



Artigo original

Efeito adverso do beta-fosfato tricálcico com controle de potencial zeta no reparo de defeitos críticos em calvária de ratos[☆]



Daniel Falbo Martins de Souza, Luciana Correa, Daniel Isaac Sendyk, Rafael Augusto Burim, Maria da Graça Naclério-Homem e Maria Cristina Zindel Deboni*

Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 22 de junho de 2015

Aceito em 7 de julho de 2015

On-line em 23 de dezembro de 2015

Palavras-chave:

Regeneração óssea

Ratos Wistar

Materiais biocompatíveis

Potencial zeta

R E S U M O

Objetivo: Avaliar se um novo cimento bifásico composto por sulfato de cálcio e beta fosfato tricálcico com controle de potencial zeta poderia induzir ou conduzir a neoformação óssea em defeitos críticos.

Métodos: Foi feito um defeito crítico de 8 mm de diâmetro na calvária de 40 ratos Wistar machos. No grupo teste (n=20) os defeitos foram preenchidos pelo cimento. No grupo controle (n=20) os defeitos não foram preenchidos, permaneceu apenas o coágulo. Os animais sofreram eutanásia em 7, 14, 21 e 42 dias do pós-operatório. Espécimes da calvária foram microtomografados e posteriormente preparados para análise histológica. As análises incluíram a avaliação morfológica da histopatologia do reparo e a avaliação morfométrica da área de formação das trabéculas ósseas comparativamente entre os grupos e coloração histoquímica por meio da fosfatase tartrato-resistente (TRAP) para identificação de osteoclastos.

Resultados: As imagens microtomográficas dos defeitos preenchidos pelo cimento não apresentaram diminuição da área de acordo com a progressão dos períodos pós-operatórios. No grupo teste houve permanência do material e resposta corpo estranho até os últimos períodos de observação. A histomorfologia mostrou agrupamentos mais expressivos de células gigantes no grupo teste e osso neoformado mais maduro no grupo controle e comprovou a presença de material exógeno. Na histomorfometria, a área total de neoformação óssea foi significativamente maior (p=0,009) e crescente no grupo controle. As células gigantes apresentaram expressão histoquímica positiva para TRAP e não foram observados osteoclastos.

Conclusão: O cimento cerâmico não induziu ou conduziu a neoformação óssea sob o ponto de vista microtomográfico e histológico.

© 2015 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

[☆] Trabalho desenvolvido no Departamento de Cirurgia, Prótese e Traumatologia Bucocomaxilofacial, Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil.

* Autor para correspondência.

E-mail: mczdebon@usp.br (M.C.Z. Deboni).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbo.2015.07.007>

0102-3616/© 2015 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

Adverse effect of beta-tricalcium phosphate with zeta potential control in repairing critical defects in rats' calvaria

A B S T R A C T

Keywords:

Bone regeneration
Rats, Wistar
Biocompatible materials
Zeta potential

Objective: To evaluate whether a new biphasic cement composed of calcium sulfate and beta tricalcium phosphate with zeta potential control could induce or lead to bone neoformation in critical defects.

Methods: A critical defect of diameter 8 mm was made in the calvaria of forty male Wistar rats. In the test group (n=20), the defects were filled with cement. In the control group (n=20), the defect was not filled and only coagulum was present. The animals were sacrificed 7, 14, 21 and 42 days after the operation. Calvaria specimens were subjected to microtomography and were then prepared for histological analysis. The analyses included morphological assessment on the histopathology of the repair; comparative morphometric evaluation of the area of formation of bone trabeculae between the groups; and histochemical staining by means of tartrate-resistant phosphatase (TRAP) in order to identify osteoclasts.

Results: Microtomographic images of the defects filled by the cement did not show any decrease in area over the course of postoperative evolution. In the test group, the material continued to present a foreign-body response until the last observational periods. Histomorphological analysis showed that there were more significant groupings of giant cells in the test group and greater maturity of neoformed bone in the control group. Exogenous material was also present. Histomorphometric analysis showed that in the control group, the total area of bone neoformation was significantly greater (p=0.009) and grew progressively. The giant cells presented a positive reaction to TRAP but no osteoclasts were observed.

Conclusion: The ceramic cement did not induce or lead to bone neoformation from the microtomographic or histological point of view.

© 2015 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introdução

O enxerto autógeno ainda é o material de escolha para a reconstrução das perdas de tecido ósseo em ortopedia e na cirurgia bucomaxilofacial. No entanto, o aumento no tempo operatório, o traumatismo cirúrgico e as possíveis complicações inerentes à abordagem da área doadora nem sempre o tornam viável. Novos biomateriais e substâncias que possam imitar as características inerentes ao tecido ósseo autógeno têm sido uma busca constante da bioengenharia.

