



FUNDAÇÃO EDSON QUEIROZ
UNIVERSIDADE DE FORTALEZA - UNIFOR
VICE-REITORIA DE ENSINO DE GRADUAÇÃO E
PÓS-GRADUAÇÃO – VRE
MESTRADO PROFISSIONAL EM ODONTOLOGIA

NATÁLIA LUCENA DE SOUSA ALBUQUERQUE

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE BARREIRAS SINTÉTICAS
E BLOCOS XENÓGENOS EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS:
UMA ANÁLISE HISTOLÓGICA

Fortaleza – CE
Dezembro, 2023

NATÁLIA LUCENA DE SOUSA ALBUQUERQUE

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE BARREIRAS SINTÉTICAS E
BLOCOS XENÓGENOS EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS:
UMA ANÁLISE HISTOLÓGICA

Projeto de pesquisa apresentado ao
Programa de Mestrado Profissional em
Odontologia da Universidade de Fortaleza
como requisito para qualificação ao Título
de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrés Landázuri del Barrio

Fortaleza - CE

2023

Ficha catalográfica da obra elaborada pelo autor através do programa de geração automática da Biblioteca Central da Universidade de Fortaleza

Albuquerque, Natália Lucena de Sousa.

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE BARREIRAS SINTÉTICAS
E BLOCOS XENÓGENOS EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS: UMA ANÁLISE
HISTOLÓGICA / Natália Lucena de Sousa Albuquerque. - 2023
45 f.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Universidade de
Fortaleza. Programa de Mestrado Profissional Em Odontologia,
Fortaleza, 2023.

Orientação: Ricardo Andrés Landázuri Del Barrio.

1. Regeneração óssea. 2. Materiais biocompatíveis. 3.
Substitutos ósseos. 4. Teste de Materiais. 5. Xenoenxertos.
I. Del Barrio, Ricardo Andrés Landázuri. II. Título.

NATÁLIA LUCENA DE SOUSA ALBUQUERQUE

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE BARREIRAS SINTÉTICAS E
BLOCOS XENÓGENOS EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS:
UMA ANÁLISE HISTOLÓGICA

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Andrés Landázuri del Barrio
Universidade de Fortaleza - UNIFOR

Prof. Dr. Eduardo Diogo Gurgel Filho
Universidade de Fortaleza - UNIFOR

Prof. Dr. Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira
Universidade Federal de Uberlândia - UFU

Aprovada em: 11/12/2023

DEDICATÓRIA

Àquele que está acima de todos nós, que guia nossos passos e ilumina nossos caminhos, Deus. Agradeço a Ele por tudo que sou e tudo que tenho. Reconheço que todos os meus esforços, estudos e conquistas são frutos do seu amor e da sua graça sobre a minha vida. Sua infinita sabedoria e bondade, foi a base essencial para a realização deste sonho que agora se concretiza. Em cada passo desafiador que precisei dar ao longo da minha jornada, pude sentir a presença e proteção de Deus, que sempre estava lá para me dar sustento e confiança. O amor e fé que carrego em meu coração são os pilares que me impulsionam a continuar sabendo que Deus sempre me dará o chão necessário para prosseguir.

Aos meus maravilhosos pais, Jane e Carlos, que me deram a vida e me ensinaram desde cedo o valor do trabalho árduo e a importância dos estudos. Agradecer não é o suficiente para expressar o quanto sou grata pelo amor incondicional, pela dedicação e pelos sacrifícios que fizeram para sempre me proporcionar as melhores oportunidades. Se hoje alcanço este feito, é porque vocês continuamente me encorajaram a alcançar os meus sonhos, acreditando no meu potencial, me incentivando a nunca desistir.

À minha amada família, meu alicerce e motivo diário para seguir em frente, expresso minha eterna gratidão. Meu marido Douglas, meu companheiro de vida, que nunca deixou de acreditar em mim e que sempre esteve presente para me apoiar. Seu amor e cuidado constantes foram as molas propulsoras que me impulsionaram a seguir em frente. Minha filha Nicole e meu filho José Douglas Neto, minhas inspirações para ser a melhor versão de mim mesma, são vocês quem fazem cada esforço valer a pena. Sei que por trás de cada conquista, há o brilho dos seus sorrisos e a certeza de que toda a minha dedicação valeu a pena.

À minha querida irmã Renata e sua família (seu marido Nicholas e meu sobrinho David), que mesmo estando distante, sempre estiveram presentes em meu coração. Seu amor e sua compreensão foram compartilhados mesmo de longe. Espero que em breve possamos celebrar todos juntos essa conquista e que saibam o quanto vocês significam para mim.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha mais sincera gratidão ao meu orientador Professor Dr. Andrés Landázuri, que tem sido uma fonte inesgotável de sabedoria ao longo deste processo. É uma verdadeira honra ter tido o privilégio de conduzir esse trabalho e poder ser orientada por alguém tão habilidoso e inteligente. Sua dedicação em me ajudar e suas técnicas de ensinamento foram fundamentais para o meu desenvolvimento como profissional. Sempre generoso e atento às minhas dúvidas e dificuldades, uma verdadeira inspiração para mim. Muito obrigada!

A todos os professores do Mestrado, Dr. Eduardo Gurgel, Dra. Catarina Machado, Dra. Eveline Turatti, Dra. Polyanna Novais, Dra. Denise Moraes, Dra. Roberta Barroso, durante esses dois anos, estiveram ao meu lado, oferecendo sua orientação, sabedoria e inestimável ajuda. Cada encontro mensal foi uma oportunidade valiosa para aprender e crescer, graças à paciência e dedicação. Sempre dispostos a compartilhar seu conhecimento e experiência. Ensinos que irão me acompanhar ao longo de toda a minha trajetória acadêmica e profissional.

Ao prof Dr. Guilherme Oliveira, pela sua disponibilidade, competência, apoio e direcionamento durante a minha pesquisa e também por aceitar participar da minha banca. Meus sinceros agradecimentos. Seu profissionalismo sempre será lembrado por mim.

Aos amigos Christiano Sampaio, João Victor e Anízia Fernandes por me acompanharem nessa pesquisa. É uma verdadeira honra poder contar com amizades tão valiosas, que estiveram ao meu lado nos momentos de preocupação e nos momentos alegres e descontraídos. Agradeço por compartilharem suas experiências e contribuir para o meu crescimento pessoal e profissional. Desejo que essa amizade perdure e possamos continuar trilhando caminhos, superando desafios e celebrando conquistas.

Aos funcionários do NUBEX, Robson e Rodolfo sempre solícitos e dispostos em me ajudar em todos os momentos que precisei. Foram fundamentais para que meu trabalho fosse executado. Sem esquecer do Prof. Ramon que possibilitou a etapa cirúrgica da pesquisa, apoiando e orientando em cada fase. Muito Obrigada!

Eu sou imensamente grata à UNIFOR, universidade na qual me formei e agora finalizo um mestrado, por sempre ter me proporcionado a orientação, sabedoria e ajuda necessárias para aprimorar meus conhecimentos. Os docentes, a estrutura e os funcionários fizeram uma diferença significativa em minha jornada acadêmica e tenho um imenso orgulho

de ter feito parte da UNIFOR. É uma honra ser aluna desta instituição que sempre valorizou a minha busca constante por conhecimento e me auxiliou a alcançar meus objetivos.

Registro minha profunda gratidão a todos que fazem parte da minha vida, amigos, colegas de profissão, pacientes, parentes, funcionários que de alguma forma contribuíram para que este sonho se tornasse realidade. Sou imensamente grata por cada encorajamento, cada esforço e cada demonstração de amor. Essa é uma pequena homenagem a todos que tornaram possível este momento de vitória e sucesso.

EPÍGRAFE

“Tudo o que fizerem, façam de todo o coração, como para o Senhor, e não para os homens, sabendo que receberão do Senhor a recompensa da herança. É a Cristo, o Senhor, que vocês estão servindo.” Colossenses 3:23-24

RESUMO

A Regeneração Óssea Guiada (ROG) é um modelo terapêutico previsível que possibilita a neoformação óssea através do uso de biomateriais xenógenos e barreiras. O uso de biomateriais osteocondutores e barreiras customizadas tem sido uma alternativa cada vez mais frequente na clínica diária. Com o intuito de proporcionar melhores propriedades biológicas, o presente estudo avaliou a resposta inflamatória de blocos xenógenos e barreiras sintéticas em tecido subcutâneo de ratos mediante uma análise histológica. Catorze animais receberam a inserção subcutânea dos biomateriais na região dorsal, separados em 4 grupos: G1: Bio-Graft® Bio-Oss®, G2: Bonefill® Bioinnovation®, G3: Zircônia e G4: PEEK. Os animais foram eutanasiados nos períodos de 15 (n=7) e 45 dias (n=7). As regiões do dorso do animal contendo os biomateriais foram coletadas e fixadas individualmente em formalina neutra a 10% para preparo histológico e inclusão em resina. Foram processadas com sistema específico para seções não descalcificadas (45 µm). As lâminas foram coradas com fucsina ácida e azul de Stevenel e avaliadas mediante histologia descritiva. No grupo G1 não foram observados processos inflamatórios nos 2 períodos avaliados, diferentemente do G2 que apresentou uma maior reação inflamatória com aspecto sugestivo de reação de corpo estranho. Ambos os grupos G3 e G4 demonstraram reduzido processo inflamatório, sem diferenças significativas, indicando biocompatibilidade e grande potencial para barreiras sintéticas. O Bio-Graft® Bio-Oss® se integrou melhor e causou menos inflamação do que o Bonefill® Bioinnovation®, enquanto o PEEK e Zircônia se mostraram biocompatíveis como barreiras sintéticas.

Palavras-chave: regeneração óssea; materiais biocompatíveis; substitutos ósseos; teste de materiais; xenoenxertos..

ABSTRACT

Guided Bone Regeneration (GBR) is a predictable therapeutic model that enables bone neoformation through the use of xenogeneic biomaterials and barriers. The use of osteoconductive biomaterials and customized barriers has become an increasingly common alternative in daily clinical practice. In order to provide better biological properties, this study evaluated the inflammatory response of xenogeneic blocks and synthetic barriers in the subcutaneous tissue of rats through histological analysis. Fourteen animals received subcutaneous insertion of biomaterials in the dorsal region, divided into 4 groups: G1: Bio-Graft® Bio-Oss®, G2: Bonefill® Bioinnovation®, G3: Zirconia, and G4: PEEK. The animals were euthanized at 15 (n=7) and 45 days (n=7). Dorsal regions containing the biomaterials were collected, fixed in 10% neutral formalin for histological preparation, and embedded in resin. They were processed for non-decalcified sections (45 µm). The slides were stained with acid fuchsin and Stevenel's blue and evaluated through descriptive histology. In the G1 group, no inflammatory processes were observed in the two evaluated periods, unlike G2, where there was a higher inflammatory reaction with a suggestive appearance of a foreign body reaction. Both G3 and G4 groups showed a reduced inflammatory process, with no significant differences, indicating biocompatibility and great potential for synthetic barriers. Bio-Graft® Bio-Oss® integrated better and caused less inflammation than Bonefill® Bioinnovation®, while PEEK and Zirconia proved to be biocompatible as synthetic barriers.

