PETERSEN, P. E. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21<sup>st</sup> century-the approach of the WHO Global Oral Health Programme. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 31, p. 3-23, 2003.

PROLO, D. J. et al. Critical utility of allogeneic skull discs in human craniotomy. **Neurosurgery**, v. 14, p. 183-186, 1984.

RICCI, J. L. et al. Biological mechanisms of calcium-sulfate replacement by bone. In: DAVIES, J. E. (Ed.). **Bone Engineering**. Toronto: [s.n.], 2000. p. 332-334.

ROCCHIETTA, I.; FONTANA, F.; SIMION, M. Clinical outcomes of vertical bone augmentation to enable dental implant placement: a systematic review. **J Clin Periodontol**, v. 35, p. 203-215, 2008.

- ROMPEN, E. H. et al. The influence of cortical perforations and of space filling with peripheral blood on the kinetics of guided bone regeneration. **Clin Oral Implant Res**, v. 10, p. 85-94, 1999.
- SBORNE, C. et al. Volumetric changes after sinus augmentation using blocks of autogenous iliac bone or freeze-dried allogeneic bone. A non-randomized study. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 42, p. 113-118, 2014.
- SCARANO, A. et al. Hemostasis control in endodontic surgery: A comparative study of calcium sulfate versus gauzes and versus ferric sulfate. **J Endod**, v. 38, p. 20-23, 2012.
- SCARANO, A. et al. Peri-implant bone regeneration with calcium sulfate: A light and transmission electron microscopy case report. **Impl Dent**, v. 16, p. 195-203, 2007.
- SCHLEGEL, K. A. et al. Changes of mineralization of free autogenous bone grafts used for sinus floor elevation. **Clin Oral Implants Res**, v. 17, p. 673-678, 2006.
- SCHLEGEL, K. A. et al. Sinus floor elevation using autogenous bone or bone substitute combined with platelet-rich plasma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Rad Endod**, v. 104, p. e15-25, 2007. doi: 10.1016/j.tripleo.2007.04.021.
- SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clin Orthop Relat Res**, v. 205, p. 299-308, 1986.
- SHIN, J. W. et al. In vitro study of osteogenic differentiation of bone marrows stromal cells on heat-treated porcine trabecular bone blocks. **Biomaterials**, v. 25, p. 527-535, 2004.
- SPIN-NETO, R. et al. Fate of autologous and fresh-frozen allogeneic block bone grafts used for ridge augmentation. A CBCT-based analysis. **Clin Oral Implants Res**, v. 24, p. 167-173, 2013.
- STAVROPOULOS, A. et al. Deproteinized bovine bone used as an adjunct to guided bone augmentation: an experimental study in the rat. **Clin Implants Dent Relat Res**, v. 3, p. 156-165, 2001.
- STROCCHI, R. et al. Bone regeneration with calcium sulfate: evidence for increased angiogenesis in rabbits. **J Oral Implantol**, v. 28, p. 273-278, 2002.
- TAGA, M. L. L. et al. Healing of critical-size cranial defects in Guinea pigs using a bovine bone-derived resorbable membrane. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 23, p. 427-436, 2008.
- THALLER, S. R. et al. Repair of experimental calvarial defects with Bio-Oss particles and collagen sponges in a rabbit model. **J Craniofac Surg**, v. 5, n. 4, p. 242-246, 1994.

- THOMAS, M. V.; PULEO, D. A. Calcium sulfate: Properties and clinical applications. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 88, p. 597-610, 2009.
- TSAI, Y. et al. Improving biodegradation behavior of calcium sulfate bone graft tablet by using water vapor treatment. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 33, p. 121-126, 2013.
- UDAGAWA, A. et al. Micro-CT observation of angiogenesis in bone regeneration. **Clin Oral Implants Res**, v. 24, p. 1-6, 2012.
- VAJGEL, A. et al. A systematic review on the critical size defect model. **Clin Oral Implants Res**, v. 00, p. 1-15, 2013.
- VERNA, C. et al. Healing patterns in calvarial bone defects following guided bone regeneration in rats. A micro-CT scan analysis. **J Clin Periodontol**, v. 29, p. 865-870, 2002.
- VIGNOLETTI, F. et al. Surgical protocols for ridge preservation after tooth extraction. A systematic review. **Clin Oral Implants Res**, v. 23, p. 22-38, 2012.
- VISCIONNI, A. et al. Fresh-frozen bone: case series of a new grafting material for sinus lift and immediate implants. **J Ir Dent Assoc**, v. 56, p. 186-191, 2010.
- WALSH, W. R. et al. Response of a calcium sulfate bone graft substitute in a confined cancellous defect. **Clin Orthop Relat Res**, v. 406, p. 228-236, 2003.
- WENNSTRÖM, A. et al. Trends in tooth loss in relation to socio-economic status among Swedish women, aged 38 and 50 years: repeated cross-sectional surveys 1968-2004. **BMC Oral Health**, 2013. doi: 10.1186/1472-6831-13-63.
- YAMAUCHI, M. et al. Involvement of calcium-sensing receptor in osteoblastic differentiation of mouse MC3T3-E1 cells. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 288, p. E608-616, 2005.
- YANG, Y. G.; SYKES, M. Xenotransplantation: current status and a perspective on the future. **Nat Rev Immunol**, v. 7, p. 519-531, 2007.
- YAZDI, F. K. et al. A comparison of the healing capabilities of various grafting materials in critical-size defects in Guinea pig calvaria. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 28, p. 1370-1376, 2013.
- ZHANG, X. et al. Osteoconductive effectiveness of bone graft derived from antler cancellous bone: an experimental study in the rabbit mandible defect model. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 41, p. 1330-1337, 2012.
- ZIMA, A. et al. Study on the new bone cement based on calcium sulfate and Mg, CO<sub>3</sub> doped hydroxyapatite. **Ceram Int**, v. 38, p. 4935-4942, 2012.
- ZITZMANN, N. U.; HAGMANN, E.; WEIGER, R. What is the prevalence of