Dentre os materiais aloplásticos mais usados na atualidade encontram-se as biocerâmicas, principalmente a hidroxiapatita e o beta-fosfato tricálcico (β -TCP). Esse último apresenta uma biodegradação mais rápida do que a hidroxiapatita e em algumas situações essa pode ser uma característica mais vantajosa como biomaterial, principalmente quando não há necessidade de resistência mecânica. Além disso, o beta-fosfato tricálcico tem sido muito usado como carreador ou arcabouço em engenharia tecidual.

Recentemente, um material cerâmico bifásico composto por sulfato de cálcio e beta-fosfato tricálcico com carga de superfície negativa, denominada controle de potencial zeta, foi lançado no mercado internacional com a proposta de tornar o beta-fosfato tricálcico um substituto ósseo indutivo e assim favorecer a regeneração óssea.¹ De acordo com o fabricante,² essa cerâmica é totalmente sintética e tem o que

denominaram de porosidade inteligente, o que facilitaria o crescimento celular e a distribuição de nutrientes da matriz extracelular internamente nas macroporosidades desse composto. Uma capacidade intensa de regeneração óssea em defeitos vertebrais em ovelhas foi demonstrada por alguns autores.¹

O potencial osteogênico desse composto, entretanto, tem sido questionado. Alguns autores se mostraram apreensivos quanto à segurança biológica desse produto.³ Outros pesquisadores⁴ suspenderam prematuramente ensaios clínicos devido ao aparecimento de efeitos adversos inesperados, como inflamação asséptica e atraso na reparação. A literatura é escassa sobre a análise do comportamento biológico desse novo biomaterial no reparo ósseo em estudos *in vivo*.

Nesse contexto, propusemos um estudo *in vivo* para analisar, do ponto de vista microtomográfico e histológico, se esse composto biocerâmico pode induzir ou conduzir a neoformação óssea, em modelos de defeito crítico em calvária de ratos.

Material e métodos

Procedimento experimental

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) institucional sob o protocolo

número 006/2014 e de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL).

Quarenta (40) ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, com peso entre 200 g e 250 g e idade aproximada de 45 dias, foram operados sob anestesia geral feita por injeção por via intramuscular, na pata traseira direita de cada animal, do anestésico cloridrato de cetamina (Dopalen[®], Vetbrands), na dose de 0,8 mg/kg, associado ao relaxante muscular cloridrato de xilazina (Rompum[®], Bayer) na dose de 0,3 mg/kg. Todos os animais receberam profilaxia antibiótica pela injeção intramuscular de benzilpenicilina benzatina (Roche[®]) na dose de 150.000 UI/kg. Após tricotomia, seguida de antisepsia da pele com digluconato de clorexidina a 2%, foi feito um acesso à calvária por meio de uma incisão retilínea de 2 cm na pele da região mediana do crânio, que se estendeu da região nasofrontal até a protuberância occipital. A pele, o tecido subcutâneo, o músculo temporal e o periósteo foram divulsionados lateralmente. Um defeito ósseo foi confeccionado na região central da calvária dos animais por meio de uma broca trefina em aço de 8 mm de diâmetro (Sistemas de Implantes Nacionais – SIN[®]), adaptada a um contra-ângulo em motor de implante (Driller[®] – Carapicuíba – São Paulo) sob baixa rotação e irrigação constante por soro fisiológico a 0,9%. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: Grupo teste (n=20), que recebeu cimento composto de beta fosfato tricálcico (β -TCP) e sulfato de cálcio na proporção de 1:1 (geneX[®] – Biocomposites[®] – Staffordshire – Inglaterra) para preenchimento do defeito crítico na calvária na quantidade de 25 mm³ por defeito, e Grupo controle (n= 20), que permaneceu com o defeito crítico preenchido apenas por coágulo. A síntese da pele foi feita com fio de seda 3-0 (Ethicon[®]). Durante todo o período da pesquisa, os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, ventiladas, forradas com maravalha de madeira esterilizada, com ciclo dia/noite de 12/12 horas, e alimentados por meio de ração para roedores (Labina for Rodents, Purina[®]) e água *ad libitum*.

Cinco animais de cada grupo sofreram eutanásia em câmara de CO₂ nos períodos de 7, 14, 21 e 42 dias pós-operatórios. Após a eutanásia, os crânios foram dissecados e fragmentos representativos da calvária com a região do defeito foram fixados em formol tamponado a 10%.

