

FRANCISCO AZEVEDO

Lithothamnium calcareum
**EM REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA
EM RATOS: ESTUDO
EXPERIMENTAL**

Trabalho de Final do Mestrado Profissional,
apresentado à Universidade do Vale do
Sapucaí, para obtenção do título de Mestre
em Ciências Aplicadas à Saúde.

**POUSO ALEGRE – MG
2018**

FRANCISCO AZEVEDO

Lithothamnium calcareum
**EM REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA
EM RATOS: ESTUDO
EXPERIMENTAL**

ORIENTADOR: Prof^o. Dr. José Dias da Silva Neto

COORIENTADORES: Prof^o. Dr. Manoel Araújo Teixeira

Prof^a. Dra. Maria José Azevedo de Brito Rocha

POUSO ALEGRE – MG

2018

Azevedo, Francisco

Lithothamnium calcareum em regeneração óssea guiada em ratos: estudo experimental / Francisco Azevedo.-- Pouso Alegre: UNIVÁS, 2018.
xv, 26f. : il.

Trabalho Final do Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas à Saúde,
Universidade do Vale do Sapucaí, 2018.

Título em inglês: *Lithothamnium calcareum* in guided bone regeneration in rats: study experimental. / Francisco Azevedo. - Pouso Alegre: UNIVÁS, 2018.

Orientador: Prof. Dr. José Dias da Silva Neto

Coorientadores: Prof. Dr. Manoel Araújo Teixeira
Profª. Dra. Maria José Azevedo de Brito Rocha

1. Transplante Ósseo 2. Regeneração Óssea 3. Substituto do enxerto ósseo
5. Biomateriais 6. Ratos. 8. Implante Dentário

CDD: 617.6

UNIVERSIDADE DO VALE DO SAPUCAÍ

**MESTRADO PROFISSIONAL EM
CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE**

COORDENADOR: Prof. Dr. José Dias da Silva Neto

Linha de Atuação Científico-Tecnológica: Padronização de Procedimentos e Inovações Em Lesões Teciduais.

DEDICATÓRIA

À minha amada família:

MARIA TERESA DE CARVALHO AZEVEDO, esposa querida que sempre me motivou a desafiar todos os obstáculos.

Aos meus filhos **GABRIEL CARVALHO AZEVEDO E LUÍSA CARVALHO AZEVEDO**.

Aos meus pais **FRANCISCO ASSIS DE AZEVEDO E ALAÍDE FORTUNATO AZEVEDO** (*in memoriam*).

Aos meus irmãos **ROBERTO AZEVEDO, ROSÂNGELA AZEVEDO SOUZA** (*in memoriam*), **ROSAURA ANTONIETA AZEVEDO FARIA, RONALDO EUGÊNIO DE AZEVEDO, LEOPOLDINA ELISA AZEVEDO, MARCELO COELHO AZEVEDO E RAFAEL AZEVEDO**.

Aos meus **CUNHADOS (AS) E SOBRINHOS (AS)**.

Aos **AMIGOS E COLEGAS** de profissão.

À **ODONTOLOGIA** pela sua ciência.

AGRADECIMENTOS

Ao **PROF. Dr. E ORIENTADOR: JOSÉ DIAS DA SILVA NETO**, coordenador do mestrado profissional em ciências aplicadas à saúde da UNIVÁS, pela motivação, incentivo, perseverança e amizade. Sem medir esforços, dedicou a este trabalho como um “menino show” atrás dos seus sonhos, contribuindo sempre com suas ideias originais, para o desenvolvimento deste trabalho de forma valorosa. O conheci professor e tornou-se amigo.

Aos **CO-ORIENTADORES: PROF. Dr. MANOEL ARAÚJO TEIXEIRA E PROFESSORA Dra. MARIA JOSÉ AZEVEDO DE BRITO ROCHA**, pelo apoio e incentivo e sugestões.

À **PROFA. Dra. DANIELA FRANCESCATO VEIGA**, coordenadora adjunta e professora orientadora do Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas à Saúde da UNIVÁS, exemplo de condução e dedicação ao mestrado profissional. Agradeço a confiança, as palavras de incentivo, as sugestões e o apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos **PROFESSORES DAS BANCAS DE QUALIFICAÇÃO E AVALIADORA DO EXAME DE DEFESA, PROFa. Dra. ADRIANA RODRIGUES DOS ANJOS MENDONÇA (UNIVÁS), PROFESSORA Dra. BEATRIZ BERTOLACCINI MARTÍNEZ (UNIVÁS), PROFESSOR Dr. CARLOS EDUARDO GOMES DO COUTO FILHO (UNIFAL), PROFESSORA Dra. DÊNIA AMÉLIA NOVATO VON ATZINGEN (UNIVÁS), PROFESSORA Dra. FIORITA GONZÁLES LOPES MUNDIM (UNIVÁS) e PROFESSORA Dra. JAQUELINE JÓICE MUNIZ (UNIVÁS)**, pelas as contribuições que com certeza, ajudaram enriquecer este trabalho.

Aos demais docentes do mestrado profissional em ciências aplicadas à saúde da UNIVÁS: **PROFESSORA Dra. ADRIANA RODRIGUES DOS ANJOS MENDONÇA, PROFESSORA Dra. ANA BEATRIZ ALKMIM TEIXEIRA LOYOLA, PROFESSORA Dra. BEATRIZ BERTOLACCINI MARTÍNEZ, PROFESSORA Dra. DIBA MARIA SEBBA TOSTA DE SOUZA, PROFESSORA Dra. FIORITA GONZALES LOPES MUNDIM, PROFESSOR Dr. GERALDO MAGELA SALOMÉ, PROFESSORA Dra. JAQUELINE JÓICE MUNIZ, PROFESSORA Dra. LYLIANA COUTINHO RESENDE BARBOSA, PROFESSOR Dr. MANOEL ARAÚJO TEIXEIRA,**

PROFESSOR. Dr. TAYLOR BRANDÃO SCHNAIDER, pela partilha de alegrias e a troca do bem mais valioso, o conhecimento a todos nós mestrados.

Aos **PROFESSORES YARA JULIANO E NEIL FERREIRA NOVO**, exemplos de que não existe idade para o conhecimento.

Aos **PROFESSORES CONVIDADOS** do Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas à Saúde da UNIVÁS.

Ao **MÉDICO VETERINÁRIO WELLINGTON DELFINO E AO BIÓLOGO IVAN LÚCIO DE MELO**, por participarem ativamente dos procedimentos no Laboratório de Bases Técnicas Cirúrgicas da UNIVÁS.

Ao **Sr. JOSÉ LOPES CHAVES**, que zelou pelos animais no Laboratório de Bases Técnicas Cirúrgicas da UNIVÁS.

Ao **PROFESSOR RODRIGO MACHADO PEREIRA**, pela colaboração decisiva nas análises histológicas e pelas belíssimas imagens das lâminas, sempre solícito em nos atender. Pela excelência em cada detalhe.

Ao **PROFESSOR PAULO ROBERTO MAIA**, pela colaboração indispensável no estudo estatístico deste trabalho.

Aos **ALUNOS GRADUANDOS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVAS SAULO PEREIRA CAMACHO ROQUE E ISABEL ÁREA LEÃO DE ALMEIDA ANDRADE**, pela elaboração de Estudo Piloto: Adaptação do modelo Experimental no LABORATÓRIO DE BASES TÉCNICAS CIRÚRGICAS DA UNIVÁS sob orientação do **PROFESSOR Dr. JOSÉ DIAS DA SILVA NETO**, coorientação dos **MESTRANDO CHRISTIANO CÂNDIDO ZERBINATI E O MÉDICO VETERINÁRIO WELLINGTON DELFINO**.