Keywords: bone regeneration; biocompatible materials; bone substitutes; materials testing; heterografts.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Desenho da posição dos grupos experimentais na região subcutânea de cada animal	25
FIGURA 2 – Fotomicrografia histológica grupo G1 (15 e 45 dias)	28
FIGURA 3 – Fotomicrografia histológica grupo G2 (15 e 45 dias)	29
FIGURA 4 – Fotomicrografia histológica grupo G3 (15 dias)	30
FIGURA 5 - Fotomicrografia histológica grupo G3 (45 dias)	31
FIGURA 6 - Fotomicrografia histológica grupo G4 (15 dias)	32
FIGURA 7 - Fotomicrografia histológica grupo G4 (45 dias)	33

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Bio-Graft® (Geistlich®)	21
TABELA 2 - Bonefill® (Bioinnovation®)	22
TABELA 3 – Zircônia	23
TABELA 4 - Tabela do Processo laboratorial de Sinterização da Zircônia	23
TABELA 5 – PEEK	23
TABELA 6 – Grupos testados.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ROG – Regeneração óssea guiada;

NUBEX – Núcleo de Biologia Experimental;

PEEK – Poli-éter-éter-cetona;

CAD – Computer Aided Design (desenho assistido por computador);

3D – Tridimensional;

Zr – Zircônia;

ISO – International Organization for Standardization (Organização Internacional de Normalização);

CEEPA – Comitê de Ética em Pesquisa com Animais;

IM – Intramuscular;

EDTA – Ethylenediamine Tetraacetic Acid (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético);

HE – Hematoxilina-Eosina;

d-PTFE – Politetrafluoretileno (denso);

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4. RESULTADOS	28
5. DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÃO.....	38
7. REFERÊNCIAS	39
8. ANEXOS	45

1. INTRODUÇÃO

A reabilitação oral de regiões desdentadas sempre são um desafio devido a alterações do rebordo alveolar pós exodontia. (ARAÚJO, 2005^a; ARAÚJO, 2005^b; CARDAROPOLI, 2003; SCHROPP, 2003; TAN *et al.*, 2012; COUSO-QUEIRUGA, 2020). Algumas das principais causas da reabsorção do rebordo alveolar são trauma dento-alveolar, exodontias, doença periodontal e uso prolongado de próteses fixas ou removíveis (AYUB *et al.*, 2011; CARDAROPOLI *et al.*, 2008).

O tecido ósseo alveolar pós exodontia em humanos pode sofrer uma redução dimensional horizontal (3.79 ± 0.23 mm) maior que a remodelação vertical (1.24 ± 0.11 mm vestibular, 0.84 ± 0.62 mm mesial e 0.80 ± 0.71 mm distal) em 6 meses. A porcentagem de alteração dimensional vertical pode ser de 11-22% em 6 meses e a porcentagem de alteração dimensional horizontal pode ser de 32% em 3 meses a 29-63% em 6-7 meses (TAN *et al.*, 2012; COUSO-QUEIRUGA, 2020).

Uma das técnicas utilizadas frequentemente para aumento de rebordo alveolar vertical ou horizontalmente é a Regeneração Óssea Guiada (ROG) (URBAN *et al.*, 2013). O conceito de Regeneração Óssea Guiada (ROG) foi introduzido como modalidade terapêutica em 1988, baseado na hipótese de que diferentes células apresentam taxas variadas de migração durante o processo de cicatrização. Nesse estudo, utilizou-se uma técnica de membrana, como uma barreira física para tratar defeitos ósseos em mandíbulas de ratos, impedindo que fibroblastos e outras células do tecido mole, que possuem migração rápida, entrassem no defeito ósseo. Isso possibilitou que células com potencial osteogênico povoassem o defeito, mesmo sendo de migração mais lenta (DAHLIN *et al.*, 1988). Essa técnica utilizou Teflon como membrana de barreira para promover a regeneração óssea. Posteriormente, também associada a implantes dentários (HERMANN, 1996).

A ROG passou então a ser usada na implantodontia para reconstruir áreas atróficas de pacientes parcial ou totalmente edêntulos com o objetivo de obter o volume ósseo suficiente para permitir a instalação de um ou mais implantes em um posicionamento tridimensional ideal, a fim de alcançar um resultado funcional e estético do tecido peri-implantar. Estudos mostram que a ROG apresenta excelentes resultados para aumentos ósseos horizontais e verticais (FICKL *et al.*, 2008; ELNAYEF *et al.*, 2018; URBAN *et al.*, 2019).

O princípio básico da ROG consiste na utilização de uma membrana sobre um defeito ósseo que impeça a migração de células indesejadas, epiteliais e do tecido conjuntivo. A ROG pode ser indicada para manutenção do rebordo ósseo imediatamente após uma exodontia ou juntamente com a instalação de um ou mais implantes preenchendo espaços entre a loja óssea e o implante ou até recuperando paredes ósseas. A membrana de ROG ideal seria aquela com rigidez suficiente para suportar a compressão dos tecidos subjacentes, com grau de plasticidade que permitisse ser contornada e moldada ao formato do defeito. A quantidade de osso regenerado pode ser reduzida se a membrana sofrer colapso para dentro do defeito (ELGALI *et al.*, 2017).

Essa técnica requer princípios biológicos bem definidos para que se obtenha previsibilidade. São eles: fechamento primário da ferida cirúrgica para proteger a ROG de agressões mecânicas e bactérias externas; perfurações ósseas no leito receptor para promover a angiogênese no local; proporcionar um espaço adequado para isolar os osteoblastos de células indesejadas, como as do epitélio e conjuntivo; estabilizar o coágulo e o implante (WANG; BOYAPATI, 2006). Em uma meta-análise de ensaios clínicos comparativos, demonstrou-se a superioridade em ganho ósseo vertical da ROG em relação ao enxerto em bloco (URBAN *et al.*, 2018). Dessa forma, percebe-se que a ROG tem uma função importante na estabilidade a longo prazo das áreas enxertadas, além de ter menor morbidade, menos invasividade, menor necessidade de volume ósseo autógeno e quantidade ilimitada (NAENNI *et al.*, 2019; TROELTZSCH *et al.*, 2016; CHAVDA *et al.*, 2018).

O substituto ósseo ideal deve ser bioreabsorvível, biocompatível, ter propriedades osteogênicas, osteocondutoras e osteoindutoras, fisicamente e quimicamente semelhante ao osso, fornecer cálcio e fósforo, microporoso, fácil de usar, capacidade de manutenção do espaço e estabilidade biomecânica durante o período inicial de cicatrização (AL-RUHAIMI, 2001). Esses materiais são classificados de acordo com sua origem: alógeno, mesma espécie; xenógeno, outra espécie (bovino, equino); ou aloplástico, sintético (TROELTZSCH *et al.*, 2016; STOPA *et al.*, 2018).

Os enxertos xenógenos são obtidos principalmente da espécie bovina, amplamente utilizados nas ROGs devido a sua estrutura ser bem parecida ao osso humano, induzindo a neoformação óssea e uma boa biocompatibilidade (SHEIKH *et al.*, 2017; AMID *et al.*, 2020). Autores sugerem que a sua reabsorção lenta é benéfica para o paciente, já que ajuda a manter o volume da região reconstruída (SANZ; VIGNOLETTI, 2015). Este tipo de biomaterial osteocondutor está disponível na forma de partículas ou em blocos. Os blocos

xenógenos são favoráveis na técnica de ROG devido à sua apresentação, favorecendo o princípio de estabilidade, além de proporcionar um arcabouço osteocondutor, degradação lenta e menor morbidade ao paciente (SANCHEZ-LABRADOR *et al.*, 2021).

A utilização de membranas de barreira para promover a regeneração óssea foi descrita pela primeira vez em 1959 em um estudo conduzido por Hurley *et al.*, (1959) na área médica ortopédica. As membranas e barreiras devem apresentar estabilidade, indispensável no processo regenerativo, evitando micromovimentos que possam prejudicar o processo de osteopromoção. Também devem criar um espaço que previna a migração de células indesejadas, epiteliais e do tecido conjuntivo. Essas características permitem um aumento gradativo de osteoblastos no local e neoformação óssea (PILGER *et al.*, 2020). Além disso, as membranas regenerativas devem ter: biocompatibilidade, com mínima inflamação e ser favorável ao reparo tecidual; não toxicidade ao tecido circundante e ao corpo do organismo; alta tolerância tecidual para garantir integração progressiva e completa com as fibras periodontais; integridade estrutural adequada e boa estabilidade dimensional, ou seja, capacidade da membrana de manter sua forma e posição até a degradação ou remoção; manuseio clínico tolerável, juntamente com tempo de armazenamento adequado; aplicação e modificação simples com parafusos ou suturado; permeabilidade seletiva para prevenir a invasão de células epiteliais, enquanto promove a proliferação de células osteogênicas; manutenção de espaço para células regenerativas; e formação adequada de coágulos sanguíneos para aumentar a angiogênese e a vascularização para regeneração (ALAUDDIN *et al.*, 2022).

As membranas podem ser classificadas como reabsorvíveis ou não-reabsorvíveis. As membranas que não reabsorvem precisam de um outro momento cirúrgico para serem removidas (TOLEDANO-OSORIO *et al.*, 2021). Podem ser maleáveis, como a membrana PTFE densa ou expandida usada em defeitos menores que, mesmo quando exposta parcialmente ao meio bucal, não sofre alterações (TURRI *et al.*, 2021) e as malhas de titânio com bastante resistência mecânica e biocompatibilidade, sendo esta preferível quando em defeitos de maiores dimensões (ROCA-MILLAN *et al.*, 2020). Já as membranas não reabsorvíveis rígidas são chamadas de barreiras, podendo ser confeccionadas e personalizadas para cada tipo de defeito ósseo através da tecnologia CAD e impressão 3D, uma técnica inovadora de alta qualidade e previsibilidade. Estas barreiras são pouco citadas na literatura e podem ser confeccionadas em materiais como Zircônia e PEEK (MANDELLI *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2022).

A Zircônia é uma cerâmica policristalina bastante usada na medicina e odontologia, em próteses e implantes. Suas características principais são alta resistência flexural, mesmo em mínimas espessuras, e ser bioinerte. Apresenta menor adesão do biofilme, menor resposta inflamatória e induz a uma melhor resposta fibroblástica quando comparada ao titânio (MANDELLI *et al.*, 2021). Em um estudo de série de casos, Mandelli *et al.*, (2021) avaliaram clinicamente e histologicamente o uso de barreiras personalizadas de zircônia para ROG em pacientes com perda óssea tridimensional. Os achados mostram uma boa performance clínica, haja vista que mesmo em caso de exposição prematura, não ter havido sinais de infecção, demonstrando que esse tipo de barreira pode ser uma alternativa viável e segura para ROG, diante de sua biocompatibilidade, facilidade de manuseio e personalização. Desde o ponto de vista biológico, a barreira de Zr promove uma excelente formação óssea analisada histologicamente com formação de uma quantidade satisfatória de novo osso. A espessura adequada de uma barreira de ZR deve ser entre 0,7 mm – 1,0 mm para apresentar propriedades mecânicas adequadas.