Previamente ao processamento e à análise histológica, um espécime de um rato do Grupo Teste e de um rato do Grupo Controle em cada um dos períodos do estudo foram microtomografados em um microtomógrafo SkyScan 100 kV–100 μ A no Departamento de Fisiologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo. As amostras foram posicionadas e fixadas à sela do aparelho, que foi ajustado para uma resolução de 2.000 \times 2.000 pixels e cortes com 16 μ m de espessura. O tempo de aquisição das imagens foi de aproximadamente duas horas por amostra. As imagens foram analisadas e reconstituídas em duas e três dimensões, por meio do software InVesalius (Divisão de Tecnologias Tridimensionais do Centro de Tecnologia da Informação de Campinas – São Paulo). O volume do biomaterial foi quantificado em milímetros cúbicos (mm³). Nas imagens bidimensionais as distâncias axial e sagital do defeito ósseo e a distância tridimensional axial foram mensuradas em milímetros (mm).

Para o processamento histológico, os espécimes (n=5) de cada grupo e período de observação pré-operatório foram imersos em solução de EDTA 10% (pH 7,4) durante seis semanas para descalcificação do tecido ósseo. A região do defeito foi seccionada ao meio, exatamente no plano sagital mediano da calvária do rato, o que resultou em duas partes da ferida: o lado esquerdo e o direito (L1 e L2). Cada lado do defeito foi incluído em parafina e, posteriormente, quatro cortes parassagitais com 4,5 cm de espessura foram obtidos e corados por tricrômio de Masson. Os cortes histológicos foram avaliados em um microscópio de luz convencional (Olimpus[®] CH2, Olympus Optical Co. Ltd, Japan) de forma cega por um patologista experiente. Os aspectos histomorfológicos consideraram a presença das seguintes características do reparo: edema, infiltrado inflamatório, tecido de granulação, hemorragia/coágulo, neoformação óssea, reação de corpo estranho e presença de material exógeno. Os parâmetros foram ponderados por meio de uma escala arbitrária pelos seguintes escores: 0 = ausente; 1 = discreto; 2 = discreto a moderado; 3 = moderado a intenso e 4 = intenso.

A análise histomorfométrica foi usada para quantificar a área de tecido ósseo neoformado em cortes selecionados aleatoriamente em ambas as metades (direita e esquerda) em três regiões da ferida, a região anterior (próxima ao osso nasal), a região central e a região posterior (próxima ao osso occipital). Foram obtidas imagens histológicas de cada região em aumento original de 40x por meio de uma câmera tipo CCD (Sony[®]) acoplada a um microscópio (Jeol[®]) e a uma placa de digitalização de imagens (Captivator[®]). Em seguida, essas imagens foram transferidas para um programa de morfometria digital (ImageJ, NIH – National Institute of Health). A formação das trabéculas ósseas neoformadas foi identificada e delimitada com a ferramenta *hand free* do software. As mensurações foram executadas em quatro cortes histológicos semisseriados de cada lâmina. O total da área de neoformação óssea total foi obtido em cada campo e somado ao valor obtido do lado oposto da ferida. No fim, a média foi calculada para a área total de tecido ósseo neoformado para cada grupo e período.

A fim de identificar células osteoclásticas, dois cortes randomizados de cada lado da ferida de dois animais de cada grupo foram escolhidos aleatoriamente e submetidos à coloração histoquímica para demonstrar fosfatase ácido târtaro-resistente (TRAP). Os cortes histológicos foram incubados por três horas em temperatura ambiente, em solução com tartarato de sódio, ácido tartárico e sal disódico (SigmaTM). Após a incubação, os cortes foram lavados em água corrente, deixados para secagem ao ar a 25 °C e contra corados por *fast green* a 1% (Fisher Scientific Co.) por aproximadamente um minuto. Como controle positivo dessa reação histoquímica foi usado um corte de fêmur de rato (material parafinado de estoque) que apresentava reparo de ferida óssea. Após a coloração, as lâminas foram mantidas em campo escuro para posteriormente ser observadas em microscopia de luz.

Os dados histológicos foram analisados por estatística inferencial não paramétrica pelo teste de Mann-Whitney com o software Biostat 5.0 e adotou-se um nível de significância de 5%.

Tabela 1 – Volume de material remanescente e mensurações bidimensionais, tridimensionais microtomográficas dos defeitos ósseo de acordo com os períodos de observação pós-operatória nos grupos Teste e Controle

Período	Grupo	n	Volume do biomaterial (mm ³)	Distâncias bidimensionais		Distância axial tridimensional (mm)
				axial	sagital	
7 dias	Controle	1	25,11	8,97	8,95	8,96
	Teste	1		8,32	8,16	9,39
14 dias	Controle	1	10,96	9,46	9,41	9,50
	Teste	1		7,72	10,81	7,34
21 dias	Controle	1	7,00	8,41	8,58	8,15
	Teste	1		7,77	9,55	9,51
42 dias	Controle	1	11,64	8,75	8,56	9,06
	Teste	1		9,88	11,51	11,10

Resultados

Os resultados da análise das imagens microtomográficas estão expressos na [tabela 1](#) e na [figura 1](#). A intensidade em níveis de cinza do biomaterial era próxima à do osso, porém o biomaterial apresentava granularidade, o que permitiu diferenciá-lo do osso.