Ao **COLEGA E AMIGO CHRISTIANO CÂNDIDO ZERBINATI**, pelo incentivo a cursar esse mestrado. O conheci como um aluno aplicado e dedicado no curso de especialização em implantodontia e que naturalmente fez brotar a grande amizade que cultivamos hoje; companheiro também de muitas cirurgias e de muitos saraus musicais.

À **TODOS OS DISCENTES E EX-MESTRANDOS** do Mestrado Profissional em

Ciências Aplicadas à Saúde da UNIVÁS, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos (as), **ANA PAULA ANDRADE, CLAUDINI SICHIERI, DANIELA REIS, DANIELE CAETANO, EMANUELLA DE SOUZA, EUGÊNIO MENDES, FERNANDA MOYSÉS, MÁRIO MARQUES, NÚBIA ALVES, IAURA ESTEVES, JÚLIA BACON, JOHNNY QUEIROZ, KASSANDRA PAULELLO, LUIZ TOSTES, MAÍSA DA SILVA, RAFAEL SOUZA, RENAN PINHEIRO, ROGÉRIO SICHIERI, RÚBIA BOCZAR e TARISE DE MORAES.**

Ao secretário, auxiliares administrativos e estagiária **GUILHERME SANTOS, AMANDA FIGUEIREDO, GISLAINE BITTENCOURT E KAREN KOI** do Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas à Saúde da UNIVÁS.

Aos **AMIGOS ASSISTENTES E RESIDENTES DO SERVIÇO DE CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCOMAXILOFACIAL (CTBMF)** do Hospital Municipal de Campinas “Dr. Mário Gatti”.

Aos **AMIGOS PROFESSORES, ALUNOS EX-ALUNOS, FUNCIONÁRIOS E PACIENTES** do Curso de Especialização em Implantodontia - ABO/UNIVÁS Pouso Alegre.

E finalmente à **DEUS**, pelo dom da vida.

OS QUE LUTAM

“Existem homens que lutam um dia...
e por isso são bons;
Existem aqueles que lutam muitos dias...
e por isso são muito bons;
Existem aqueles que lutam muitos anos...
e são melhores ainda;
Porém,
Existem aqueles que lutam toda a vida...
estes são os imprescindíveis”.

Bertolt Brecht

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Anterior.
ABO	Associação Brasileira de Odontologia
BMP	Proteínas Morfogenéticas.
CaP	Fosfato Cálcio.
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais.
cc	Centímetro Cúbico
D	Direito.
DTC	Defeito de Tamanho Crítico.
E	Esquerdo.
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético.
eHA)	Hidroxiapatita de Cascas de Ovo.
<i>et al</i>	E colaboradores.
HA	Hidroxiapatita.
kg	Kilograma.
LTT	<i>Lithothamnium calcareum</i> .
MC	Membrana de Colágeno.
mg	Miligrama.
MG	Minas Gerais
ml	Mililitro.
mm	Milímetro.
MO	Microscopia Óptica
Nº.	Número.
P	Posterior.
PRP	Plasma Rico em Plaquetas.
PVPI	Polivinil Pirrolidona Iodo - Iodopovidona 10%.
rhBMP-2	Proteína Morfogenética Óssea Humana Recombinante - 2.
ROG	Regeneração Óssea Guiada.
R\$	Real – Moeda Brasileira
RPM	Rotação por Minuto.
SA	Sociedade Anônima.
sHA	Hidroxiapatita de Conchas Marinhas.
SP	São Paulo.
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences.
TNT	Tecido não Tecido.
UI	Unidade Internacional.
UNIVÁS	Universidade do Vale do Sapucaí.
USA	Estados Unidos da América.
µm	Micrômetro.
β-TCP	β-Tricálcio de Fosfato.
®	Registrada.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Antissepsia da região da calvária com PVPI.....	6
Figura 2- Colocação dos campos cirúrgicos.....	6
Figura 3- Incisão na região da Calvária envolvendo Pele, Músculo e Perióstio.....	6
Figura 4- Descolamento do Perióstio e Exposição da Calvária.	6
Figura 5- Confeção dos DTCs em Calvária Através de Broca Trefina.....	7
Figura 6- Confeção dos DTCs em Calvária.....	7
Figura 7- Exposição dos DTCs em Calvária.....	7
Figura 8- Inserção do LTT (Lithonutri) no DTC Posterior e Direito.....	7
Figura 9- Inserção do β -TCP no DTC Posterior e Esquerdo.....	8
Figura 10- Iniciando a Inserção da Membrana de Colágeno, para cobrindo os DTCs.....	8
Figura 11- DTCs Completamente encobertos pela Membrana de Colágeno.....	8
Figura 12- Sutura por Pontos Separados Através de Fio Nylon (4-0)	8
Figura 13- Animal Eutanasiado.	9
Figura 14- Incisão Linear de 2 mm, da Pele e Músculo com a Tesoura Íris.....	9
Figura 15- Dissecção da Calvária.	10
Figura 16- Remoção Total da Calvária.	10
Figura 17- Calvária: A- Região Anterior, P- Região Posterior, D- Lado Direito e E- Lado Esquerdo.....	10
Figura 18 Cálvárias dos ratos Wistar acondicionados separadamente em frascos.....	10
Figura 18- depósito de pedido de patente – INPI.....	15

LISTA DE GRÁFICOS

Tabela 1-	Respostas obtidas a partir de teste de <i>Kruskal-Wallis</i> para a Área A.....	13
Tabela 2-	Respostas obtidas a partir de teste de <i>Kruskal-Wallis</i> para a Área B.....	13
Tabela 3-	Respostas obtidas a partir de teste de <i>Kruskal-Wallis</i> para a Área C.....	14

SUMÁRIO

1	CONTEXTO	1
2	OBJETIVO	4
3	MÉTODOS	5
3.1	Delineamento do estudo	5
3.2	Caracterização da amostra	5
3.3	Procedimentos para coletas de dados	5
3.4	Processamento histológico	9
3.5	Análise de resultados.....	11
3.5.1	Análise histológica	11
3.5.2	Análise histomorfológica	12
3.6	Análise estatística	12
4	RESULTADO/PRODUTO	13
4.1	Resultados	14
4.2	Produto	15
4.2.	Patente	15
5	DISCUSSÃO	16
5.1	Aplicabilidade	17
5.2	Impacto para a sociedade	18
6	CONCLUSÃO	19
7	REFERÊNCIAS	20
	NORMAS ADOTADAS	23
	APÊNDICE	24
	ANEXOS	25
	FONTES CONSULTADAS	26

RESUMO

Contexto: A perda óssea alveolar, provocada por lesões periodontais, tumores e traumas locais, dificulta ou impossibilita a reabilitação oral através de próteses sobre implantes. O conceito da regeneração óssea guiada (ROG) tem como objetivo recompor esta perda óssea tanto em altura, quanto em largura, chamados de defeito de tamanho crítico (DTC). Utiliza técnicas variadas que estende desde o uso de enxertos autógenos, heterógenos até uma infinidade de substitutos ósseos sintéticos de custo elevado. **Objetivo:** Avaliar o uso da alga *Lithothamnium calcareum* (LTT) na regeneração óssea guiada em ratos. **Métodos:** Estudo experimental, primário, intervencional, longitudinal, prospectivo, analítico e aleatorizado. A amostra foi constituída por 20 ratos da raça Wistar machos, com idade de 12 semanas, pesando entre 350 a 450 gramas. Foram produzidos três DTCs de 3 mm de diâmetro na calvária dos animais, através de broca trefina, preservando a dura-máter: o GRUPO CONTROLE (C): DTC Central e anterior da calvária preenchido com coágulo; GRUPO DIREITO (D): DTC do lado D e posterior da calvária preenchido pela alga LTT (Lithonutri[®] - Oceana); GRUPO ESQUERDO (E): DTC do lado esquerdo e posterior da calvária foi preenchido com β -TCP (Cerasorb[®] - Reimser). Todos os DTCs foram recobertos por uma membrana de colágeno. Após 8 semanas realizou-se a eutanásia, removeu-se a calvária e os espécimes foram preparados para análises histomorfométrica e histológica. Foram avaliadas 3 áreas da região central de cada grupo denominadas áreas A, B e C. Para avaliação estatística, aplicou-se o teste de *Kruskal-Wallis* para comparar medianas das medidas das áreas A, B e C nos GRUPO CONTROLE (C), GRUPO DIREITO (D) e GRUPO ESQUERDO (E), respectivamente. **Resultado:** Ocorreu formação de novo tecido ósseo nos três grupos e não houve diferença entre os grupos. Para a média das medidas das áreas A ($p = 0,533$), B ($p = 0,403$) e C ($p = 0,094$). **Conclusão:** A Alga LTT promoveu a regeneração óssea no modelo experimental.