Por outro lado, o poli-éter-éter (PEEK) é um material polimérico já usado em procedimentos médicos, na área ortopédica e em Odontologia, próteses dentárias e em fixas suportadas por implantes. Devido a sua estrutura química, o PEEK é estável, biocompatível em tecidos biológicos e um material bioinerte adequado para dispositivos médicos, com propriedades limitadas de osseointegração. Além disso, é termicamente estável e as propriedades mecânicas não são afetadas por processos de esterilização ou exposição à radiação. A estrutura da cadeia molecular fornece um polímero linear ou ramificado, classificando o PEEK como um material termoplástico semicristalino, caracterizado como um polímero com alta resistência, dureza e rigidez, mas ainda dúctil em comparação com outros polímeros amorfos e cristalinos (PAPIA *et al.*, 2022). Além disso, o PEEK possui um módulo de elasticidade que reduz o risco de proteção contra estresse (LEE *et al.*, 2012). Em um estudo de Li *et al.*, (2022) comparando guias personalizados 3D de titânio e de PEEK para ROG, encontrou-se resultados similares em relação a propriedade de manutenção de espaço e capacidade osteogênica. PEEK apresentou uma rigidez biomecânica significativamente menor que o titânio, mas cumpriu sua função de manutenção de espaço sem falha. De acordo com Papia *et al.*, (2022) a espessura adequada de uma barreira de PEEK deve ter entre 0,5 mm – 1,0 mm para apresentar propriedades mecânicas adequadas.

Para que novos biomateriais possam ser usados clinicamente com segurança, experimentos *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados para avaliar riscos e a segurança

biológica do material utilizado. Portanto, a avaliação da resposta inflamatória de um biomaterial através da implantação em tecido subcutâneo de ratos (teste *in vivo*) permite que se possa verificar a sua biocompatibilidade, interação de um tecido do organismo com um biomaterial sem que este cause reações prejudiciais ao ser vivo (WILLIAMS, 2008).

Essa interação gera uma reação tecidual, resultando em um processo inflamatório que pode ser leve ou forte, de acordo com os achados histológicos, contagem de células (macrófagos, linfócitos). A inflamação é um termo geral usado para descrever uma cascata de eventos que ocorrem em resposta a uma infecção ou a uma variedade de estímulos não infecciosos (ABBAS; LITCHTMAN, 2008), como por exemplo, a implantação de um biomaterial, visando defender o organismo contra diversos agressores. O grau da inflamação vai ajudar a definir a biocompatibilidade do material inserido. Quanto maior foi a intensidade e durabilidade do processo inflamatório menos compatível será o material, desencorajando o seu uso no meio clínico a fim de não causar injúrias ao receptor. (WILLIAMS, 2008; RATNER, 2015)

Mesmo com os avanços relacionados à ciência dos biomateriais, limitados estudos têm avaliado os mecanismos envolvidos na resposta biológica associada ao uso de substitutos ósseos xenógenos em bloco e barreiras de Zircônia e PEEK e sua interação com o sistema imune. Tais achados irão contribuir para inovações tecnológicas e na tomada de decisão clínica durante a seleção dos biomateriais ideais na ROG.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a resposta inflamatória de diferentes biomateriais em tecido subcutâneo de ratos.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Avaliar a resposta inflamatória em tecido subcutâneo de ratos de substitutos ósseos xenógenos em bloco, mediante análise histológica.

2.2.2. Avaliar a resposta inflamatória em tecido subcutâneo de ratos de barreiras sintéticas de Zircônia e PEEK, mediante análise histológica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Desenho de estudo

Trata-se de um estudo experimental pré-clínico, utilizando animais de espécie *Rattus norvegicus*.

3.2. Materiais

3.2.1. Blocos xenógenos

3.2.1.1. Bio-Graft® (Geistlich®)

Tabela 1 - Bio-Graft® (Geistlich®)

Origem	Osso Equino
Composição	Hidroxiapatita e Colágeno tipo I
Fabricação	Osso esponjoso natural purificado em múltiplas fases, cumprindo as mais rigorosas normas de segurança
Características	Osseocondutor, adapta-se ao defeito ósseo e sua fixação se dá por meio de parafusos. A matriz óssea inorgânica presente possui uma estrutura porosa. Seus poros são interligados em uma rede de malha larga, favorecendo o crescimento de novo osso.
Indicação	Aumentar a espessura do rebordo alveolar horizontalmente atrofiado.
Expectativa de incorporação	6-9 meses
Esterilização	Radiação Gama

Fonte: Desenvolvida pelo autor (2023).

3.2.1.2. Bonefill® (Bioinnovation®)

Tabela 2 - Bonefill® (Bioinnovation®)

Origem	Fêmur Bovino – porção cortical
Composição	Hidroxiapatita e Colágeno tipo I
Fabricação	Purificação em multifases, cumprindo os regulamentos de segurança preconizados pelas agências de controle. O osso fresco é triturado, recebendo uma sequência de banhos que solubilizam as estruturas orgânicas como, por exemplo, células remanescentes, fibras e proteínas, permanecendo assim somente a porção mineral evitando a indução de possíveis processos imunogênicos no organismo.
Características	Osseocondutor. Comparável à estrutura mineral e morfológica do osso humano mineralizado, é biocompatível, não apresenta citotoxicidade, toxicidade sistêmica aguda, toxicidade sub-crônica, carcinogenicidade, genotoxicidade e não é um produto sensibilizante (ISO 10993-1)
Indicação	Biomaterial odontológico implantável e utilizado em reconstruções de falhas ósseas onde se deseja remodelação ou neoformação óssea
Esterilização	Radiação Gama
Expectativa de Incorporação	6-9 meses

Fonte: Desenvolvida pelo autor (2023).

3.2.1.3. Zircônia

Tabela 3 - Zircônia

Definição	Cerâmica policristalina
Indicação	Barreira para ROG, não reabsorvível.
Peças utilizadas	Blocos quadrados 10x10x2 mm sinterizados

Fonte: Desenvolvida pelo autor (2023).

3.2.1.3.1. Tabela do Processo laboratorial de Sinterização da Zircônia

Tabela 4 - Tabela do Processo laboratorial de Sinterização da Zircônia

ETAPAS	Temperatura de início °C	Temperatura Final °C	Tempo aproximado (min)	Taxa de aquecimento (°C/min)
PASSO 1	Temperatura ambiente	1150	225	5
PASSO 2	1150	1450	150	2
PASSO 3	1450	1450	120	0
PASSO 4	1450	100	Resfriamento do forno	

Fonte: Desenvolvida pelo autor (2023).

3.2.1.4. PEEK

Tabela 5 - PEEK

Definição	Polímero termoplástico semicristalino
Indicação	Barreira para ROG, não reabsorvível
Peças utilizadas	Diâmetro de 8mm x 2mm de altura, cortados com disco de aço diamantado.

Fonte: Desenvolvida pelo autor (2023).

3.2.2. Modelo Animal

Segundo informações do Instituto Nacional de Pesquisa do Genoma Humano, ratos são praticamente idênticos geneticamente, o que permite uma uniformização dos resultados. São, ainda, genética e comportamentalmente, semelhantes aos humanos, sendo muitos sintomas humanos podendo ser aplicados neles. Com isso, este estudo selecionou a espécie *Rattus norvegicus* por acreditar que serão obtidos resultados mais uniformes e similares à condição humana.

3.2.2.1. Animais

Foram utilizados 14 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), adultos jovens, com média de peso de 350g, provenientes do NUBEX - Biotério da Faculdade de Fortaleza – UNIFOR, mantidos em gaiolas plásticas coletivas, higienizadas, colocadas em ambiente arejado e iluminado, recebendo água ad libitum e alimentação constituída de ração comercial balanceada. Previamente ao início do experimento, o projeto de pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA – Protocolo nº 3918230921) e aprovado em 22/11/2021.

3.2.3. Critérios de inclusão

Animais de espécie *Rattus norvegicus*, variação albinus, Holtzman, machos, com idade de 4 a 6 meses, com peso entre 300 a 400 gramas.

3.2.3.1. Períodos experimentais

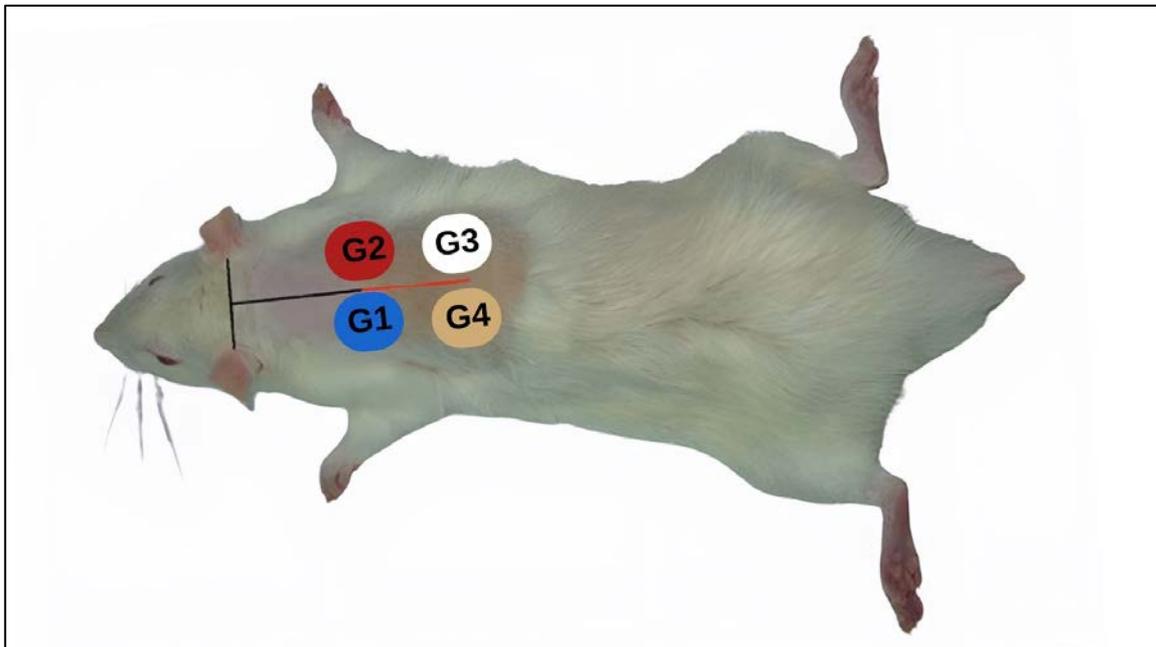
Os 2 períodos experimentais eram compostos de 4 tipos de biomateriais, sendo dois blocos xenógenos (Bio-Graft® (Geistlich) e Bonefill (Bioinnovation)), 2 barreiras sintéticas (PEEK e Zircônia) e o grupo controle. Sendo 5 grupos testados.

Tabela 6 – Grupos testados

Grupos	Materiais	Período/nº de espécimes	
		15 dias	45 dias
G1	Bio-Graft®	7	7
G2	Bonefill®	7	7
G3	Zircônia	7	7
G4	PEEK	7	7

Fonte: Desenvolvida pelo autor (2023).

Figura 1 - Desenho da posição dos grupos experimentais na região subcutânea de cada animal



Fonte: Desenvolvida pelo autor (2023).

3.2.3.2. Períodos experimentais

Os animais foram divididos em 02 PERÍODOS EXPERIMENTAIS DE 15 dias (n=7) e 45 dias (n=7).

3.2.4. Anestesia dos Animais

Os animais foram pré-anestesiados com cloridrato de ketamina na dose de 25 mg/Kg IM usando seringa de insulina e agulha 20x5,5, com aplicação no abdomen, quadrante esquerdo inferior proximo a coxa esquerda. Após um período de latência de 2 a 5 minutos, a anestesia foi complementada com a associação do cloridrato de ketamina com cloridrato de xilazina, relaxante muscular, analgésico e sedativo, na dose de 25 mg/Kg para 10 mg/Kg IM, respectivamente. O tempo de trabalho para cada animal foi de aproximadamente 25 minutos. A conduta anestésica seguiu a tabela peso/dosagem estabelecida pelo Biotério da UNIFOR.