A análise histológica quanto à morfologia do reparo está expressa na [tabela 2](#) e os aspectos histológicos principais estão na [figura 2](#). A [figura 3](#) apresenta o resultado da coloração para TRAP (fosfatase ácido târtaro-resistente) no grupo teste no período de 42 dias do pós-operatório.

Os resultados da análise histomorfométrica da área de neoformação óssea estão apresentados na [figura 4](#).

Discussão

A literatura descreve que os fosfatos de cálcio e seus derivados, dentre eles o beta-fosfato tricálcico, agem mais diretamente sobre os osteoblastos e vêm sendo bastante estudados como substitutos ósseos, já há mais de duas décadas, por promover neoformação óssea por osteocondução e por apresentar boa biocompatibilidade.⁵⁻⁷ Os seus efeitos como arcabouço inorgânico para regeneração do tecido ósseo já estão bem documentados, inclusive em lesões odontológicas,⁸⁻¹¹ apesar de achados ainda controversos, que variam desde neoformação óssea superior à observada em enxertos autógenos¹² e a enxerto de osso bovino inorgânico,¹³ até evidências robustas de osteogênese insuficiente.^{14,15}

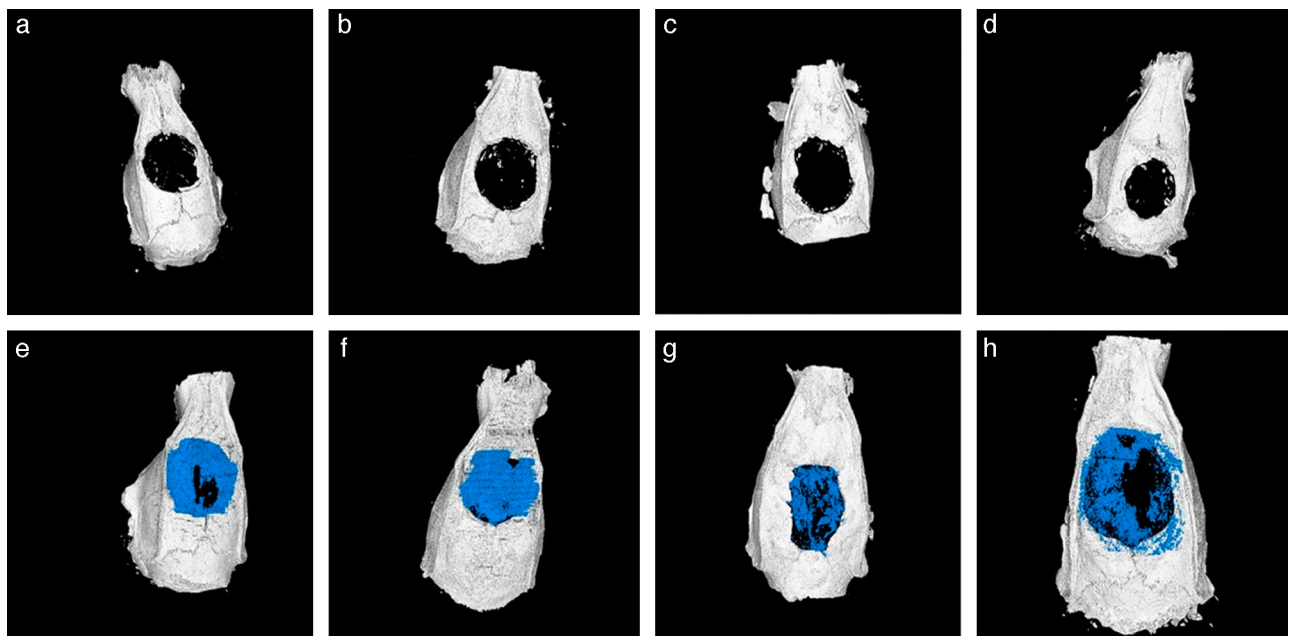


Figura 1 – Vista coronal dos defeitos em calvária reconstruída por MicroCT nos grupos controle e teste de acordo com os períodos de observação. Em (a) 7 dias, (b) 14 dias, (c) 21 dias e (d) 42 dias do pós-operatório no Grupo Controle apresentam a imagem do defeito sem neoformação óssea. Em (e) 7 dias, (f) 14 dias, (g) 21 dias e (h) 42 dias do pós-operatório no Grupo Teste demarcadas em azul volume remanescente do cimento de β TCP.

