

**Avaliação de um substituto ósseo confeccionado a partir de  
conchas de Ostras utilizando um modelo animal**

Ricardo de Sousa Coringa

2016

Ricardo de Sousa Coringa

**Avaliação de um substituto ósseo confeccionado a partir de  
conchas de Ostras utilizando um modelo animal**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Odontologia da  
Universidade CEUMA para obtenção do  
título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Odontologia  
Integrada.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dra. Letícia Machado  
Gonçalves.

Coorientador: Prof. Dr. Rudys Rodolfo de  
Jesus Tavares

São Luís

2016

C798a Coringa, Ricardo de Sousa

Avaliação de um substituto ósseo confeccionado a partir de conchas de ostras utilizando um modelo animal / Ricardo de Sousa Coringa. São Luís: UNICEUMA, 2016.

84 p.: il.

Dissertação (Mestrado) – Curso de Mestrado em Odontologia. Universidade CEUMA, 2016.

1. Biomateriais. 2. Conchas Marinhas. 3. Enxerto ósseo. I. Gonçalves, Leticia Machado (Orientadora). II. Título.

CDU: 616.314.18

Nome: Ricardo de Sousa Coringa

Título: Avaliação de um substituto ósseo confeccionado a partir de conchas de Ostras utilizando um modelo animal

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade CEUMA para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca Examinadora

Prof.<sup>a</sup> Dra. Letícia Machado Gonçalves  
Universidade CEUMA

---

Prof. Dr. Eduardo Buozi Moffa  
Universidade CEUMA

---

Prof.<sup>a</sup> Maria Carmen Nogueira  
Universidade Federal do Maranhão

---

## Dedicatória

A **Deus**, por me proporcionar a vida e uma profissão que também cuida dela.

Aos meus pais **Dogival Siqueira Coringa** e **Ieldinilde de Sousa Coringa** por toda atenção, educação e amor.

Ao meu irmão **Rafael de Sousa Coringa** por todos os conselhos e companheirismo.

À minha noiva **Caroline Silva Ramos** e meu filho **João Gabriel Ramos Coringa**, por todo amor, incentivo e carinho.

## **Agradecimentos**

À Universidade CEUMA, representada pelo **Prof. Ms. Marcos Barros**.

À Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão, representada pelo **Prof. Dr. Valério Monteiro Neto**.

Ao Programa de Mestrado Acadêmico em Odontologia representado pelo coordenador **Prof. Dr. Matheus Coelho Bandéca** e pelo coordenador adjunto **Prof. Dr. Rudys Rodolfo de Jesus Tavárez**.

A todos os docentes e funcionários do programa de mestrado da **Universidade CEUMA**, em especial a minha orientadora **Prof<sup>a</sup>. Dra. Letícia Machado Gonçalves**, por todo carinho, atenção, cuidado e paciência, ao qual tenho um enorme respeito, ao **Prof. Dr. Eduardo Martins de Sousa** do programa de mestrado em Biologia Parasitária, que nos deu uma imensurável ajuda, onde na ocasião não tenho palavras para agradecer.

A **Prof<sup>a</sup>. Dra. Joicy Cortez de Sá**, que fechou e abrilhantou nossa pesquisa com suas leituras histológicas, seremos sempre gratos por seu esforço em nosso trabalho.

A **Prof<sup>a</sup>. Dra. Juliana Nunes Botelho** da Faculdade de Odontologia de Piracicaba / Universidade Estadual de Campinas, FOP/UNICAMP, por ter colaborado com nossas pesquisas.

Aos meus colegas de equipe de trabalho em especial **Prof. Ms. Silvan Correa, Prof. Dr. Antônio José Duarte Ferreira Junior e Prof. Ms. Petrus Levid Barros Madeira**, por boa parte do que sou profissionalmente hoje, além de uma concreta amizade.

Aos meus colegas de mestrado, **Salma, Sâmara, Giovana, Mônica, Débora e Adriana**, por todos os momentos de aprendizado e felizes que passamos na Universidade CEUMA.

Ao amigo e companheiro de trilhas, **Prof. Ms. Arlan Freitas** do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão – IFMA, pela amizade e por ter participado dos experimentos deste trabalho.

Aos alunos de graduação em odontologia da Universidade CEUMA, **Leylanne Ribeiros Barros Lima, Hugo Costa e Costa e Juliana Fernanda Soares de Araújo** da Universidade Federal do Maranhão, por terem participado ativamente de nossos experimentos, inclusive aos sábados, perdendo um preciso final de semana frente à turbulenta fase da graduação Universitária.

Aos funcionários do biotério da Universidade CEUMA, **Sra. Socorro Ferreira** e **Sr. Edson Luís**, por terem cooperado no ambiente de experimentos de forma organizada e humanizada.