3.2.5. Cirurgia dos animais

Após a anestesia foi realizada a tricotomia da região dorsal dos animais e feita a antisepsia com gaze estéril embebida com solução de iodopovidine. Foram realizadas cinco incisões longitudinais de 1.5 cm na pele até a derme com bisturi lâmina nº15. Com o auxílio de uma pinça hemostática reta foi realizada uma pequena divulsão para acessar o tecido subcutâneo, a fim facilitar a inserção e dar espaço necessário para alojar cada biomaterial. Depois foram realizadas as suturas simples com fio de nylon 5.0. Tomou-se cuidado para não deixar os biomateriais próximos da incisão, evitando assim a sua expulsão ou mobilidade. Foi administrado Tramadol e pentabiótico intraperitoneal, na dose de 1 a 2mg/Kg, de 12/12h e foram acompanhados nas primeiras 72h após o procedimento. Para distinguir os ratos e os grupos, foram feitas marcações codificadas nas orelhas e rabo. Os ratos foram colocados em gaiolas individuais e foram alimentados com água e ração sólida ad libitum antes e durante todo o período experimental, em ambiente com luz. Não houve sinais de infecção pós-operatória ou morte dos animais. As suturas foram removidas após 10 dias sem anestesia afim de evitar qualquer viés nos resultados.

3.3. Procedimentos de coleta

Os animais foram eutanasiados seguindo o cronograma dos períodos experimentais (15 e 45 dias), com sobredose anestésica, 400mg/Kg de Cloridrato de Cetamina via intraperitoneal. A coleta foi realizada post mortem, seguindo o mesmo protocolo da cirurgia

de inserção, com tricotomia e antissepsia local. Para tal, a pele do dorso do animal foi apalpada a fim de detectar a presença dos biomateriais, as amostras foram coletadas através do uso de tesouras de Metzemaum e colocadas individualmente em frascos de vidro com tampa de silicone para cada biomaterial, contendo Formol 10% com etiquetas identificadas pelo grupo, o número do animal e o biomaterial correspondente para análise histológica.

3.4. Preparo das amostras para histologia

As amostras de PEEK e ZR foram preparados para obtenção de cortes histológicos não-descalcificados (45 μ m). Cada amostra foi colocada individualmente em cassetes, codificadas a lápis, fixadas em formaldeído tamponado a 10% por 24 horas em temperatura ambiente, seguida de lavagem abundante em água corrente. Os espécimes foram desidratados em gradiente de etanol em concentrações crescentes (soluções 70%, 90% e 100%) em tempos determinados. Todas as peças foram infiltradas e incluídas na resina Technovit® 7200 VLC (Kulzer Technik, Mitsui Chemicals Group Inc. (MCI), Tóquio) e polimerizadas por 10 horas, cerca de 4 horas em luz amarela e de 6 horas em luz azul. Através de um sistema específico de microdesgaste (Exakt, Apparatebau, Hamburgo, Alemanha) pela técnica de secção de tecidos duros, obteve-se cortes bem paralelos de aproximadamente 45 μ . As lâminas histológicas foram montadas para análise e coradas com fucsina ácida e azul de Stevenel. As imagens foram capturadas com um microscópio de luz (Diastar, Leica Reichert Jung e produtos) conectado a uma câmera digital (Leica Microsystems DFC-300-FX; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) (3100).

As amostras dos blocos xenógenos foram coletadas do tecido mole removidas em conjunto e fixadas em 4% de Paraformoldeído durante 48 horas. Após esse período, as amostras foram lavadas e mantidas em EDTA 7% por 60 dias, com trocas de solução a cada 48 horas. As amostras então foram processadas para inclusão em parafina. Foram obtidos cortes histológicos com 5 μ m de espessura que foram corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina (HE). Foram avaliados 2 cortes por amostra por um examinador experiente no aumento de 10x e 20x e 40x de magnificação.

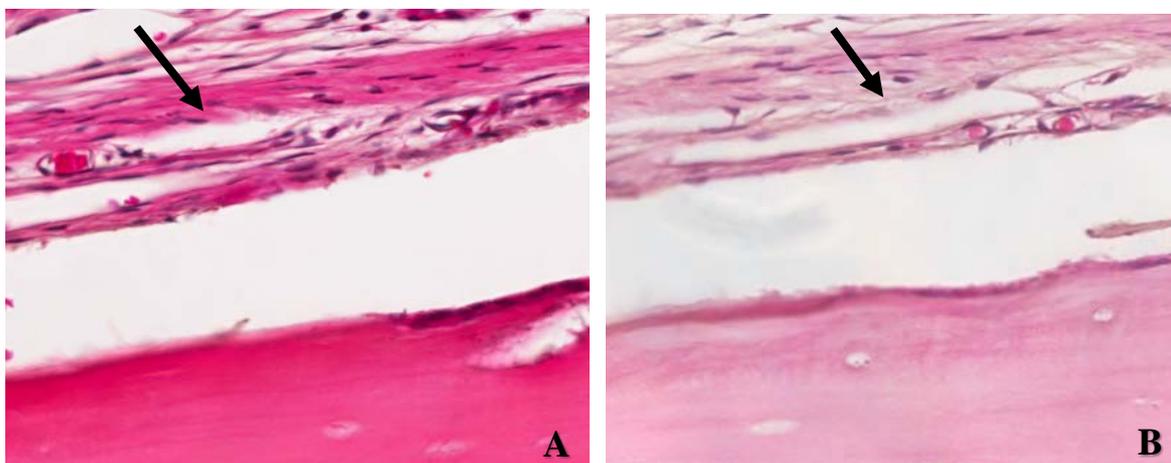
4. RESULTADOS

A microscopia dos espécimes representativos dos respectivos períodos e grupos experimentais revelou a neoformação de tecido conjuntivo ao redor dos materiais implantados. A análise dos fenômenos microscópicos de interesse foi realizada por um observador calibrado.

4.1. Grupos 1 e 2: BLOCOS XENÓGENOS

4.1.1. Grupo 1: Biograft® Bio-Oss®

Figura 2 – Fotomicrografia histológica grupo G1: A) 15 dias B) 45 dias



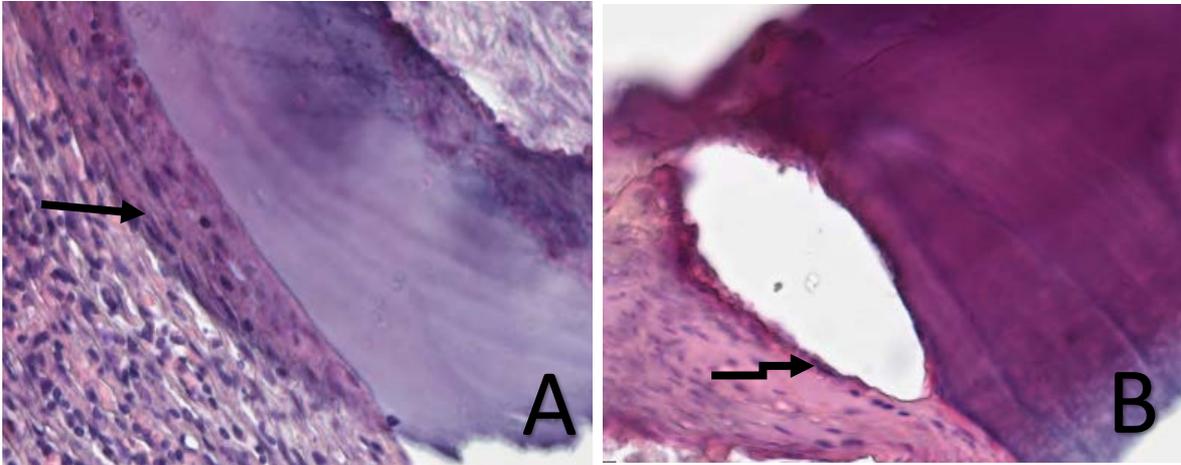
Fonte: Desenvolvida pelo autor (2023).

Figura 2. Grupo G1: A) Fotomicrografia mostrando os achados histológicos aos 15 dias– Discreto infiltrado inflamatório. Presença de fibrilas de colágeno apontadas pela seta. B) Fotomicrografia mostrando achados histológicos aos 45 dias. Maturação das fibras de colágeno apontadas pela seta, ausência de processos inflamatórios. (Aumento 20X). Cortes corados com HE

Foi constatada uma boa integração tecidual nas áreas enxertadas com Biograft® (G1), com a não observação de processos inflamatórios. Notou-se também um notável avanço na maturação do tecido da matriz de colágeno em ambos os períodos avaliados, de acordo com as setas. A resposta do organismo a este enxerto foi positiva.

4.1.2. Grupo 2: Bonefill Block® Bioinnovation®

Figura 3 – Fotomicrografia histológica grupo G2: A) 15 dias B) 45 dias



Fonte: Desenvolvida pelo autor (2023).

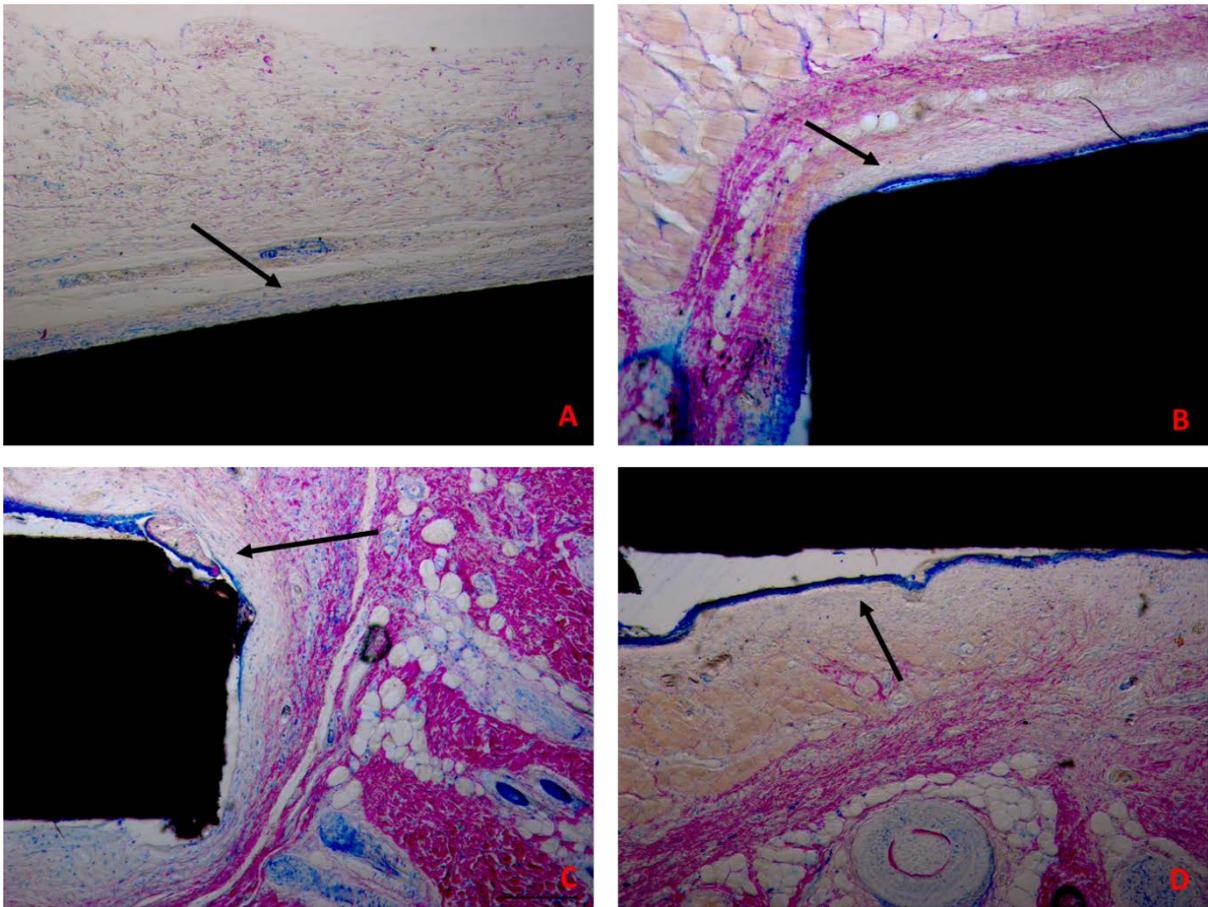
Figura 3. Grupo G2: A) Fotomicrografia mostrando os achados histológicos aos 15 dias – Infiltrado inflamatório moderado a intenso e desorganização de fibras colágenas apontadas pela seta. B) Fotomicrografia mostrando achados histológicos aos 45 dias, ainda com presença de infiltrado inflamatório moderado circundando o material. (Aumento 20X). Cortes corados com HE.