Tabela 2 – Valores das medianas [max-mim] das intensidades dos escores para as variáveis histológicas do defeito ósseo

Variáveis	7 dias			14 dias			21 Dias			42 Dias		
	Controle	Teste	p	Controle	Teste	p	Controle	Teste	p	Controle	Teste	p
Edema	2 [2-1]	1[2-1]	0,22	2[2-1]	1[1-0]	0,075	1[1-0]	1[1-0]	1	0[2-0]	0[1-0]	0,916
Infiltrado inflamatório	1[2-1]	4[4-4]	0,004	1[3-1]	4[4-3]	0,008	1[1-0]	4[4-4]	0,003	1[1-0]	4[4-3]	0,006
Tecido de granulação	3[4-3]	3[3-2]	0,212	2[3-1]	4[4-3]	0,011	1[1-1]	2[3-2]	0,004	1[2-1]	1[1-1]	0,317
Hemorragia/coágulo	3[3-1]	2[3-1]	0,496	2[3-2]	1[4-0]	0,193	3[3-1]	0[4-0]	0,106	2[3-0]	1[3-0]	0,335
Neoformação óssea	1[2-1]	1[1-1]	0,317	2[2-1]	2[3-1]	0,605	2[3-1]	2[2-1]	0,339	2[3-1]	1[2-1]	0,418
Reação de corpo estranho	0[1-0]	4[4-4]	0,005	1[2-1]	4[4-4]	0,005	0[2-0]	4[4-3]	0,007	1[2-0]	4[4-3]	0,006
Material exógeno	0[0-0]	4[4-3]	0,007	0[0-0]	4[4-4]	0,005	0[0-0]	2[3-2]	0,005	0[0-0]	3[4-2]	0,008

0, ausente; 1, discreto; 2, discreto a moderado; 3, moderado a intenso; 4, intenso.

P valores para teste de Kruskal-Wallis. Significativo quando $p < 0,05$.

Teste de Mann-Whitney significativo quando $p < 0,05$.

O biomaterial usado neste estudo (GeneX[®]) é relativamente novo e se trata de um composto cerâmico preparado com controle de carga de superfície negativa. As investigações acerca de sua eficácia têm se voltado mais frequentemente para o reparo de defeitos da coluna vertebral ou de outros ossos longos.¹⁶ Yang et al.¹ demonstraram em um estudo *in vivo* que essa cerâmica promoveu formação óssea superior em defeitos vertebrais em oito semanas quando comparada com o uso de um cimento polimérico (polimetilmetacrilato). Entretanto, em suas conclusões assumem que a cerâmica de β -TCP ainda precisa ser mais bem estudada.

Como a proposta do fabricante foi inserir um tratamento de superfície nas partículas da cerâmica que possibilitasse a

osteoidução, um modelo de defeito ósseo crítico forneceria informações importantes se a neoformação óssea ocorresse onde ela não seria esperada. Esse tipo de modelo é bastante descrito na literatura e está de certa forma consagrado para esse tipo de ensaio *in vivo*.¹⁷⁻²⁴ Usamos o modelo de defeito crítico em calvária de ratos pela facilidade de confecção, reprodutibilidade e pelo fato de que em 8 mm de extensão o defeito permitiria verificar a ocorrência de osteocondução ou indução do material de forma padronizada e confiável.

Contrariamente ao resultado favorável descrito por pesquisadores alemães,²⁵ nossos resultados não mostraram neoformação óssea após inserção desse composto cerâmico em defeitos de preenchimento. O cimento com controle