Palavras-chave: Transplante Ósseo; Regeneração Óssea; Alga Marinha; Biomateriais; Ratos Wistar, Implantes Dentários.

ABSTRACT

Context: The Alveolar bone loss, caused by periodontal lesions, tumors and local trauma, make the oral rehabilitation through implants difficult or impossible. The concept of guided bone regeneration (GBR) is made to recover this bone loss in both height and width, called a critical-sized defect, uses a variety of techniques ranging from the use of autogenous, heterogeneous grafts to a myriad of bone substitutes synthetics. **Objective:** Evaluate the use of algae *Lithothamnium calcareum* (LTT) in guided bone regeneration in rats. **Methods:** Experimental, primary, interventional, longitudinal, prospective e analytical study. The sample consisted of 20 male Wistar rats, aged around 12 weeks, weighing between 350 and 450 grams. It was produced three defects of 3mm diameter in the calvaria's animal, by trephine drill, preserving the dura mater: CONTROL GROUP (C): Central and anterior of calvaria filled with clot; RIGHT GROUP (D): on side D and posterior side of calvaria filled by LTT algae (*Lithonutri*[®] - Oceana); LEFT GROUP (E): Left and posterior was calvaria filled with β -CTP (*Cerasorb*[®] - Reimser). All the defects were coated by a collagen membrane. After 8 weeks euthanasia was performed, calvaria was removed and specimens were prepared for histomorphometric and histological analyzes. For the statistical evaluation, the Kruskal-Wallis test was used to compare medians of areas A, B and C in the CONTROLE GROUP (C), GRUPO DIREITO (D) and GRUPO LEFT (E), respectively. **Result:** A new bone tissue was formed in all three groups and there was no difference between then. For the mean of measurements: A ($p = 0.533$), B ($p = 0.403$) and C ($p = 0.094$). **Conclusion:** The LTT algae promoted bone regeneration in the experimental model.

Keywords: Bone Transplantation; Bone Regeneration; Seaweed; Biomaterials; Wistar rats, Dental Implants.

1 CONTEXTO

Os ossos alveolares dos maxilares podem sofrer traumas, neoplasias e infecções que determinam destruições graves e provocam insuficiência da quantidade óssea na cavidade bucal (CHUNG *et al.*, 2015; ASVANUND e CHUNHABUNDIT 2012; YAZDI *et al.*, 2013).

O osso autógeno é o substituto ósseo mais efetivo (TADIC *et al.*, 2004; PARK., *et al.*, 2007; NAKAMURA *et al.*, 2009; ASVANUND e CHUNHABUNDIT 2012; YAZDI *et al.*, 2013; KAZANCIOGLU *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2013; MESSORA *et al.*, 2013; BURANAWAT *et al.*, 2014; CHUNG *et al.*, 2015). Ele cumpre todas as propriedades físicoquímicas e biológicas: a) osteogênica: possuem células progenitoras que sintetizam o osso novo; b) osteoindutiva: o novo tecido ósseo é formado pelo recrutamento ativo de célulastronco mesenquimais e contém fatores de crescimento principalmente as proteínas morfogenéticas ósseas e c) osteocondutores: vascularização e nova formação óssea (TADIC *et al.*, 2004).

Entretanto, existem algumas desvantagens como: limitação da quantidade de osso da área doadora e procedimento cirúrgico adicional, resultando em morbidade pós-operatória no local da área doadora como dor e desconforto (TADIC *et al.*, 2004; NAKAMURA *et al.*, 2009; ASVANUND e CHUNHABUNDIT, 2012; MESSORA *et al.*, 2013; YAZDI *et al.*, 2013; KAZANCIOGLU *et al.*, 2013). Para superar as desvantagens associadas aos enxertos autógenos, tem-se desenvolvido substitutos ósseos como: a) enxertos alo gênicos, e adquiridos em banco de ossos humanos; b) enxertos xenogênicos, exemplo, enxerto de osso bovino e c) enxertos sintéticos, exemplo, as cerâmicas. (TADIC *et al.*, 2004; CHUNG *et al.*, 2015). Contudo, os aloenxertos e xenoenxertos podem desenvolver resposta imune desfavorável (TADIC *et al.*, 2004).

Atualmente, os implantes dentários são amplamente utilizados na reabilitação oral (NAKAMURA *et al.*, 2009) e apesar de terem se tornado uma opção de tratamento confiável, com bom índice de sucesso, torna-se um grande desafio instalá-los em regiões com defeito ósseo (CHUNG *et al.*, 2015).

A regeneração óssea guiada (ROG) tem como fundamento reabilitar as perdas ósseas (YAZDI *et al.*, 2013), método que utiliza membranas e barreiras. Estas produzem espaço, e formam um arcabouço, com a finalidade de proteger e promover o crescimento ósseo (KOCHI *et al.*, 2009).

Os substitutos ósseos utilizados têm vários formatos: os blocos, que são fixados com parafusos e placas de titânio e os grânulos, pastas e pós, que necessitam de barreiras e membranas (YOUNIS *et al.*, 2014).

Frequentemente, o plasma rico em plaquetas (PRP) é utilizado, devido a sua concentração autóloga de plaquetas num pequeno volume de plasma e ser considerado uma fonte rica de fatores de crescimento (MESSORA *et al.*, 2013; YOUNIS *et al.*, 2014) mas, existem controvérsias quanto aos potenciais benefícios do seu uso (NAGATA *et al.*, 2010).

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e, principalmente, as proteínas morfogenéticas ósseas humanas recombinantes do tipo 2 (rhBMP-2), embebidas numa esponja de colágeno absorvível, induzem a formação óssea (LEE *et al.*, 2013) porém, apresentam custos elevados (PARK *et al.* 2007).

Os compostos de fosfato de cálcio (CaP) têm sido amplamente estudados devido à sua estreita semelhança com o componente inorgânico do tecido ósseo e sua excelente biocompatibilidade *in vivo* na reparação de defeitos ósseos (ZHOU *et al.*, 2013). Um dos CaP estudado é o β -tricálcio de fosfato (β -TCP) que mostra significativa atividade osteogênica (SHIRATORI *et al.*, 2005).

O chamado defeito de tamanho crítico (DTC) é definido como o defeito ósseo de menor tamanho que não cicatrizará completamente ao longo da vida. Isso acontece porque o tecido conjuntivo fibroso preenche o defeito ósseo mais rapidamente que o tecido ósseo e proporciona uma regeneração óssea limitada (VUOLA *et al.*, 2001; KAZANCIOGLU *et al.*, 2013).