Observou-se grande reação inflamatória, resultando em uma desorganização das fibras colágenas presentes na matriz do tecido conjuntivo no período de 15 dias. É interessante destacar que essa reação inflamatória apresentava características sugestivas de uma resposta a corpo estranho, no segundo período de avaliação. Achados destacados pelas setas pretas.

4.2. Grupo 3: Zircônia

Foi observado aos 15 dias uma formação de uma fina camada de feixes de fibras do tecido conjuntivo sem observação de processos inflamatórios relevantes. Interessante que o tecido conjuntivo se destacava do material em muitos pontos. O que sugere que o material não é passível de processo de fibrose.

Figura 4 – Fotomicrografia grupo G3 aos 15 dias

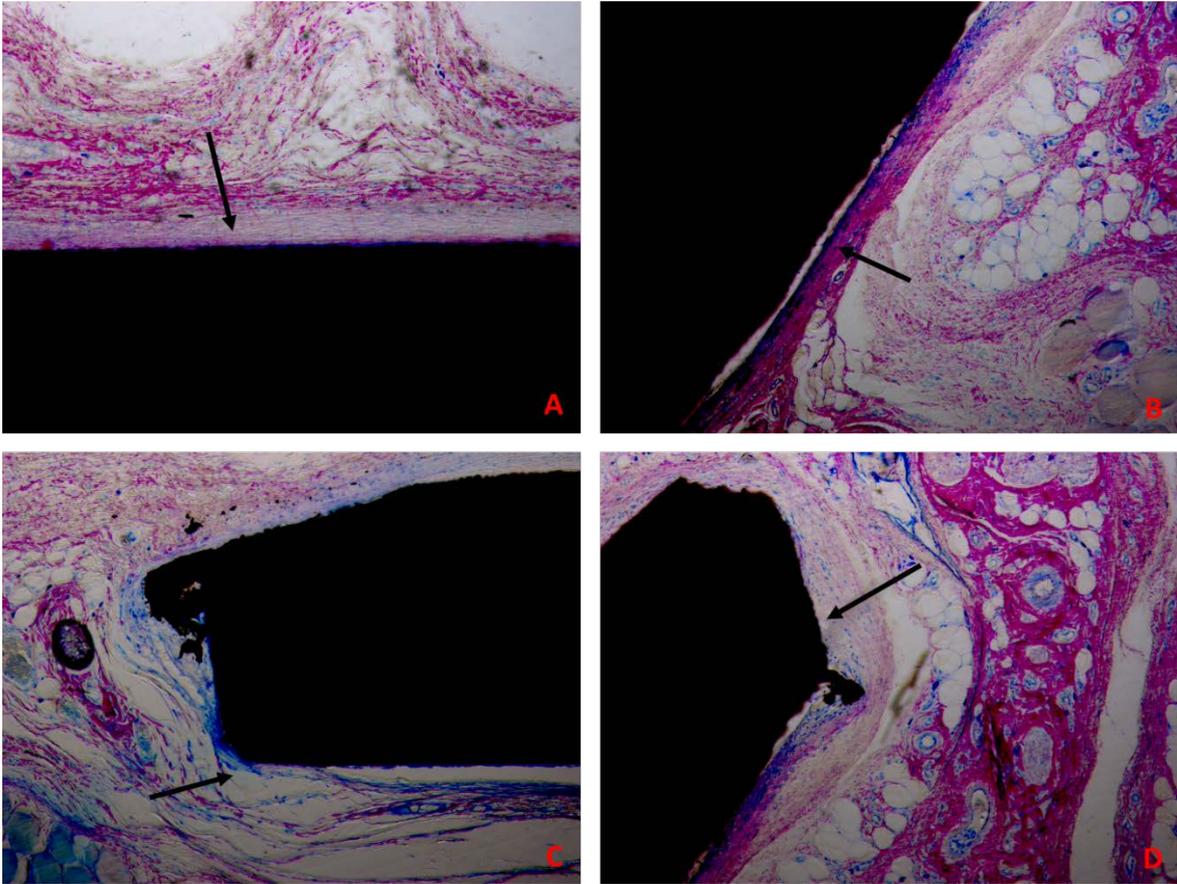


Fonte: Desenvolvida pelo autor (2023).

Figura 4. A) Fotomicrografia Grupo G3 aos 15 dias. Vista panorâmica. Início de organização de fibras de tecido conjuntivo, com ausência de percepção de reações inflamatórias. Aumento 5X B) Fibrilas de colágeno circunscrevendo o material em alguns pontos. Aumento 10X. C) Em alguns pontos foi observado que o material se destacava do tecido do animal. Aumento 10 X. D) Porém, esse achado não estava relacionado a reações inflamatórias. (Achados destacados por setas pretas). Aumento 20X. Lâminas coradas com azul de Stevenel e fucsina ácida.

Aos 45 dias foi observado em muitos pontos uma maturação das fibras associadas ao material, com tecido de aspecto bem semelhante aos tecidos vizinhos, porém, em outros pontos, foi observado uma fibrose ao redor do material, porém, sem associação a exuberante reação inflamatória. Assim como no período de 15 dias, que o tecido conjuntivo se destacava do material em muitos pontos.

Figura 5 - Fotomicrografia histológica grupo G3 aos 45 dias



Fonte: Desenvolvida pelo autor (2023).

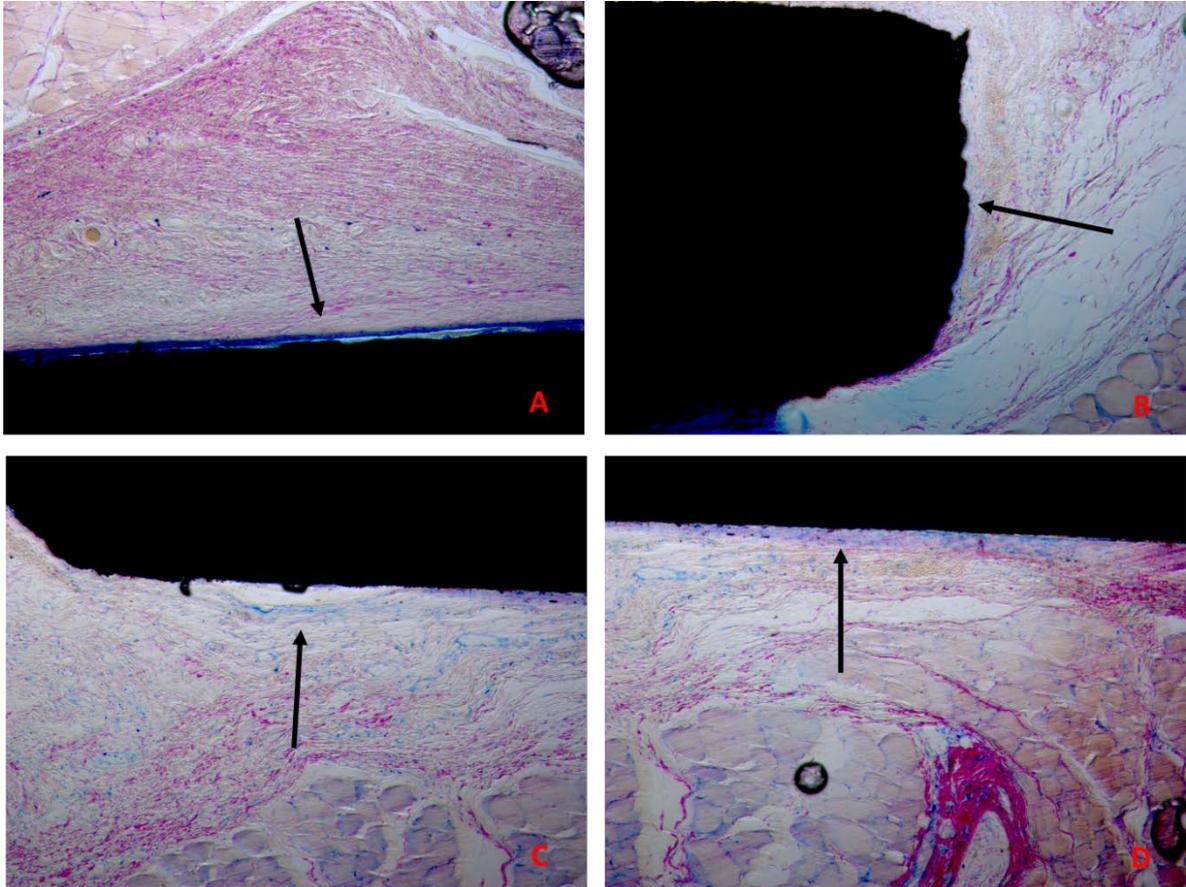
Figura 5. Fotomicrografia dos achados histológicos referentes ao período de 45 dias. A) Foi observado uma evolução da maturação e complexidade dos tecidos conjuntivos que circunscreveram o material; Aumento 5X. B) Essa evolução resultou em aumento da espessura e organização dos feixes de matriz de tecido conjuntivo ao redor do material; Aumento 20X. C) Interessante observar que em alguns pontos o tecido se destacava do material; Aumento 10X D) Mas não se pode descrever essa reação como de corpo estranho, pois pode-se observar que esse evento não estava relacionado com reações inflamatórias exacerbadas. (Achados destacados por setas pretas). Aumento 10X. Lâminas coradas com Azul de Stevenel e Fucsina ácida.

4.3. Grupo 4 : PEEK

Foi observado aos 15 dias uma formação de uma fina camada de feixes de fibras do tecido conjuntivo sem observação de processos inflamatórios relevantes. Essa camada

encontrava-se em íntimo contato com o material. A certa distância foi observado um tecido mais celularizado em fase de organização.