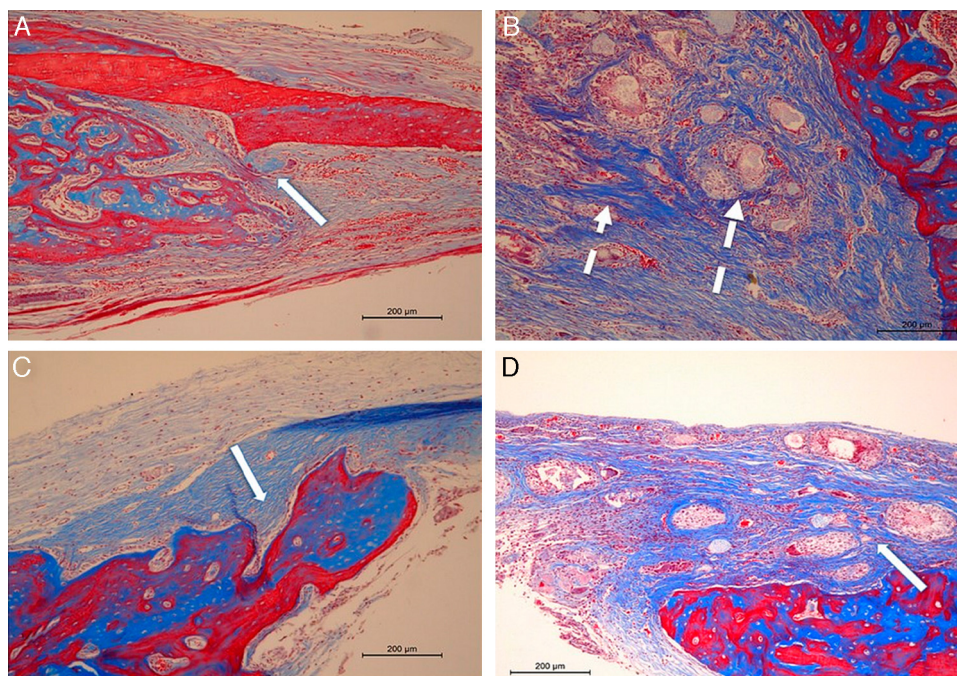


Figura 2 – Cortes histológicos representativos dos defeitos críticos de cada grupo nos períodos de 21 e 42 dias do pós-operatório. Em (A) Grupo Controle – 21 dias exibe-se deposição de matriz colagênica e osteoide adjacente à borda do defeito (seta). Em (B) Grupo Teste – 21 dias exibem-se agrupamentos de material exógeno (seta longa) encapsuladas por intensa deposição de tecido conjuntivo fibroso (seta curta). Em (C) Grupo Controle – 42 dias exibe-se deposição óssea de osso maduro e imaturo nas bordas do defeito (seta). Em (D) deposição intensa de tecido conjuntivo fibroso e agrupamentos de material exógeno e ninhos de células gigantes adjacentes (seta) (Coloração por tricrômio de Masson, aumento original objetiva 2,5 X).

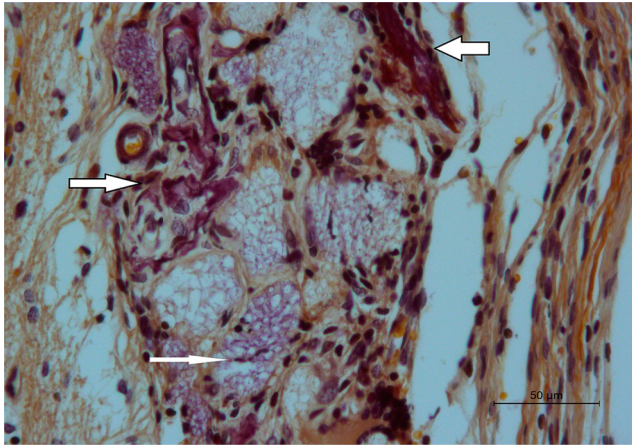


Figura 3 – Expressão positiva da fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP) das células gigantes multinucleadas (setas largas) adjacentes aos agrupamentos de material exógeno (setas finas) – Grupo Teste período 42 dias (Coloração por TRAP, aumento original objetiva 40x).

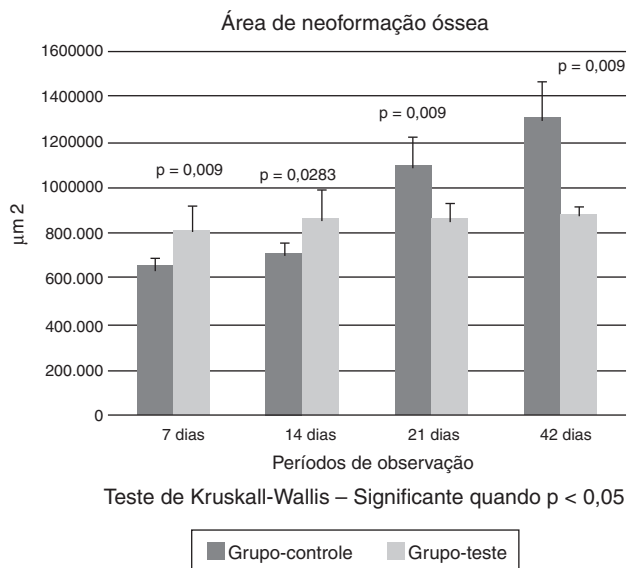


Figura 4 – Análise histomorfométrica para a área (µm²) de neoformação óssea quanto aos grupos e períodos. Médias (± desvio padrão).

de potencial zeta não estimulou a neoformação óssea nos defeitos críticos confeccionados em calvária de ratos nem tampouco mostrou uma rápida reabsorção pelo volume de material exógeno observado nas imagens microtomográficas em todos os períodos.

Recentemente Saadoun et al.³ e Friesenbichler et al.⁴ mostraram complicações importantes desse biomaterial sobre os tecidos quando usados para o preenchimento de defeitos ósseos em ensaios clínicos. Embora Laycock e Cooper²⁶ tenham atribuído que esses efeitos adversos descritos tenham sido causado pelo uso ainda inadequado do biomaterial.