A alga *Lithothamnium calcareum* (LTT) pertence ao grupo das algas vermelhas ou rodofíceas, da família das Corallineaceas. Elas são extraídas de forma manual, por meio de redes de pesca ou por mergulhadores, ou colhidas de forma mecânica (navio aspirador). Passam por um processo de lavagem, desidratação e moagem e sua renovação é permanente, contanto que haja incidência de luz natural. Ela cresce em profundidades que variam de 10 a 40 metros. A plataforma continental brasileira detém um dos maiores depósitos de algas calcárias do mundo, numa faixa de 4 mil quilômetros, que se estende do litoral do estado do Pará até o estado do Rio de Janeiro (VASCONCELOS *et al.*, 2012).

A alga LTT é composta basicamente de carbonato de cálcio e magnésio e contém mais de 20 oligoelementos, como ferro, manganês, boro, níquel, cobre, zinco, molibdênio, selênio, estrôncio, entre outros. Nos países europeus como a França, Irlanda e Inglaterra, assim como no Japão, sua utilização na alimentação é praticada há mais de 200 anos como suplemento mineral (CARLOS *et al.*, 2011; TADDEIA *et al.*, 2014).

No Brasil a sua utilização se restringia somente à agricultura para correção e fertilização do solo e, nos últimos tempos, passou a ser utilizada em suplementos para humanos e em rações animais (CARLOS *et al.*, 2011).

Outras algas marinhas como a *Corallina officinalis* e *Amphiroa ephedra*, também foram investigadas em DTCs de animais para verificar a potencialidade de produzirem substitutos ósseos e demonstraram significativamente a capacidade de promover a cicatrização óssea (ZHOU *et al.*, 2013).

Na literatura encontram-se vários experimentos em animais. Em meio as pesquisas, os ratos são os preferidos e dentre estes, os mais utilizados são: os ratos *Fischer* (KOCHI *et al.*, 2009); os ratos Wistar (OZDEMIR *et al.*, 2013; KAZANCIOGLU *et al.*, 2013; VUOLA *et al.*, 2001; NAGATA *et al.*, 2010); os ratos *Sprague-dawley* (LEE *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2014; CHUNG *et al.*, 2015; MESSORA *et al.*, 2013); os ratos *Rattus norvegicus albinus* e *Whister* (KAZANCIOGLU *et al.*, 2013) e as cobaias (ASVANUND e CHUNHABUNDIT, 2012).

Os DTCs, em calvária de rato, foram utilizados em vários experimentos para avaliar e estudar a ROG e tem um baixo risco de complicações (KOCHI *et al.*, 2009).

A maioria dos DTCs encontrado nesses estudos, variam entre 4 mm (NAGATA *et al.*, 2010) e 8 mm (LEE *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2014). Vários substitutos ósseos foram utilizados para estudar as suas efetividades como exemplo a Hidroxiapatita (HA) (Apaceram-AX, Pentax Corp, Tóquio, Japão) (OZDEMIR *et al.*, 2013). O substituto ósseo mais utilizado nessas pesquisas foi β -tricálcio de fosfato (β -TCP) (LEE *et al.*, 2014).

A HA de conchas marinhas (sHA) e de cascas de ovos (eHA) também foram investigadas em DTCs, em calvária de ratos e comparadas entre si. Verificou-se que houve capacidade de formação de um novo tecido ósseo em ambas. (LEE *et al.*, 2014).

O Nácar, conhecido como madrepérola, obtido da camada interna da concha do molusco (*Ostra - Pinctada máxima*), foi também utilizado, em alvéolos dentários de cobaias, e comparada com o β -TCP, resultando assim na formação de um novo tecido ósseo (ASVANUND e CHUNHABUNDIT, 2012).

Todos os experimentos citados acima resultaram em formação de um novo tecido ósseo. A ausência de estudos com a utilização da alga LTT, suportou a ideia da realização deste estudo experimental em DTCs, em calvária de ratos, para: 1) avaliar a capacidade de formação de um novo tecido ósseo e comparar com o β -CTP e coágulo do animal; 2) realizar as análises histológica e histomorfométrica e 3) desenvolver patente de modelo de utilidade.

2 OBJETIVO

Avaliar o uso da alga *Lithothamnium calcareum* (LTT) na regeneração óssea guiada em ratos.

3 MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

Trata-se de estudo a experimental, primário, intervencional, longitudinal, prospectivo e analítico e aleatório.

3.2 Caracterização da amostra

A amostra foi constituída por 20 ratos Wistar machos, com idade de 12 semanas, pesando entre 350 a 450 gramas. O experimento deu-se início após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA - UNIVÁS - Pouso Alegre - MG (ANEXO 1).

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais em uma sala com ciclos de 12 horas por dia/noite, temperatura ambiente, dieta padrão e água à vontade.

O Local de experimentação foi o laboratório de Bases de Técnicas Cirúrgicas da UNIVÁS.

3.3 Procedimentos para coletas de dados

Realizou-se a antibioticoprofilaxia com Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte 24.000 UI Fort Dodge®, Saúde Animal Ltda., Campinas, SP (benzilpenicilina benzatina - 600.000UI, benzilpenicilina procaína - 300.000UI, benzilpenicilina potássica - 300.000UI, sulfato de dihidroestreptomicina - 250mg e sulfato de estreptomicina 250mg). Iniciou-se 12h antes do procedimento e manteve-se por 7dias, via intramuscular, na dose de 1mg/kg.

Para a sedação, os ratos receberam cloridrato de xilazina 6mg/kg (Rompum® 2% - Bayer SA) via intramuscular. Logo em seguida foi realizada a anestesia com cloridrato de cetamina 70mg/kg (Ketalar® 10%, Pfizer, SP) - via intramuscular e, em seguida, aplicada a anestesia infiltrativa local - região da calvária 12,5mg/kg de bupivacaína (Neocaína® 5% - Cristália).

O animal foi colocado na mesa cirúrgica, logo em seguida foi realizada a antisepsia da calvária com polivinil pirrolidona iodo (PVPI) e coberto por panos de campo (TNT) fenestrado e esterilizados (Figuras 1 e 2).



Figura 1- Rato Wistar em decúbito ventral na mesa cirúrgica e realização a antissepsia da região da calvária com PVPI.

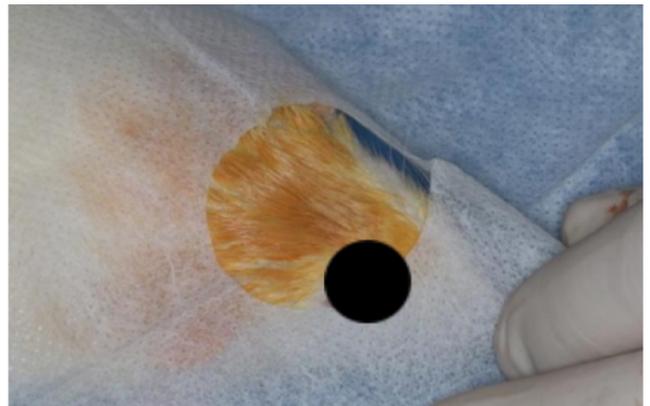


Figura 2- Colocação de panos de campo (TNT) fenestrado e esterilizados e a deixando a região da calvária de ratos Wistar.

A abordagem da calvária foi realizada mediante incisão linear anteroposterior e na linha sagital, de 20 mm de extensão, com a lâmina de bisturi n^o15 (Advantive®), atingindo a pele, músculo e periósteo. Em seguida o periósteo foi descolado com o descolador Molt, (Figuras 3 e 4) permitindo assim a deflexão dos tecidos moles e exposição de toda calvária.



Figura 3- Incisão linear anteroposterior e na linha sagital, na calvária de rato Wistar, de 20 mm de extensão, com a lâmina de bisturi n^o15 (Advantive®), atingindo a pele, músculo e periósteo.