Figura 6 - Fotomicrografia histológica grupo G4 aos 15 dias

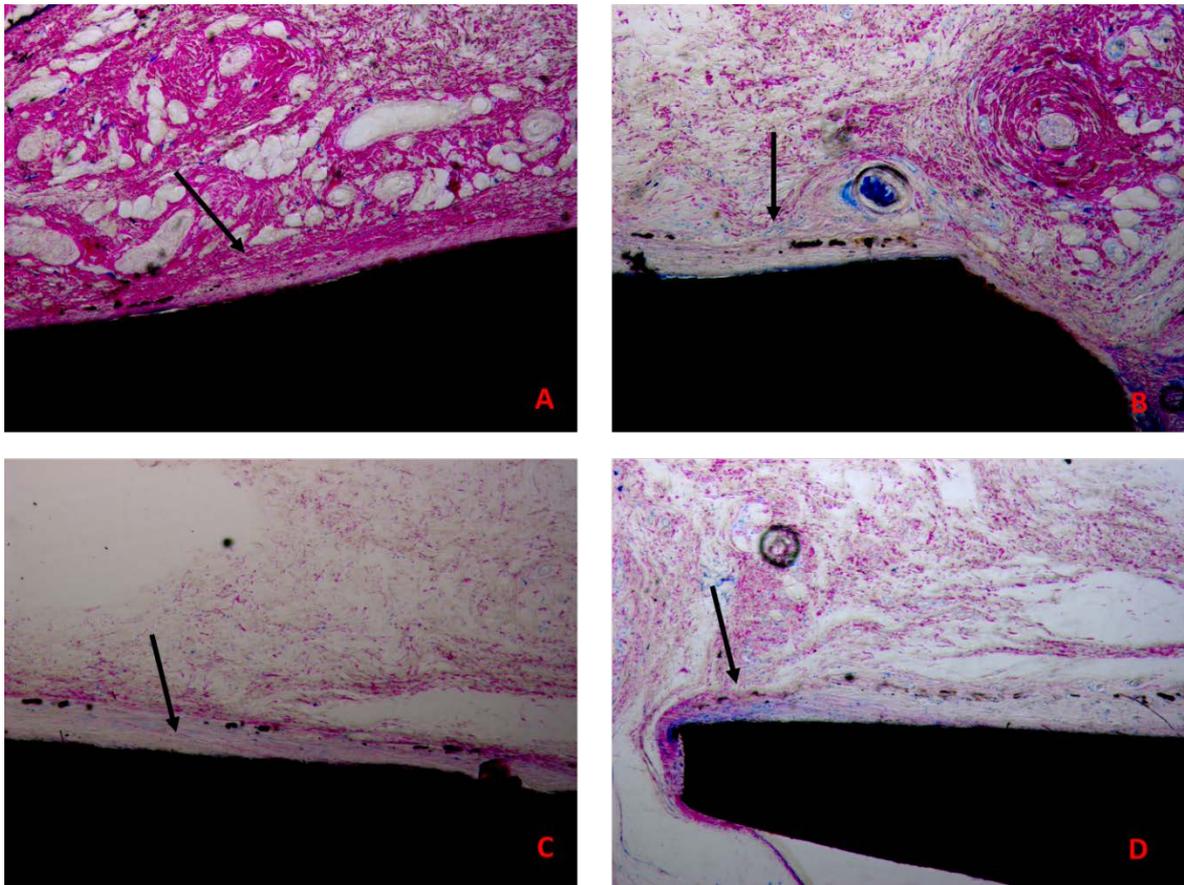


Fonte: Desenvolvida pelo autor (2023).

Figura 6: Fotomicrografia dos achados histológicos referentes ao período de 15 dias. A) Vista panorâmica. Início de organização de fibras de tecido conjuntivo, com ausência de percepção de reações inflamatórias. Aumento 5X. B) Em alguns pontos foi observado a organização precoce de matriz de tecido conjuntivo circunscrevendo o material; Aumento 10X. C) Esse feixe de fibras no início estava com aspecto de tecido conjuntivo frouxo; Aumento 10X. D) Concentração de células fibroblásticas nas proximidades do material. Aumento 20X (Achados destacados por setas pretas). Lâminas coradas com azul de Stevenel e Fucsina ácida.

Aos 45 dias foi observado aumento da organização da matriz de tecido conjuntivo ao redor do material, que não esteve associado ao aumento da quantidade de células inflamatórias, sendo esse padrão compatível de um material com boa biocompatibilidade.

Figura 7 - Fotomicrografia histológica grupo G4 aos 45 dias



Fonte: Desenvolvida pelo autor (2023).

Figura 7. Fotomicrografia dos eventos histológicos do grupo G4 no período de 45 dias. A) Foi observado uma evolução da maturação e complexidade dos tecidos conjuntivos que circunscreveram o material Aumento 20X. B) Essa evolução resultou em aumento da espessura e organização dos feixes de matriz de tecido conjuntivo ao redor do material. Aumento 20X. C) Interessante observar que as fibras se organizaram radialmente ao redor do corpo do material. Aumento 10X. D) Mas não se pode descrever essa reação como de corpo estranho pois pode-se observar que esse evento não estava relacionado com reações inflamatórias exacerbadas. Aumento 10X. (Achados destacados por setas pretas). As lâminas foram coradas com azul de Stevenel e fucsina ácida.

5. DISCUSSÃO

Os estudos experimentais empregando animais de laboratório são considerados mais proeminentes (KILKENNY, 2009), pois é possível constatar a resposta tecidual frente a um determinado material. Os estudos que avaliam a biocompatibilidade de um material comumente são realizados através de testes de implantação subcutânea, (GOURLAY *et al.*, 1978) sendo o rato de laboratório o modelo experimental mais viável (BROWNE, 1994).

Segundo Rodriguez e Sosa (2004), o rato possui um metabolismo célere, permitindo a obtenção de resultados num menor período relacionado a outros animais. Outros fatores como fácil manejo, reprodução controlada e obtenção de número de amostras necessárias também tornam seu uso favorável.

Em relação aos tempos experimentais estabelecidos para o estudo, foram escolhidos os períodos de 15 e 45 dias após implantação, com o objetivo de verificar a reação em período curto e longo. Foi descartado o período de 7 dias nessa pesquisa, pois podem ocorrer ainda resquícios de trauma cirúrgico, disfarçando a verdadeira resposta do material (COUTINHO-FILHO *et al.*, 2008). No período de 15 dias a reação tecidual já não sofre qualquer interferência dos procedimentos cirúrgicos de implantação dos biomateriais. Aos 45 dias os fenômenos reparatórios já estão definidos.

Os resultados foram coletados através da análise descritiva dos fenômenos teciduais dos espécimes, modelo largamente usado em trabalhos de análise de biocompatibilidade por diversos autores (DE-MORAIS, 2006; SHAHI, 2006).

Após 15 dias, os achados histológicos da zircônia revelaram uma fina camada de feixes de fibras do tecido conjuntivo sem observação de processos inflamatórios relevantes, e aos 45 dias feixe de fibras mais maduros sem características relevantes de inflamação, esses achados apoiam o estudo de Ichikawa *et al.*, (1992), que avaliou a biocompatibilidade da zircônia no tecido de ratos nos períodos de 3, 6 e 12 meses, no qual encontrou igualmente uma fina cápsula fibrosa sem alterações inflamatórias ao redor do implante de zircônia.

No trabalho de Manolea *et al.*, (2019), no qual foram implantadas amostras de zircônia na submucosa da cavidade oral de ratos, obteve-se resultados semelhantes, mínimos a moderados sinais de inflamação com áreas de fibrose colágena após 45 dias. Um achado interessante identificado foi que o tecido se destacava do material em alguns pontos, indicando uma falta de integração entre eles, provando ser um material bioinerte. Essa característica se mostra benéfica em uma barreira não reabsorvível, visto que essa estrutura

precisa ser removida em um segundo ato cirúrgico. Essa falta de integração facilitaria a remoção, minimizando assim maiores danos aos tecidos adjacentes.

Com o material PEEK, houve uma formação de uma fina camada de feixes de fibras do tecido conjuntivo sem processos inflamatórios relevantes aos 15 dias. Esse feixe fibroso aumentou de espessura e fibras colágenas maduras após os 45 dias, sem apresentar sinal de processos inflamatórias, apoiando os resultados C. Von Wilmowsky et al., que em 2015 avaliou implantes de PEEK em defeitos ósseos suínos, após 6, 12 e 24 semanas, percebendo que todos os implantes PEEK estavam cercados por tecido conjuntivo, sem sinais de resposta inflamatória ou necrose aparente, definindo-o com um material bioinerte e adequados como dispositivos de implante a longo prazo.

Em um trabalho da medicina ortopédica de Rivard, Rhalmi e Coillard (2001), foi avaliado a biocompatibilidade do PEEK em dura-máter de coelhos, os achados referentes foram parecidos: resposta inflamatória leve a moderada após 4 semanas e um encapsulamento de tecido conjuntivo fibroso organizado após 12 semanas, sem apresentar nenhuma reação adversa. De acordo com Gao *et al.*, (2019) a resposta imune adversa intercedida por macrófagos provocada pela superfície da polietereetercetona (PEEK) é responsável pela formação desse encapsulamento fibroso. Na presente pesquisa, observou-se um íntimo contato do material PEEK ao tecido conjuntivo, diferentemente da Zr que se destacava em alguns pontos. Isso pode ser explicado pela característica de superfície de ambos os materiais. Na zircônia, a superfície se encontrava bastante polida, enquanto no PEEK se notava uma área superficial rugosa. As células se aderem melhor em superfícies rugosas em comparação a polidas (BÄCHLE; KOHAL, 2004).

Para servir como matéria-prima para a confecção de barreira para ROG, o PEEK deverá se apresentar com um melhor grau de polimento. Essa característica de superfície altamente polida é admirável no quesito exposição ao meio bucal, devido a uma menor aderência do biofilme, evitando colonizações bacterianas que podem colocar em risco o enxerto, uma das principais causas de insucesso na ROG (CUCCHI *et al.*, 2017). Em um estudo de série de casos no qual Mandelli *et al.*, (2021) usou barreiras de Zircônia em pacientes para ROG, confirmou que mesmo em casos de exposição prematura da barreira de zircônia não houve sinais de infecção.

Podemos observar o inverso com relação ao titânio, pois a susceptibilidade à corrosão da sua superfície favorece sua rugosidade superficial, favorecendo a contaminação do enxerto. Em um trabalho conduzido por Otto (2004) houve uma ocorrência de 36% de

complicações dos casos de ROG com telas de titânio, devido à exposição precoce. A membrana não absorvível d-PTFE Cytoplast® foi capaz de permitir um período de exposição na cavidade oral sem que haja contaminação do enxerto, desde que o paciente siga rigorosamente os cuidados de higiene oral. Porém, a membrana Cytoplast®, considerada padrão ouro na ROG devido à sua característica de maleabilidade, não atende ao princípio da estabilidade preconizado por Wang e Boyapati (2006), o qual se encontra nas barreiras sintéticas de Zr e PEEK, cuja rigidez confere maior grau de estabilidade ao enxerto, evitando micromovimentos na área enxertada.