Obviamente, a presença de um infiltrado inflamatório significativamente maior no Grupo Teste está diretamente relacionada com a maior resposta a corpo estranho presente

quando comparado com o Grupo Controle. O fato de a resposta do corpo estranho permanecer por todo o período do experimento pode levar à formação de agrupamentos de material que de forma encapsulada deverão ser expulsos da região da ferida. Esse fato pode contribuir para a explicação da descrição dos “cistos de tecido mole” feita por Friesenbichler et al.⁴

A relevância clínica deste estudo deve ser ressaltada sob o ponto de vista histopatológico, pois ainda não existiam estudos pré-clínicos experimentais padronizados que revelassem o comportamento desse material sobre o reparo do tecido ósseo saudável.

Conforme os achados histomorfométricos, a proposta de uma neoformação óssea mais significativa no Grupo Teste também não foi comprovada. Os resultados mostram que formação óssea foi mais intensa e significativamente maior no Grupo Controle e negaram nossa hipótese de tentar comprovar o potencial osteoindutivo prometido pelo fabricante. Os resultados mostraram que a superioridade na formação óssea no controle leva-nos a acreditar que esse composto cerâmico impediu a pouca formação óssea que iria ocorrer no defeito.

Nossos resultados estão de acordo ainda com o de outros autores,^{27,28} segundo os quais a aplicação de outros tipos de beta-fosfatos tricálcicos para reparo de perda óssea, em defeitos menores e estudos cruzados no mesmo animal, também não influenciou a quantidade de neoformação óssea.

Para nos certificarmos que poderia haver uma maior osteoclastogênese e maior reabsorção óssea, foi feita reação histoquímica pela coloração de TRAP na região da ferida. Entretanto, foram as células gigantes da resposta corpo estranho que mostraram positividade para esse marcador bioquímico. Isso pode levar à hipótese de que o material no tecido possa possivelmente ter induzido sinalizações bioquímicas específicas. Assim, provavelmente as células gigantes na tentativa de reabsorver material exógeno também possam ter reabsorvido osso. Para que esse fato seja mais bem explicado, estudos que mostrem a expressão de outros marcadores específicos relacionadas ao reparo e à indução de formação de tecido ósseo poderiam ser realizados.

No momento em que esta pesquisa foi planejada, esperávamos encontrar efeitos benéficos do GeneX[®] na regeneração óssea, sobretudo considerando que esse material apresentava relatos favoráveis em aplicações clínicas. No fim, nossos resultados são relevantes, porque ratificam que esse tipo de cerâmica deva ser repensado como substituto ósseo.

Conclusão

Nos limites deste estudo, o cimento cerâmico bifásico composto por sulfato de cálcio e beta-fosfato tricálcico com potencial zeta não induziu ou conduziu a neoformação óssea de defeitos ósseos críticos de 8 mm criados em calvária de ratos sob o ponto de vista microtomográfico e histológico.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Prof. Dr. Jorge Vicente Lopes da Silva e ao Sr. Paulo Henrique Junqueira Amorim - CTI Renato Archer - Divisão de tecnologias Tridimensionais - Campinas - SP - Brasil, pelo processamento e análises de imagens 3D.