*“As invenções são, sobretudo, o  
resultado de um trabalho teimoso.”*

**Santos Dumont**

Coringa RS. Avaliação de um substituto ósseo confeccionado a partir de conchas de Ostras em modelo animal. [dissertação]. São Luís. Universidade CEUMA; 2016

## **RESUMO**

**Objetivo:** Realizar a caracterização química, de superfície, histológica e da biocompatibilidade de um substituto ósseo confeccionado a partir de conchas de Ostras utilizando um modelo animal. **Materiais e métodos:** Foram coletadas Ostras (*Crassostrea Rhizophora*) provenientes do município Raposa, Maranhão, Brasil. As conchas foram trituradas e peneiradas, obtendo-se partículas padronizadas. Posteriormente foram esterilizadas e denominada de Substituto Ósseo Experimental (SOE). A caracterização química do produto foi realizada através da Espectrometria de Emissão Óptica em Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES) e caracterização superficial através de Microscopia Eletrônica de varredura (MEV). Para análise histológica foram selecionados 36 ratos machos, saudáveis, adultos jovens, os quais foram divididos em 3 grupos: C – (nenhum substituto ósseo), C+ (Bio-Oss), E (SOE). Um defeito ósseo circunferencial foi criado para a deposição dos materiais em análise nos grupos C+ e E, enquanto no grupo C – apenas prevaleceu o defeito. Posteriormente foi realizada eutanásia dos ratos nos tempos de 1, 3, 6 e 8 semanas. Análises histológicas foram realizadas para a formação e qualidade do tecido ósseo. **Resultados:** O cálcio se apresentou de forma predominante, representando aproximadamente 71,68% do total da amostra. A análise por MEV evidenciou o SOE

com partículas irregulares. O grupo experimental (SOE) apresentou um processo de neoformação óssea mais acelerado comparado aos demais grupos, havendo diferença estatisticamente significativa entre este e os demais grupos a partir da 3<sup>a</sup> semana ( $p = 0.03112$ ). No entanto, a partir da 6<sup>a</sup> semana, o processo de neoformação óssea foi similar entre todos os grupos ( $p > 0,05$ ). Todos os grupos evidenciaram um padrão de osso lamelar imaturo após completadas as 8 semanas de experimentação ( $p > 0,05$ ) **Conclusão:** Considerando as limitações deste estudo, pode-se concluir que o SOE foi biocompatível e apresentou um processo de neoformação óssea acelerado nas primeiras semanas de experimento do modelo avaliado.

**Palavras-Chaves:** Biomateriais; Conchas Marinhas; Enxerto ósseo.

Coringa RS. Evaluation of a bone substitute made from Oyster shells in animal model. [dissertation]. São Luís. Universidade CEUMA; 2015

## **ABSTRACT**

**Objective:** Perform chemical, surface, histological and biocompatibility of a bone substitute made from Oyster shells using an animal model. **Materials and Methods:** We collected Oysters (*Crassostrea Rhizophora*) from the municipality Raposa, Maranhao, Brazil. The shells were ground and sieved to give particles standard. Subsequently they were sterilized and called Bone Substitute Experimental (BSE). The chemical characterization of the product was performed by Optical Emission Spectrometry Inductively Coupled Plasma (SOE-ICP) and surface characterization by scanning electron microscopy (SEM). For histological analysis mice were selected 36 male, healthy, young adults, which were divided into 3 groups: C - (no bone replacement), C + (Bio-Oss), E (BSE). A circumferential bone defect was created for the deposition of materials analysis in C + and E groups while in group C - only prevailed the defect. It was subsequently performed euthanasia of mice in days 1, 3, 6 and 8 weeks. Histological analyzes were performed for the formation and quality of bone tissue. **Results:** Calcium presented the predominant form, representing approximately 71.68% of the total sample. SEM analysis showed irregular particles with SOE. The experimental group (BSE) had a faster bone formation process compared to other groups, a statistically significant difference between this and the other groups

from the third week ( $p = 0.03112$ ). However, from the 6th week, the process of bone formation was similar among all groups ( $p > 0.05$ ). All groups showed a pattern of immature lamellar bone after completed the 8-week trial ( $p > 0.05$ ) **Conclusion:** Considering the limitations of this study, it can be concluded that the BSE was biocompatible and presented an accelerated bone formation process in first weeks of experimental model evaluated.

**Key Words:** Biomaterials; Sea Shells; Bone graft

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Divisão dos animais em grupos e subgrupos	
<b>Tabela 2.</b> Quantidades expressas de minerais (g/kg)	31
<b>Tabela 3.</b> Quantidades expressas de contaminantes (g/kg).	32
<b>Tabela 4.</b> Distribuição dos animais de acordo com os escores atribuídos para a avaliação da formação e qualidade do tecido ósseo neoformado.	35

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1.** Formação e qualidade do tecido ósseo neoformado. 30

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Caracterização de superfície por MEV.	33
<b>Figura 2.</b> Avaliação da formação e qualidade do tecido ósseo neoformado nos diferentes tempos investigados	36 39
<b>Figura 3.</b> Análise histológica.	