Por outro lado, em relação aos enxertos xenógenos em bloco, uma maior estabilidade também pode ser observada quando comparados aos enxertos particulados. Com intuito de melhorar as propriedades mecânicas e biológicas, associou-se colágeno tipo 1 à hidroxiapatita para fabricação dos blocos xenógenos. Essa união ainda não é bem esclarecida, porém previne a migração de partículas do material, antes do processo de integração tecidual do hospedeiro. O Bio-Graft® Bio-Oss®, composto de 70% de hidroxiapatita de origem equina misturada com 30% de colágeno, é amplamente pesquisado e, por isso, será o grupo controle da nossa pesquisa dos blocos xenógenos. De acordo com os nossos achados histológicos, apresentou um notável avanço na maturação do tecido da matriz de colágeno em ambos os períodos avaliados, sem indícios de processos inflamatórios relevantes. Essa constatação reforça a eficácia do Biograft® (WONG, RABIE, 2010; DEGIDI *et al.*, 2012; FAN *et al.*, 2021).

Referente aos achados do bloco xenógeno Boneffil®, uma significativa reação inflamatória, resultando em uma desorganização das fibras colágenas da matriz do tecido conjuntivo. É importante ressaltar que essa reação inflamatória mais intensa pode caracterizar uma resposta inflamatória a corpo estranho que persistiu mesmo após 45 dias. Sugerindo um potencial pró-inflamatório desse biomaterial, em contraste com o comportamento do Bio-Graft®.

Sabe-se que para fabricar cada tipo de biomaterial é necessário um método de processamento específico. No que tange os xenoenxertos, o banho em solução alcalina, o tamanho da granulação e a temperatura de processamento são essenciais no intuito de permitir a formação de um novo tecido e para extrair os restos orgânicos do doador (patógenos, material genético ou algumas proteínas) (KARREVIĆ *et al.*, 2018). Esses resíduos orgânicos podem levar a um aumento da resposta inflamatória e induzir uma reação imunológica contrária (GHANAATI *et al.*, 2018; KARREVIĆ *et al.*, 2018; BARBECK

et al., 2019). Contudo, o processo de purificação durante a fabricação dos enxertos xenógenos também contribui para que o seu desempenho biológico seja elevado. O aquecimento acima de 1000°C é a forma mais eficaz de desnaturar as proteínas (GHANAATI *et al.*, 2018). Entretanto, o superaquecimento diminui a porosidade e funde a estrutura lamelar do biomaterial, prejudicando a molhabilidade e a ancoragem de células osteogênicas, interferindo nas propriedades mecânicas e osteocondutoras dos materiais (KAČAREVIĆ *et al.*, 2018).

6. CONCLUSÃO

Os materiais Peek e Zircônia como barreiras sintéticas se mostraram biocompatíveis, apresentando grande potencial para utilização em ROG. Com relação aos blocos xenógenos testados, o Bio-Graft® Bio-Oss® se integrou melhor e causou menos inflamação do que o Bonefill® Bioinnovation®.

7. REFERÊNCIAS

- ALAUDDIN, M. S.; ABDUL-HAYEI, N. A.; SABARUDIN, M. A.; MAT-BAHARIN, N. H. Barrier Membrane in Regenerative Therapy: A Narrative Review. **Membranes (Basel)**, v. 12, n. 5, p. 444. 2022.
- AL-RUHAIMI, K. A. Bone Graft Substitutes: A Comparative Qualitative Histologic Review of Current Osteoconductive Grafting Materials. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 16, n. 1, p. 105–114, 2001.
- AMID, R.; KHEIRI, A.; KHEIRI, L.; KADKHODAZADEH, M.; EKHLASMANDKERMANI, M. Structural and chemical features of xenograft bone substitutes: A systematic review of in vitro studies. **Biotechnol Appl Biochem**, v. 68, n. 6, p. 1432-1452, 2021.
- ARAÚJO, M. G.; LINDHE, J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. **J Clin Periodontol.**, v. 32, n. 2, p. 212-218, 2005.
- ARAÚJO, M. G.; SUKEKAVA, F.; WENNSTRÖM, J. L.; LINDHE, J. Ridge alterations following implant placement in fresh extraction sockets: an experimental study in the dog. **J Clin Periodontol.**, v. 32, n. 6, p. 645-652, 2005.
- AYUB, . G. et al.. Regeneração óssea guiada e suas aplicações terapêuticas. **Braz J Periodontol-December**, v. 21, n. 04, 2011.
- BÄCHLE, M.; KOHAL, R. J. A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. **Clin Oral Impl. Res.**, v. 15, n. (esp), p. 683-692, 2004.
- BARBECK, M.; JUNG, O.; XIONG, X.; KRASSTEV, R.; KORZINSKAS, T.; NAJMAN, S.; RADENKOVIĆ, M.; WEGNER, N.; KNYAZEVA, M.; WALTHER, F. Balancing Purification and Ultrastructure of Naturally Derived Bone Blocks for Bone Regeneration: Report of the Purification Effort of Two Bone Blocks. **Materials**, v. 12, n. 19, p. 3, 2019.
- CARDAROPOLI, D.; CARDAROPOLI, G. Preservation of the postextraction alveolar ridge: a clinical and histologic study. **Int J Periodontics Restorative Dent.**, v. 28, n. 5, p. 469-477, 2008.
- CARDAROPOLI, G.; ARAÚJO, M.; LINDHE, J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. **J Clin Periodontol.**, v. 30, n. 9, p. 809-818, 2003.
- CHAVDA, S.; LEVIN, L. Human Studies of Vertical and Horizontal Alveolar Ridge Augmentation Comparing Different Types of Bone Graft Materials: A Systematic Review. **J Oral Implantol.**, v. 44, n. 1, p. 74-84, 2018.

COUSO-QUEIRUGA, E.; STUHR, S.; TATTAN, M.; CHAMBRONE, L.; AVILA-ORTIZ, G. Post-extraction dimensional changes: A systematic review and meta-analysis. **J Clin Periodontol.**, v. 48, n. 1, p. 126-144, 2021.

COUTINHO-FILHO, T.; DE-DEUS, G.; KLEIN, L.; MANERA, G.; PEIXOTO, C.; GURGEL-FILHO, E. D. Radiopacidade e avaliação histológica do cimento Portland mais óxido de bismuto. **Cirurgia oral, medicina oral, patologia oral, radiologia oral e endodontia**, v. 106, n. 6, p. e69–e77, 2008.

CUCCHI, A.; VIGNUDELLI, E.; NAPOLITANO, A.; MARCHETTI, C.; CORINALDESI, G. Evaluation of complication rates and vertical bone gain after guided bone regeneration with non-resorbable membranes versus titanium meshes and resorbable membranes. **A randomized clinical trial. Clin Implant Dent Relat Res.**, v. 19, n. 5, p. 821-832, 2017.

DAHLIN, C.; LINDE, A.; GOTTLow, J.; NYMAN, S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. **Plast Reconstr Surg.**, v. 81, n. 5, p. 672-676, 1988.

DEGIDI, M.; DAPRILE, G.; NARDI, D.; PIATTELLI, A. Placa óssea bucal em implante imediatamente colocado e restaurado com enxerto de colágeno Bio-Oss[®]: Um estudo de acompanhamento de 1 ano. **Clin. Implante Oral. Res.**, v. 24, n. (esp), p. 1201–1205, 2012.

ELGALI, I.; OMAR, O.; DAHLIN, C.; THOMSEN, P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. **Eur J Oral Sci.**, v. 125, n. 5, p. 315-337, 2017.

ELNAYEF, B.; PORTA, C.; SUÁREZ-LÓPEZ, D.; AMO, F.; MORDINI, L.; GARGALLO-ALBIOL, J.; HERNÁNDEZ-ALFARO, F. The Fate of Lateral Ridge Augmentation: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Int J Oral Maxillofac Implants.**, v. 33, n. 3, p. 622-635, 2018.

FAN, Q.; ZENG, H.; FAN, W.; WU, T.; SUN, J.; YAN, Q.; SHI, B. Preservação de Ridge de um novo alvéolo de extração aplicando colágeno Bio-Oss[®]: Um estudo experimental em cães. **J. Dente. Ciência.**, v. 16, n. (esp), p. 831–839, 2021.

FICKL S, ZUHR O, WACHTEL H, STAPPERT CFJ, STEIN JM, HU'RZELER MB. Dimensional changes of the alveolar ridge contour after different socket preservation techniques. **J Clin Periodontol**, v. 35, n. (esp), p. 906–913, 2008.

GHANAATI S.; ORLOWSKA A.; AL-MAAWI S.; BROZOVIC J.; SADER R. Xenosynthetic bone block includes cellular remnants: Acceptable components or lack of purification?. **International Journal of Growth Factors Stem Cells in Dentistry**, v. 1, n. 2, p. 70-73, 2018.

GHANAATI, S.; ORTH, C.; BARBECK, M.; WILLERSHAUSEN, I.; THIMM, B. W.; BOOMS, P.; STÜBINGER, S.; LANDES, C.; SADER, R. A.; KIRKPATRICK, C. J. Histological and histomorphometrical analysis of a silica matrix embedded nanocrystalline

hydroxyapatite bone substitute using the subcutaneous implantation model in Wistar rats. **Biomed Mater.**, v. 5, n. 3, p. 35005, 2010.

HERMANN, J. S.; BUSER, D. Guided bone regeneration for dental implants. **Curr Opin Periodontol.**, v. 3, n. (esp), p. 168-177, 1996.

HURLEY, L. A.; STINCHFIELD, F. E.; BASSETT, A. L.; LYON, W. H. The role of soft tissues in osteogenesis. An experimental study of canine spine fusions. **J Bone Joint Surg Am.**, v. 41, n. (esp), p. 1243-1254, 1959.

ICHIKAWA, Y.; AKAGAWA, Y.; NIKAI, H.; TSURU, H. Tissue compatibility and stability of a new zirconia ceramic in vivo. **J Prosthet Dent.**, v. 68, n. 2, p. 322-326, 1992.

KAČAREVIĆ, P.; KAVEHEI, F.; HOUSHMAND, A.; FRANKE, J.; SMEETS, R.; RIMASHEVSKIY, D.; WENISCH, S.; SCHNETTLER, R.; JUNG, O.; BARBECK, M. Purification processes of xenogeneic bone substitutes and their impact on tissue reactions and regeneration. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 41, n. 11, p. 789-800, 2018.

KURTZ, S. M.; DEVINE, J. N. PEEK biomaterials in trauma, orthopedic, and spinal implants. **Biomaterials.**, v. 28, n. 32, p. 4845-4869, 2007.

LEE, W. T.; KOAK, J. Y.; LIM, Y. J.; KIM, S. K.; KWON, H. B.; KIM, M. J. Stress shielding and fatigue limits of poly-ether-ether-ketone dental implants. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.**, v. 100, n. 4, 1044-1052, 2012.

LI, L.; GAO, H.; WANG, C.; JI, P.; HUANG, Y.; WANG, C. Assessment of Customized Alveolar Bone Augmentation Using Titanium Scaffolds vs Polyetheretherketone (PEEK) Scaffolds: A Comparative Study Based on 3D Printing Technology. **ACS Biomater Sci Eng.**, v. 8, n. 5, p. 2028-2039, 2022.

MANDELLI, F.; TRAINI, T.; GHENSI, P. Customized-3D zirconia barriers for guided bone regeneration (GBR): clinical and histological findings from a proof-of-concept case series. **J Dent.**, v. 114, n. (esp), p. 103780, 2021.