REFERÊNCIAS

1. Yang HL, Zhu XS, Chen L, Chen CM, Mangham DC, Coulton LA, et al. Bone healing response to a synthetic calcium sulfate/ β -tricalcium phosphate graft material in a sheep vertebral body defect model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012;100(7):1911-21.
2. Biocomposites L. GeneX®. Injectable bone graft with ZPC. Biocomposites, Ltda. [Citado 15 fe. 2014]. Disponível em: <http://www.biocomposites.com/ortho/Genex2.asp>.
3. Saadoun S, Macdonald C, Bell BA, Papadopoulos MC. Dangers of bone graft substitutes: lessons from using GeneX. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011;82(8):e3.
4. Friesenbichler J, Maurer-Ertl W, Sadooghi P, Pirker-Fruehauf U, Bodo K, Leithner A. Adverse reactions of artificial bone graft substitutes: lessons learned from using tricalcium phosphate geneX®. *Clin Orthop Relat Res*. 2014;472(3):976-82.
5. Pioletti DP, Takei H, Lin T, Van Landuyt P, Ma QJ, Kwon SY, et al. The effects of calcium phosphate cement particles on osteoblast functions. *Biomaterials*. 2000;21(11):1103-14.
6. Handschel J, Wiesmann HP, Stratmann U, Kleinheinz J, Meyer U, Joos U. TCP is hardly resorbed and not osteoconductive in a non-loading calvarial model. *Biomaterials*. 2002;23(7):1689-95.
7. Matsumoto G, Omi Y, Kubota E, Ozono S, Tsuzuki H, Kinoshita Y, et al. Enhanced regeneration of critical bone defects using a biodegradable gelatin sponge and beta-tricalcium phosphate with bone morphogenetic protein-2. *J Biomater Appl*. 2009;24(4):327-42.
8. Aguirre Zorzano LA, Rodríguez Tojo MJ, Aguirre Urizar JM. Maxillary sinus lift with intraoral autologous bone and B-tricalcium phosphate: histological and histomorphometric clinical study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2007;12(7):E532-6.
9. Ortega EV, Mourelo JP, Egea JJS, Perez OP, Soteras RM. La utilización del betafosfato tricálcico como biomaterial en implantología oral. *Rev Periodoncia*. 2007;19(3):141-9.
10. Mourelo JP, Guerra AJ, Guil LM, Egea JJS, Ortega EV. Regeneración ósea guiada con implante unitario con nanosuperficie y betafosfato tricálcico. *Rev Periodoncia*. 2010;22(3):127-37.
11. Zavaglia FC. Síntese, caracterização e processamento de beta fosfato tricálcico para a manufatura de implantes personalizados [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química; 2011.
12. Luvizuto ER, Tangl S, Zanoni G, Okamoto T, Sonoda CK, Gruber R, et al. The effect of BMP-2 on the osteoconductive properties of β -tricalcium phosphate in rat calvaria defects. *Biomaterials*. 2011;32(15):3855-61.
13. Velasco Ortega E, Pato Mourelo J, Segura Egea JJ, Pérez Pérez O, Medel Soteras R. La utilización del beta-fosfato tricálcico como biomaterial en implantología oral. *Avances Periodoncia*. 2007;19(3):141-50.
14. Orii H, Sotome S, Chen J, Wang J, Shinomiya K. Beta-tricalcium phosphate (beta-TCP) graft combined with bone marrow stromal cells (MSCs) for posterolateral spine fusion. *J Med Dent Sci*. 2005;52(1):51-7.
15. Gupta MC, Theerajunyaporn T, Maitra S, Schmidt MB, Holy CE, Kadiyala S, et al. Efficacy of mesenchymal stem cell enriched grafts in an ovine posterolateral lumbar spine model. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2007;32(7):720-6.
16. Liu B, Lun DX. Current application of β -tricalcium phosphate composites in orthopaedics. *Orthop Surg*. 2012;4(3):139-44.
17. Einhorn TA. Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research. *Clin Orthop Relat Res*. 1999; 367 Suppl:S59-67.
18. Cacchioli A, Spaggiari B, Ravanetti F, Martini FM, Borghetti P, Gabbi C. The critical sized bone defect: morphological study of bone healing. *Ann Fac Med Vet Parma*. 2006;26:97-110.
19. Bodde EW, Boerman OC, Russel FG, Mikos AG, Spauwen PH, Jansen JA. The kinetic and biological activity of different loaded rhBMP-2 calcium phosphate cement implants in rats. *J Biomed Mater Res A*. 2008;87(3):780-91.
20. Messori MR, Nagata MJ, Dornelles RC, Bomfim SR, Furlaneto FA, de Melo LG, et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontol Res*. 2008;43(6):723-9.
21. Efeoglu C, Burke JL, Parsons AJ, Aitchison GA, Scotchford C, Rudd C, et al. Analysis of calvarial bone defects in rats using microcomputed tomography: potential for a novel composite material and a new quantitative measurement. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2009;47(8):616-21.
22. Paulo Ade O, Castro-Silva II, Oliveira DF, Machado ME, Bonetti-Filho I, Granjeiro JM. Repair of critical-size defects with autogenous periosteum-derived cells combined with bovine anorganic apatite/collagen: an experimental study in rat calvaria. *Braz Dent J*. 2011;22(4):322-8.
23. Scotchford CA, Shahtaheri M, Chen PS, Evans M, Parsons AJ, Aitchison GA, et al. Repair of calvarial defects in rats by prefabricated, degradable, long fibre composite implants. *J Biomed Mater Res A*. 2011;96(1):230-8.
24. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc*. 2012;7(10):1918-29.
25. Smeets R, Kolk A, Gerressen M, Driemel O, Maciejewski O, Hermanns-Sachweh B, et al. A new biphasic osteoinductive calcium composite material with a negative Zeta potential for bone augmentation. *Head Face Med*. 2009;5:13.
26. Laycock PA, Cooper JJ. Adverse reactions of artificial bone graft substitutes: lessons learned from using tricalcium phosphate geneX®. *Clin Orthop Relat Res*. 2014;472(2):765-6.
27. Gera I, Döri F, Keglevich T, Anton S, Szilágyi E, Windisch P. Experience with the clinical use of beta-tri-calcium phosphate (Cerasorb) as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects. *Fogorv Sz*. 2002;95(4):143-7.
28. Prota R, Da Silva-Júnior VA, Teixeira M, Sobral AP, Emanuel-Dias-de Oliveira e Silva, Da Silveira MM, et al. Histological evaluation of bone repair using β -tricalcium phosphate. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011;16(2):e190-4.