Figura 4- Descolamento do periósteo com descolador Molt deflexão dos tecidos moles e exposição da calvária de rato Wistar.

Foram produzidos três defeitos de tamanho crítico (DTC) sendo dois na porção mais posterior da calvária dos ratos Wistar, um de cada lado da sutura sagital, chamados de DTCs Direito e Esquerdo; e outro DTC na região anterior e central, chamado de DTC C. Os três DTCs foram realizados com broca trefina de diâmetro de 3 mm de diâmetro, acoplada à peça de mão de baixa velocidade (contra-ângulo de redução 20:1) com motor elétrico programado a 1.500 rotações por minuto (RPM) e irrigação constante com soro fisiológico 0,9%. Nos três DTCs, a dura-máter foi preservada (Figuras 5 e 6).

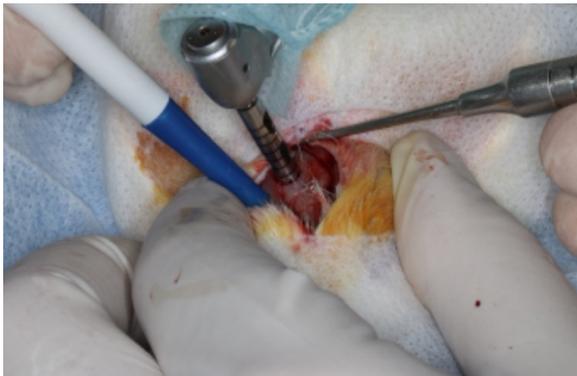


Figura 5- Confecção dos DTC em calvária do rato Wistar, realizada por uma Broca trefina de 3mm de diâmetro, acoplada no contra-ângulo de redução de 20:1.



Figura 6- Retirada do tecido ósseo da calvária do rato Wistar com descolador de Molt e pinça Dietrich.

As calvárias foram limpas e secas com soro fisiológico e com gaze estéril (Figura 7). O DTC direito e posterior, chamado de GRUPO D, foi preenchido com *Lithothamnium calcareum* (Lhithonutri[®] - Oceana - Brasil) através do descolador de Molt. A quantidade utilizada foi o suficiente para preencher do DTC. (Figura 8).

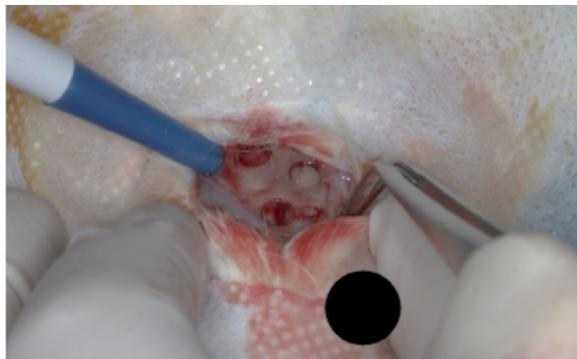


Figura 7- Deflexão dos tecidos moles e exposição dos DTCs anterior, posterior direito e posterior esquerdo do rato Wistar.

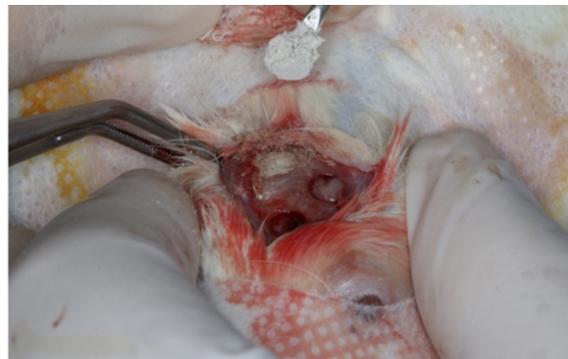


Figura 8- Inserção do *Lithothamnium calcareum* (Lhithonutri[®]) no DTC direito posterior através do descolador de Molt.

O DTC esquerdo e posterior, chamado de GRUPO E, foi preenchido com um segundo descolador de Molt, pelo β -CTP (β -Tricálcio de Fosfato) (Cerasorb® M 500-1000 μ m - Riemser - Alemanha) (Figura 9). A quantidade utilizada foi o suficiente para preencher do DTC E e o DTC central e anterior, chamado de GRUPO C, foi preenchido pelo coágulo do rato Wistar espontaneamente na quantidade suficiente para preencher do DTC.



Figura 9- Inserção do β -CTP - Cerasorb no DTC esquerdo posterior através de um segundo descolador de Molt.

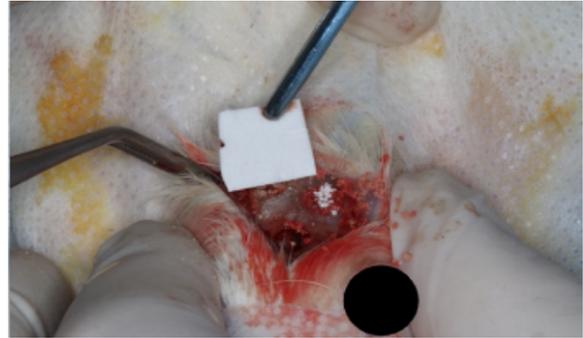


Figura 10- Inserção da membrana de colágeno (Lumina-Coat - Critéria - recortada em 5 mm²) através da pinça Dietrich, encobrendo os três DTCs.

Uma membrana reabsorvível de colágeno (Lumina-Coat - 1X20X30 - Critéria), foi recortada no tamanho 5 mm² e colocada sobre cada DTCs, para evitar a invaginação de tecido conjuntivo reparador nas lojas cirúrgicas (Figuras 10 e 11). Em seguida, o periósteo e tecidos intra-dérmicos e pele foram cuidadosamente reposicionados e suturados por pontos separados através de fio mononylon (4-0) (Figura 12).



Figura 11- Os três DTCs completamente encobertos pelas membranas de colágeno. (Lumina-Coat - Critéria).



Figura 12- Sutura envolvendo periósteo, músculo e pele por pontos separados através de fio mononylon (4-0).

Imediatamente, após a cirurgia, foram administradas injeções intramusculares de Pentabiótico, 1 mg/Kg a cada animal para prevenir a infecção pós-operatória, a cada 12 horas e mantidos por 7 dias. Para controle da dor e possível inflamação, foram administrados, junto à ingestão da água pela via oral, 30mg/kg o Ibuprofeno e Flunixinina meglumine, a cada 12 horas. Após 7 dias foram removidas as suturas.

3.4 Processamento histológico

Após 8 semanas, a eutanásia de todos os animais foi realizada seguindo o protocolo de sedação com Cloridrato de Xilazina - 6 mg/kg - Injeção intramuscular e anestesia geral com (Cloridrato de Cetamina) 70 mg/kg - Injeção intramuscular. Em seguida, para evitar sofrimento dos animais, eles foram eutanasiados (Figura 13).

Iniciou-se a remoção da calvária, com um corte na pele e músculo, feita por uma tesoura Metzenbaum (Figura 14).



Figura 13- Rato Wistar eutanasiado, após injeção intracardíaca de Cloreto de Potássio 19,1% - 2 ml/kg em decúbito ventral, após sedação e anestesia geral.

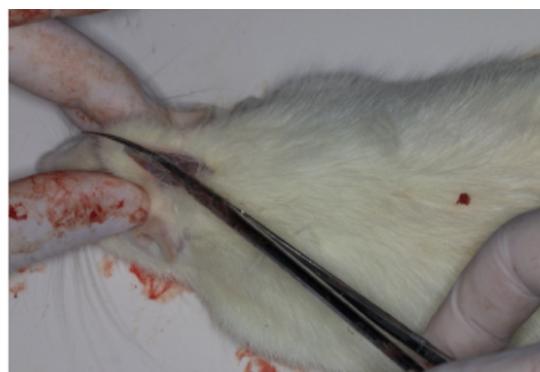


Figura 14- Corte linear de 2 mm, envolvendo pele e músculo, do rato Wistar, realizada por uma tesoura Metzenbaum.