MANOLEA, H. O.; MATEI, I. M.; NISTOR, C. M. L.; LAZĂR, A. C.; SĂLAN, A. I.; GÎNGU, O.; CIOATERĂ, N.; IACOV-CRĂIȚOIU, M. M.; GĂLBINAȘU, B. M. A microscopic insight of the morphological changes induced by dental zirconia prosthetic structures. **Rom J Morphol Embryol.**, v. 60, n. 3, p. 875-881, 2019.

NAENNI, N.; LIM, H. C.; PAPAGEORGIOU, S. N.; HÄMMERLE, C. H. F. Efficacy of lateral bone augmentation prior to implant placement: A systematic review and meta-analysis. **J Clin Periodontol.**, v. 46, n. 21, p. 287-306, 2019.

OTTO K, Schopper C, Ewers R, Lambrecht JT. Geführte Knochenregeneration (GBR) unter Titanfolien [Guided bone regeneration beneath titanium foils]. **Schweiz Monatsschr Zahnmed.**, v. 114, n. 10, p. 996-1002, 2004.

PERIĆ-KAČAREVIĆ, Z.; KAVEHEI, F.; HOUSHMAND, A.; FRANKE, J.; SMEETS, R.; RIMASHEVSKIY, D.; WENISCH, S.; SCHNETTLER, R.; JUNG, O.; BARBECK,

M. Purification processes of xenogeneic bone substitutes and their impact on tissue reactions and regeneration. **Int J Artif Organs.**, v. 41, n. 11, p. 789-800, 2018.

PILGER, A. D.; SCHNEIDER, L. E.; SILVA, G. M.; SCHNEIDER, K. C. C.; SMIDT, R. Membranas E Barreiras Para Regeneração Óssea Guiada. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas.**, v. 19, n. 3, p. 441–448, 2018.

RATNER, B. D. The Biocompatibility of Implant Materials. In: **Host Response to Biomaterials**. Elsevier, 2015

RIVARD, C.; RHALMI, S.; COILLARD, C. In vivo biocompatibility testing of PEEK polymer for a spinal implant system: A study in rabbits. **Journal of biomedical materials research.**, v. 62., n. (esp), p. 488-498, 2002.

ROCA-MILLAN, E. et al., Evaluation of Bone Gain and Complication Rates after Guided Bone Regeneration with Titanium Foils: A Systematic Review. **Materials**, v. 13, n. 23, p. 5346, 2020.

RODRIGUES, W. C. **Metodologia Científica (PPT)**. Paracambi: FAETEC/IST, 2007.

SANCHEZ-LABRADOR, L.; MOLINERO-MOURELLE, P.; PEREZ-GONZALEZ, F.; SAEZ-ALCAIDE, L. M. J. C.; BRINKMANN, J. C. B.; MARTINEZ, J. L. Q.; MARTINEZ-GONZALEZ, J. M. Desempenho clínico do aumento do rebordo alveolar com enxertos de blocos ósseos xenógenos versus enxertos de blocos ósseos autógenos. Uma revisão sistemática. **J. Stomatol. Oral Maxi.**, v. 122, n. 3, p. 293 – 302, 2021.

SCHORN, L.; FIENITZ, T.; DONNO, F.; STERNER-KOCK, A.; MAUL, A. C.; HOLTSMANN, H.; LOMMEN, J.; ROTHAMEL, D. Critical-size Defect Augmentation Using Sintered and Non-Sintered Bovine Bone Matrix - An Experimental Controlled Study in Minipigs. **J Oral Maxillofac Surg.**, v. 79, n. 9, p. 1866-1873, 2021.

SCHROPP, L.; WENZEL, A.; KOSTOPOULOS, L.; KARRING, T. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. **Int J Periodontics Restorative Dent.**, v. 23, n. 4, p. 313-323, 2003.

SCHROPP, L.; WENZEL, A.; KOSTOPOULOS, L.; KARRING, T. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. **Int J Periodontics Restorative Dent.**, v. 23, n. 4, p. 313-323, 2003.

SHAHI, S.; RAHIMI, S.; LOTF, M.; YAVARI, H.; GADERIAN, A. A comparative study of the biocompatibility of three root-end filling materials in rat connective tissue. **J Endod.**, v. 32, n. 8, p. 776-780, 2006.

SHEIKH, Z.; HAMDAN, N.; IKEDA, Y.; GRYPNPAS, M.; GANSS, B.; GLOGAUER, M. Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review. **Biomater Res.**, v. 5, n. 21, p. 9, 2017.

STOPA, Z. et al., Evaluation of the Safety and Clinical Efficacy of Allogeneic Bone Grafts in the Reconstruction of the Maxilla and Mandible. **Transplantation Proceedings**, v. 50, n. 7, p. 2199 – 2201, 2018.

TAN, W. L.; WONG, T. L.; WONG, M. C.; LANG, N. P. A systematic review of post-extractional alveolar hard and soft tissue dimensional changes in humans. **Clin Oral Implants Res.**, v. 23, n. 5, p. 1-21, 2012.

TOLEDANO-OSORIO, M. et al., Alveolar Bone Ridge Augmentation Using Polymeric Membranes: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Polymers**, v. 13, n. 7, p. 1172, 2021a.

TOLSTUNOV, L.; HAMRICK, J. F. E.; BROUMAND, V.; SHILO, D.; RACHMIEL, A. Bone Augmentation Techniques for Horizontal and Vertical Alveolar Ridge Deficiency in Oral Implantology. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am.**, v. 31, n. 2, p. 163-191, 2019.

TRAJKOVSKI, B.; JAUNICH, M.; MÜLLER, W. D.; BEUER, F.; ZAFIROPOULOS, G. G.; HOUSHMAND, A. Hydrophilicity, Viscoelastic, and Physicochemical Properties Variations in Dental Bone Grafting Substitutes. **Materials (Basel)**, v. 11, n. 2, p. 215, 2018.

TROBOS, M.; JUHLIN, A.; SHAH, F. A.; HOFFMAN, M.; SAHLIN, H.; DAHLIN, C. In vitro evaluation of barrier function against oral bacteria of dense and expanded polytetrafluoroethylene (PTFE) membranes for guided bone regeneration. **Clin Implant Dent Relat Res.**, v. 20, n. 5, p. 738-748, 2018.

TROELTZSCH, M.; TROELTZSCH, M.; KAUFFMANN, P.; GRUBER, R.; BROCKMEYER, P.; MOSER, N.; RAU, A.; SCHLIEPHAKE, H. Clinical efficacy of grafting materials in alveolar ridge augmentation: A systematic review. **J Craniomaxillofac Surg.**, v. 44, n. 10, p. 1618-1629, 2016.

TURRI, A. et al., Early plaque formation on PTFE membranes with expanded or dense surface structures applied in the oral cavity of human volunteers. **Clinical and Experimental Dental Research**, v. 7, n. 2, p. 137-146, 2021.

URBAN, I. A.; MONJE, A. Guided Bone Regeneration in Alveolar Bone Reconstruction. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am.**, v. 31, n. 2, p. 331-338, 2019.

URBAN, I. A.; MONTERO, E.; MONJE, A.; SANZ-SÁNCHEZ, I. Effectiveness of vertical ridge augmentation interventions: A systematic review and meta-analysis. **J Clin Periodontol.**, v. 46, n. 21, p. 319-339, 2019.

URBAN, I. A.; NAGURSKY, H.; LOZADA, J. L.; NAGY, K. Horizontal ridge augmentation with a collagen membrane and a combination of particulated autogenous bone and anorganic bovine bone-derived mineral: a prospective case series in 25 patients. **Int J Periodontics Restorative Dent.**, v. 33, n. 3, p. 299-307, 2013.

VIGNOLETTI, F.; MATESANZ, P.; RODRIGO, D.; FIGUERO, E.; MARTIN, C.; SANZ M. Surgical protocols for ridge preservation after tooth extraction. A systematic review. **Clin Oral Implants Res.**, v. 23, 5, p. 22-38, 2012.

VON, A. R. X. T.; BUSER, D. Horizontal ridge augmentation using autogenous block grafts and the guided bone regeneration technique with collagen membranes: a clinical study with 42 patients. **Clin Oral Implants Res.**, v. 17, n. 4, p. 359-366, 2006.

VON WILMOWSKY, C.; LUTZ, R.; MEISEL, U.; SROUR, S.; RUPPRECHT, S.; TOYOSHIMA, T.; NKENKE, E.; SCHLEGEL, K.; POHLE, D.; MÜNSTEDT, H.; RECHTENWALD, T.; SCHMIDT, M. In Vivo Evaluation of β -TCP Containing 3D Laser Sintered Poly (ether ether ketone) Composites in Pigs. **J Bioact Compat Pol.**, v. 24, p.169-184, 2009.

WANG, H. L.; BOYAPATI, L. "PASS" principles for predictable bone regeneration. **Implant Dent.**, v. 15, n. 1, p. 8-17, 2006.

WANG, X.; WANG, G.; ZHAO, X.; FENG, Y.; LIU, H.; LI, F. Short-Term Evaluation of Guided Bone Reconstruction with Titanium Mesh Membranes and CGF Membranes in Immediate Implantation of Anterior Maxillary Tooth. **Biomed Res Int.**, v. 24, n. (esp), p. 4754078, 2021.

WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, n. 20, p. 2941–2953, 2008.

WONG, R.; RABIE, A. Efeito do Bio-Oss® Colágeno e Matriz de Colágeno na Formação Óssea. **Abra Biomédica. Eng. J.**, v. 4, n. (esp), p. 71–76, 2010.

8. ANEXOS



FUNDAÇÃO EDSON QUEIROZ
UNIVERSIDADE DE FORTALEZA
ENSINANDO E APRENDENDO

COMISSÃO DE ÉTICA
NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO DE DIFERENTES TIPOS DE BIOMATERIAIS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA REGIÃO SUBCUTÂNEA E NA REPARAÇÃO ÓSSEA EM CALVÁRIA DE RATOS: UM ESTUDO MICROTOMOGRAFICO, HISTOLÓGICO E IMUNOISTOQUÍMICO.", protocolada sob o CEUA nº 3918230921, sob a responsabilidade de **Christiano Sampaio Gouvea** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Fortaleza (CEUA/UNIFOR) na reunião de 22/11/2021.

We certify that the proposal "EFFECT OF DIFFERENT TYPES OF BIOMATERIALS ON THE INFLAMMATORY RESPONSE IN SUBCUTANEOUS REGION AND BONE REPAIR IN RATS CALVARIA: A STUDY MICROTOMOGRAPHIC, HISTOLOGICAL AND IMMUNOISTOCHEMICAL.", utilizing 56 Heterogenics rats (56 males), protocol number CEUA 3918230921, under the responsibility of **Christiano Sampaio Gouvea** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Fortaleza's University (CEUA/UNIFOR) in the meeting of 11/22/2021.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [11/2021](#) a [10/2022](#) Área: [Medicina Veterinária](#)

Origem:	Não aplicável biotério			
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Machos	idade: 4 a 6 meses N: 28
Linhagem:	Rattus norvegicus, albinus, Holtzma			Peso: 250 a 300 g
Origem:	Não aplicável biotério			
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Machos	idade: 4 a 6 meses N: 28
Linhagem:	Rattus norvegicus, albinus, Holtzma			Peso: 350 a 400 g

Local do experimento: NUBEX LABORATÓRIO DE IMUNOHISTOQUÍMICA

Fortaleza, 22 de novembro de 2021

Prof. Dr. Ramon da Silva Raposo
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade de Fortaleza

Prof. Dr. Saulo Ellery Santos
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade de Fortaleza