various types of prosthetic dental restorations in Europe? **Clin Oral Implants Res**, v. 18, p. 20-33, 2007.

ZITZMANN, N. U.; NAEF, R.; SCHÄRER, P. Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for Guided Bone Regeneration, **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 12, p. 844-852, 1997.

ZITZMANN, N. U. et al. Alveolar ridge augmentation with Bio-Oss®: a histologic study in humans. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 21, p. 289-295, 2001.

## ANEXO

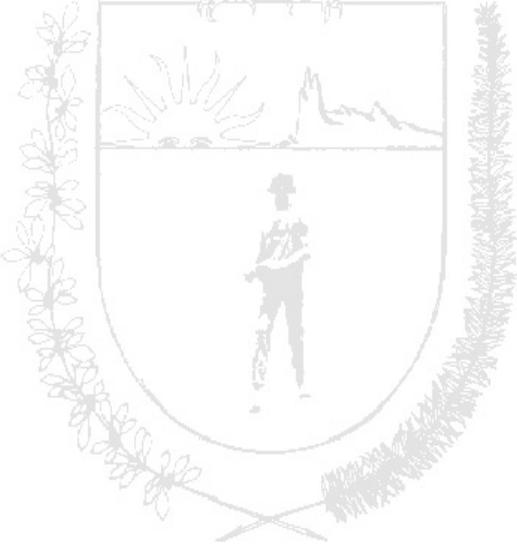
## ANEXO A – Parecer do Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação (CEAE nº 047/2013).



Universidade Estadual de Maringá  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação



Parecer emitido após reunião realizada em: 9/5/2013 Parecer nº 047/2013

Pesquisador: Luzmarina Hernandes		Setor: DCM	
Título:		Protocolo nº 018/2013	
<b>Estudo experimental da capacidade de substituição óssea do sulfato de cálcio hemi-hidratado em defeitos ósseos críticos em calvária de ratos</b>			
Entrada:	18/4/2013	Início:	14/5/2013
		Término:	3/3/2014
Situação do Projeto:		Aprovado	
Relatório Final:			
<b>ATENÇÃO: este parecer, quando a situação do projeto constar " aprovado", autoriza os proponentes a executarem o protocolo em questão. O certificado será emitido após apreciação do relatório final.</b>			
<b>Considerações e Parecer:</b>			
Sendo assim, propõem-se que o presente projeto seja APROVADO, na forma do artigo 10, inciso I, da Resolução UEM no 032/2006-CEP, uma vez que não se constatam óbices legais para o desenvolvimento dos procedimentos, nos moldes propostos no protocolo, em relação à legislação vigente, exigindo-se, entretanto, as informações, no Relatório Final, da concentração dos medicamentos anestésicos em mg/Kg, do tamanho das gaiolas a serem utilizadas pelos animais (área por animal) e o destino das carcaças dos animais utilizados no experimento, como explicado no Check List do site do CEAE/PPG/UEM.			
<input type="checkbox"/> Salvo melhor juízo, este é o parecer.			
			
Prof. Dr. Alexandre Ribas de Paulo, Presidente em exercício do CEAE			

Artigo 10 da Resolução nº 032/2006-CEP: Os projetos analisados serão enquadrados em uma das seguintes categorias:

- I - aprovado;
- II - pendente, quando o CEAE considerar o protocolo e o projeto como aceitáveis, porém com problemas no protocolo, no projeto ou em ambos, e houver recomendação de uma revisão específica, ou solicitação de modificação ou informação relevante, que deverá ser atendida em até 60 dias, após o recebimento da comunicação, pelo coordenador do projeto;
- III - arquivado, quando o protocolo permanecer pendente, transcorridos 30 dias, após o prazo previsto no Inciso II do recebimento da comunicação;
- IV - não aprovado