Realizou-se uma incisão no perióstio com lâmina de bisturi n° 15 (Advantive®) e em seguida o seu descolamento com descolador Molt, para a exposição de toda calvária. Em seguida, procedeu-se a dissecação cuidadosa da calvária com uma tesoura Metzenbaum. (Figuras 15 e 16).



Figura 15- Dissecção da calvária do rato Wistar realizada com uma tesoura Metzenbaum.



Figura 16- Remoção total da calvária, segurado com uma pinça Addison expondo toda a região superior do encéfalo do rato Wistar.

Os espécimes foram identificados, acondicionados em recipientes contendo formaldeído tamponado (Figuras 17 e 18).

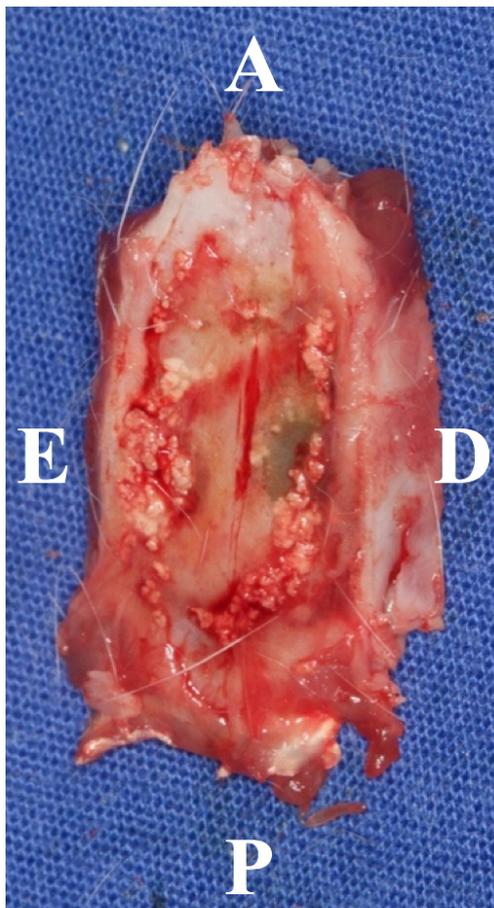


Figura 17- Calvária do rato Wistar. A- Região anterior da calvária, D- região direita da calvária, E- região esquerda da calvária e P- região posterior da calvária.



Figura 18- Cada calvária do rato Wistar, no total de 20 calvárias, acondicionadas separadamente em frascos, identificados e contendo formaldeído tamponado.

As peças ósseas foram fixadas em formol a 10% em tampão de fosfato em pH de 7,2. Em seguida, foram descalcificadas em solução de EDTA a 10% durante 15 dias.

Os procedimentos histológicos foram realizados no Laboratório de Biologia da UNIVÁS por bióloga e especialista em confecção de lâminas.

Posteriormente, as peças passaram pelo processo laboratorial para inclusão em parafina. Para tanto, foram submetidas a lavagem em água corrente por 1 hora, seguido do processo de desidratação em bateria alcoólica crescente (Etanol 70%, Etanol 95%, Etanol Absoluto I, Etanol Absoluto II e Etanol Absoluto III – 1 hora em cada banho). A clarificação foi realizada em dois banhos de xilol, e posteriormente procedeu a impregnação em parafina pura em estufa a 65°C por três banhos consecutivos por 1 hora em cada. E por fim, a inclusão foi realizada em moldes apropriados.

Obtidos os blocos, foram realizados cortes transversais com espessura de 4 micrômetros em micrótomo rotativo, resultando em cortes semi-seriados que foram submetidos à coloração pela hematoxilina e eosina.

Para coloração, os cortes foram desparafinizados em três banhos de xilol e hidratados em série alcoólica decrescente (Etanol Absoluto I, Etanol Absoluto II, Etanol Absoluto III, Etanol 95%, Etanol 70% (1 minuto em cada) seguido de lavagem em água corrente por 1 minuto. A coloração primária foi realizada em hematoxilina de *Harris* por 2 minutos. Para contra-coloração, foi utilizada Eosina Alcoólica por 2 minutos antecedido da semi-desidratação dos cortes em etanol 70%.

Por fim, as lâminas foram desidratadas em série etanólica crescente, clarificadas em xilol, limpadas e montadas permanentemente em verniz com lamínula para melhor visualização.

As análises histomorfológica e histomorfométrica foram realizadas no Laboratório de Histologia da UNIVÁS.

3.5 Análise dos resultados

3.5.1 Análise histológica

As lâminas foram individualizadas e as regiões dos DTCs, foram analisadas de forma cega, pela equipe do laboratório de biologia da UNIVÁS, por microscopia óptica, afim de verificar a presença de processos reacionais de reparo e/ou inflamação. A presença dos

seguintes constituintes celulares e teciduais também foram considerados: tecido conjuntivo, fibroblastos, osteoblastos, osteoclastos e novo tecido ósseo.

3.5.2 Análise histomorfométrica

A histomorfometria também foi analisada pela equipe do laboratório de biologia da UNIVÁS da seguinte maneira: as imagens das lâminas, foram capturadas com a câmera digital *Moticam M1000*, acoplada ao microscópio óptico, utilizando o *software Motic Images Plus*. As imagens foram capturadas em aumento do 100X e exportadas em *Bitmap*. Para cada amostra, foram selecionadas três regiões distintas para realização das fotomicrografias.

As áreas de reparo foram avaliadas pela mensuração manual pelo *software Image J* versão 1.51 (*National Institute of Health, USA*). Para tanto, os arquivos foram importados para o *software*. O tecido de reparação foi selecionado mediante a função de *Color threshold*. Os intervalos de cor, saturação e brilho foram ajustados a fim de que a maior área do tecido fosse selecionada, excluindo as áreas não preenchidas. Os valores de área foram obtidos pela função *Measure* e submetidos à análise estatística.

3.6 Análise estatística

Foi realizado o teste de *Kruskal-Wallis*. Para comparação, considerou-se em todos os testes, o nível de significância de 5%. O software utilizado foi o *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)* versão 22.0.0.0.

4 RESULTADOS/PRODUTO

4.1 Resultados

As medidas de neoformação óssea foram analisadas inicialmente na porção central das lesões. Realizou-se três medidas: Área A, Área B e Área C dos GRUPOS C (Coágulo), GRUPO D (*Lhithotamnium caucarium*) e GRUPO E (β -CTP), respectivamente.

As Tabelas 1, 2 e 3 demonstram os resultados dos três grupos:

Tabela 1. Comparação das medidas em pixel, das medianas, das Áreas de calvária dos ratos Wistar, submetidas à defeitos de tamanho crítico (DTC) e preenchidos com coágulo (GRUPO C), *Lhithotamnium caucarium* (GRUPO D) e β -CTP GRUPO E. Respostas obtidas a partir de teste de *Kruskal-Wallis* para a **Área A**.

Tratamento	N	Mediana (pixel)	Posto médio
GRUPO C	20	494371	32,6
GRUPO D	20	502555	31,7
GRUPO E	20	0	27,1
GLOBAL	60		30,5

C - Grupo Controle; D - Grupo LTT; Grupo E - β -CTP; H = *Kruskal – Wallis* qui-quadrado; GL – Graus de Liberdade; **P = 0,533**.

Tabela 2. Comparação das medidas em pixel, das medianas, das Áreas de calvária dos ratos Wistar, submetidas à defeitos de tamanho crítico (DTC) e preenchidos com coágulo (GRUPO C), *Lhithotamnium caucarium* (GRUPO D) e β -CTP GRUPO E. Respostas obtidas a partir de teste de *Kruskal-Wallis* para a **Área B**.

Tratamento	N	Mediana (pixel)	Posto médio
GRUPO C	20	522716	33,0
GRUPO D	20	237379	31,9
GRUPO E	20	0	26,5
GLOBAL	60		30,5

C - Grupo Controle; D - Grupo LTT; Grupo E - β -CTP; H = *Kruskal – Wallis* qui-quadrado; GL – Graus de Liberdade; **P= 0,403**.

Tabela 3. Comparação das medidas em pixel, das medianas, das Áreas de calvária de ratos Wistar, submetidas à defeitos de tamanho crítico (DTC) e preenchidos com coágulo (GRUPO C), *Lhithotamnium caucarium* (GRUPO D) e β -CTP GRUPO E. Respostas obtidas a partir de teste de *Kruskal-Wallis* para a **Área C**.

Tratamento	N	Mediana (pixel)	Posto médio
GRUPO C	20	413357	36,8
GRUPO D	20	0	28,9
GRUPO E	20	0	25,9
GLOBAL	60		30,5

C - Grupo Controle; D - Grupo LTT; Grupo E - β -CTP; H = *Kruskal-Wallis* qui-quadrado; GL – Graus de Liberdade; **P= 0,094**.

Como pode ser observado as Tabelas 1, 2 e 3, não houve diferença significativa entre os grupos. Para a média das medidas da Área A (P = 0,533), Área B (P = 0,403) e Área C (P = 0,094). Pode-se dizer que nas três áreas as respostas em relação à formação óssea foram estatisticamente iguais, uma vez que todas apresentaram $P > 0,05$.

4.2 Produto

4.2.2 Patente

Foi realizado o depósito de pedido de patente de invenção, modelo utilidade no INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial) sob o número do processo: BR 10 2018 004437, expedido no dia 06 de março de 2018, às 12:10h. (Figura 19).

INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

06/03/2018 870180018014
12:10

29409161801710561

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 004437 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: FUNDACAO DE ENSINO SUPERIOR DO VALE DO SAPUCAI

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 23951916000203

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Avenida Prefeito Tuany Toledo, 470 - Bairro Fátima I

Cidade: Pouso Alegre

Estado: MG

CEP: 37550-000

País: Brasil

Telefone: (35) 3449-9218

Fax:

Email: nit@univas.edu.br

PETICIONAMENTO ELETRÔNICO Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 06/03/2018 às 12:10, Petição 870180018014

Petição 870180018014, de 06/03/2018, pág. 1/15

Figura 19- Depósito de pedido de patente de invenção, modelo utilidade no INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial) sob o número do processo: BR 10 2018 004437, expedido no dia 06 de março de 2018, às 12:10h – Petição 870180018014

4 DISCUSSÃO

A reabilitação oral de edêntulos através de implantes dentários apresenta alto índice de sucesso (NAKAMURA *et al.*, 2009). Entretanto, o grande desafio deste procedimento é a sua instalação em regiões com deficiência óssea (CHUNG *et al.*, 2015).

A ROG na cavidade oral tem como objetivo reabilitar áreas com falhas ósseas, para que os implantes dentários sejam instalados com sucesso (KOCHI *et al.*, 2009). A regeneração ocorre através do preenchimento do DTC, tamanho limítrofe que, a partir daí, não cicatrizará completamente ao longo da vida natural (KOCHI *et al.*, 2009; YAZDI *et al.*, 2013).

O substituto ósseo mais efetivo é o osso autógeno, apesar de ter propriedades osteogênicas, osteoindutivas e osteocondutoras, apresentam desvantagens como: limitação da quantidade de osso da área doadora e morbidade na reparação da área doadora (PARK *et al.*, 2007; NAKAMURA *et al.*, 2009; ASVANUND e CHUNHABUNDIT, 2012; YAZDI *et al.*, 2013; KAZANCIOGLU *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2013; MESSORA *et al.*, 2013; BURANAWAT *et al.*, 2014; CHUNG *et al.*, 2015).

Os substitutos ósseos de materiais alogênicos, xenogênicos e sintéticos, são processados em laboratório e dependem principalmente da propriedade osteocondutora para a ROG. Estes substitutos foram propostos para superar as desvantagens associadas aos autógenos (TADIC *et al.*, 2004; CHUNG *et al.*, 2015) porém os alogênicos e xenogênicos, possuem também desvantagens como o potencial em desenvolver resposta imune desfavorável (TADIC *et al.*, 2004).

Os substitutos ósseos nos formatos de grânulos, pastas e pós necessitam de barreiras e membranas (YOUNIS *et al.*, 2014) com a finalidade de proporcionar um arcabouço de sustentação e recobrir a área do enxerto para garantir a ROG (PARK *et al.*, 2007; VUOLA *et al.*, 2001; LEE, *et al.*, 2013; CHUNG *et al.*, 2015).

Os DTCs são produzidos em vários estudos experimentais com a finalidade de estudar e avaliar a ROG. Os ratos são os animais mais utilizados e dentre eles, os da raça Wistar, por apresentarem baixo risco de desenvolverem complicações (KOCHI *et al.*, 2009; VUOLA *et al.* 2001; NAGATA *et al.*, 2010; OZDEMIR *et al.*, 2013; KAZANCIOGLU *et al.*, 2013).

O β -TCP é o tipo de fosfato de cálcio muito utilizado na ROG dos maxilares (SHIRATORI *et al.* 2005). Contudo, o fato deste produto ser importado e ter custo elevado,

inviabiliza a sua utilização na Saúde Pública (valor de 1 frasco de 0,5cc = R\$ 220,00) e o *Lithothamnium calcarium* (Lithonutri[®] - Oceana); utilizado neste experimento e comercializado no valor médio de mercado R\$ 70,00 um saco de 25Kg.

As HA das cascas de ovos e conchas marinhas (LEE *et al.*, 2014), assim como o Nácar (ASVANUND e CHUNHABUNDIT, 2012) e outras algas marinhas também foram avaliadas como substitutos ósseos obtendo resultados em uma nova formação de tecido ósseo na ROG (ZHOU *et al.*, 2013).

5.1 Aplicabilidade

Estes estudos acima mencionados, impulsionaram a realização desta pesquisa experimental inédita, para investigar as propriedades osteocondutiva da alga LTT, comparando-a ao coágulo e ao substituto ósseo β -TCP nos DTCs, produzidas em calvária de rato. Os resultados estatísticos, do presente estudo demonstraram houve uma nova formação de tecido ósseo e que não ocorreu significância entre nos três DTCs.

As constatações obtidas com os resultados do presente estudo vislumbram perspectivas de novos estudos experimentais e futuramente clínicos, com finalidade de definir o produto (LTT) como biomaterial sintético, indicado para enxerto em maxila e mandíbula, como também depositar patente de modelo de utilidade.

Desta maneira, possibilita a reabilitação oral através de prótese suportada em implantes dentários ósseo integráveis aos paciente que tenha uma perda significativa de tecido ósseo nos maxilares.

Considerando ainda que a Plataforma Continental Brasileira: a) detém um dos maiores depósitos de algas calcárias do mundo; b) existe uma grande disponibilidade de alga LTT no mercado brasileiro e c) tem custo acessível, possibilitando uma relevância social e econômica da presente pesquisa.

5.2 Impacto para a sociedade

A alga LTT é largamente encontrada no litoral brasileiro, o que proporciona facilidade para encontrar o produto e o torna acessível financeiramente.

A potencial possibilidade da utilização da alga LTT como enxerto sintético em ROG, poderá determinar impacto social, porém, a relevância do seu uso, suplanta o social e passa a ser sócio econômica. Desse modo, o presente estudo, determinou um avanço no quesito popularização da ciência e tecnologia, produzindo tanto conhecimento, quanto produto para a sociedade.

6 CONCLUSÃO

A Alga *Lithothamnium caucareum* (LTT) promoveu a regeneração óssea guiada (ROG) no modelo experimental estudado.

7 REFERÊNCIAS

Asvanund P, Chunhabundit P. Alveolar bone regeneration by implantation of nacre and b-tricalcium phosphate in guinea pig. *Implant Dentistry*. 2012;21(3):248-253.

Buranawat B, Silvio LD, Deb S, Nannmark U, Sennerby L e Palmer RM. Evaluation of a b-Calcium Metaphosphate Bone Graft Containing Bone Morphogenetic Protein-7 in Rabbit Maxillary Defects. *J Periodontol*. 2014; 85(2):298-307.

Carlos AC, Sakomura NK, Pinheiro SRF, Toledano FMM, Giacometti R, Silva Jr J. Use of algae *Lithothamnium calcareum* as alternative source of calcium in diets for broiler chicken. *Ciênc. Agrotec*. 2011; 35(4):833-839.

Chung H, Hong J, Jung G, Pang E. The effect of human freeze dried corticocancellous block onlay graft on bone formation in rat calvarium - *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2015; 12(2):113-120.

Kazancioglu HO, Ezirganli S, Aydin MS. Effects of laser and ozone therapies on bone healing in the calvarial defects. *The Journal of Craniofacial Surgery*. 2013; 24(6):2141-2146.

Kochi G, Sato S, Fukuyama T, Morita C, Honda, DDS, Arai Y e Ito K. Analysis on the guided bone augmentation in the rat calvarium using a microfocus computerized tomography analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009; 107(6):42-48.

Lee, JH, Ryu MY, Baek H, Lee KM, Seo J e Lee H. Fabrication and evaluation of porous beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite (60/40) composite as a bone graft extender using rat calvarial bone defect model. *The Scientific World Journal*; 2013: 1-9 <http://dx.doi.org/10.1155/2013/481789>. Último acesso em 20/12/17.

Lee, SW, Balázs C, Balázi K, Seo D, Kim H Sun, Kim C e Kim S. Comparative study of hydroxyapatite prepared from seashells and eggshells as a bone graft material. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2014; 11(2):113-120.

Messora M, Braga L, Oliveira G, Oliveira LF, Milagres, Kawata L, Furlaneto F, Pola N, Campos N e Nagata M. Healing of fresh frozen bone allograft with or without platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rats. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*. 2013; 15(3):438-447.

Nagata, MJ, Messora M, Pola N, Campos N, Vieira R, Esper LA, Sbrana M, Fucini S, Garcia V e Bosco A. Influence of the ratio of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma

on bone healing in critical-size defects: a histologic and histometric study in rat calvaria. J Orthop Res. 2010; 28:468-473.

Nakamura T, Shiota M, Kihara, Yamashita Y e Kasugai S. Effects of granule size and surface properties of red algae-derived resorbable hydroxyapatite on new bone formation. J Oral Tissue Engin. 2009; 6(3):167-179.

Ozdemir H, Toke H, Balcı H, Ozer H. Effect of ozone therapy on autogenous bone graft healing in calvarial defects: a histologic and histometric study in rats. J Periodont Res. 2013; 48:722-726.

Park, YM, Ryu, SY. Stevens, R., PARK, H.C.; Preparation of whisker shaped hydroxyapatite / β -tricalcium phosphate composite; Materials Chemistry and Physics. 2007;10(3):440-447

Shiratori K, Matsuzaka K, Koire Y, Murakami S, Shimono M e Inque T. Bone formation in β - tricalcium phosphate-filled bone defects of the rat femur: morphometric analysis and expression of bone related protein m RNA. Biomedical Research. 2005; 26(2):51-9.

Taddeia SRA, Madeira MFM, Lima ILA, Queiroz Jr. CM e Moura AP, Oliveira DD, Andrade Jr. I, Souza DG, Teixeira MM e Silva TA. Effect of *lithothamnium sp* and calcium supplements in strain and infection induced bone resorption. Angle Orthod. 2014; 84:980-988.

Tadic D, Epple M. A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. Elsevier Ltd. 2004; 25(6):987-994.

Vasconcelos Y. Fertilizante marinho. Pesquisa Fapesp 2012; 197:62-65.

Vuola J, Bähling T, Göransson H e Puolakkainen Pauli. Transforming growth factor released from natural coral implant enhances bone growth at calvarium of mature rat. J Biomed Mater Res 2002; 59(1):152-159.

Yazdi, FK, Mostaghni E, Moghadam SA, Faghihi S, Monabati A, Amid R. A Comparison of the Healing Capabilities of Various Grafting Materials in Critical-Size Defects in Guinea Pig Calvaria. Int J Oral Maxillofac Implants 2013; 28(5):1370-1376.

Younis, M, Elshaha A, Elhabbaa G, Fareed e Safe Ikram. Onlay Bone Graft Maintenance Using Guided Bone Regeneration, Platelet Rich Plasma, and Their Combination J Craniofac Surg. 2014; 25(6): 2237-2240.

Zhou AJ, Clokie CML e Peel SAF. Bone Formation in Algae-Derived and Synthetic Calcium Phosphates With or Without Poloxamer. *J Craniofac Surg* 2013; 24(24):354-359.

NORMAS ADOTADAS

Normas para elaboração do Trabalho de Conclusão de Curso do Mestrado Profissional em Ciências Aplicadas à Saúde. [acesso em 20 mar. 2018]. Disponível em: http://www.univas.edu.br/mpcas/menu/documentos_uteis.asp

8 APÊNDICE

8.1 APÊNDICE 1: Produtos Utilizados



Lithothamnium caucarium - Lithonutri[®] (Oceana - Brasil)

Fonte: site- www.oceanabrasil.com.br



Cerasorb[®] – β Tricálcio Fosfato (β -CTP) Riemsers

9 ANEXO

9.1 ANEXO 1. Parecer de aprovação do CEUA



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS PROTOCOLO: 266/17

TÍTULO: "AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO REPARO ÓSSEO COM A ALGA Lithothamnium Calcareum e TRICALCIO DE FOSFATO NO PREENCHIMENTO DE FALHA ÓSSEA: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS."

PESQUISADOR: Prof. Dr. José Dias da Silva Neto

Acadêmico: Mestrando FRANCISCO AZEVEDO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Vale do Sapucaí, reunidos em 18 de fevereiro, após analisar o projeto de pesquisa acima descrito votou por sua **APROVAÇÃO**.

Diante deste parecer o pesquisador deverá apresentar **01 Relatório Final das atividades da pesquisa conforme o cronograma apresentado**.

Pouso Alegre, 05 de abril de 2017.


Profª. Dênia Amélia Novato Von Castelli Atzingen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

Universidade do Vale do Sapucaí – CNPJ n.º 23.951.916/0002-03
Unidade Fátima – Av. Prefeito Tuany Toledo, 470 - Fátima I - Tel: (35) 3449-9269/ 9232 - e-mail: posgraduacao@univas.edu.br

FONTES CONSULTADAS

- Dicionário Aurélio de Português Online: <https://dicionariodoaurelio.com/>.
- DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. Disponível em: <http://www.decs.bvs.br>.
- Tufano D. Michaelis – Guia Prático da Nova Ortografia: Saiba o que mudou na Ortografia Brasileira. 1a edição São Paulo: Melhoramentos; 2008. 32p.
- PubMed: ncbi.nlm.nih.gov.
- Bireme: base.bireme.br.
- Periódicos Capes.
- ScIELO - Scientific Electronic Library Online: www.scielo.org/.
- Lilacs.