## SUMÁRIO

RESUMO .....	20
INTRODUÇÃO .....	22
MATERIAIS E MÉTODOS .....	23
RESULTADOS .....	31
DISCUSSÃO .....	40
CONCLUSÃO .....	44
REFERÊNCIAS .....	45
ANEXOS .....	49



# ***CAPÍTULO 1***

**Avaliação de um substituto ósseo confeccionado a partir de  
conchas de Ostras em modelo animal**

**R. de Sousa. Coringa\*<sup>1</sup>, R. de Jesus. Tavares<sup>1</sup>, E. M. de Sousa<sup>1</sup> L.**

**Machado Gonçalves<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Faculdade de Odontologia, Universidade CEUMA, São Luís,  
Maranhão, Brasil.



## RESUMO

**Objetivo:** Realizar a caracterização química, de superfície, histológica e da biocompatibilidade de um substituto ósseo confeccionado a partir de conchas de Ostras utilizando um modelo animal. **Materiais e métodos:** Foram coletadas Ostras (*Crassostrea Rhizophora*) provenientes do município Raposa, Maranhão, Brasil. As conchas foram trituradas e peneiradas, obtendo-se partículas padronizadas. Posteriormente foram esterilizadas e denominada de Substituto Ósseo Experimental (SOE). A caracterização química do produto foi realizada através da Espectrometria de Emissão Óptica em Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES) e caracterização superficial através de Microscopia Eletrônica de varredura (MEV). Para análise histológica foram selecionados 36 ratos machos, saudáveis, adultos jovens, os quais foram divididos em 3 grupos: C – (nenhum substituto ósseo), C+ (Bio-Oss), E (SOE). Um defeito ósseo circunferencial foi criado para a deposição dos materiais em análise nos grupos C+ e E, enquanto no grupo C – apenas prevaleceu o defeito. Posteriormente foi realizada eutanásia dos ratos nos tempos de 1, 3, 6 e 8 semanas. Análises histológicas foram realizadas para a formação e qualidade do tecido ósseo. **Resultados:** O cálcio se apresentou de forma predominante, representando aproximadamente 71,68% do total da amostra. A análise por MEV evidenciou o SOE com partículas irregulares. O grupo experimental (SOE) apresentou um processo de neoformação óssea mais acelerado comparado aos demais grupos, havendo diferença estatisticamente significativa entre

este e os demais grupos a partir da 3<sup>a</sup> semana ( $p = 0.03112$ ). No entanto, a partir da 6<sup>a</sup> semana, o processo de neoformação óssea foi similar entre todos os grupos ( $p > 0,05$ ). Todos os grupos evidenciaram um padrão de osso lamelar imaturo após completadas as 8 semanas de experimentação ( $p > 0,05$ ) **Conclusão:** Considerando as limitações deste estudo, pode-se concluir que o SOE foi biocompatível e apresentou um processo de neoformação óssea acelerado nas primeiras semanas de experimento do modelo avaliado.

**Palavras-Chaves:** Biomateriais; Conchas Marinhas; Enxerto ósseo.

## 1. INTRODUÇÃO

A preservação do processo alveolar em áreas de perda dentária e a adoção de procedimentos que minimizem a perda óssea ou recuperem as dimensões desejáveis do rebordo alveolar estão entre os objetivos da reabilitação (1). Edentulismo oriundos de doenças periodontais avançadas, traumas, malformações e neoplasias também podem levar a atrofia das estruturas ósseas maxilares gerando reabsorções que inviabilizam a reabilitação oral, havendo comprometimento funcional e estético. À vista disso, uma quantidade e qualidade óssea adequada podem ser consideradas um pré-requisito para realização de procedimentos reabilitadores quando são utilizadas próteses implantossuportadas (2).

A regeneração destas áreas utilizando osso autógeno é considerada padrão ouro como material de enxerto ósseo. Contém osteoblastos viáveis e células precursoras osteogênicas, proporcionando estruturas para osteocondução e fatores de crescimento para osteoindução (3). Apesar dos enxertos autógenos estarem sendo utilizados com sucesso em vários distúrbios ósseos, existem limitações dentre as quais encontramos, o desafio de coleta do material suficiente e o trauma na área doadora (4).

Avanços tecnológicos na área da biologia óssea tornaram possível desenvolver biomateriais capazes de influenciar seletivamente na formação óssea (5). Dentre eles os xenógenos, que se assemelham com o osso humano, e a utilização de materiais renováveis pela própria natureza. Um exemplo é o uso do osso bovino

como biomaterial de enxerto (6). Dentre os xenógenos, também existem fontes alternativas usadas na produção de biomateriais, tais como a casca de ovos de avestruz (7) e as conchas marinhas (8,9).

As conchas de ostras podem se apresentar como fonte promissora na confecção de biomaterial para enxertia óssea, uma vez que apresentam como constituinte principal a calcita, um cristal à base de carbono de cálcio, e também possuem em sua estrutura orgânica proteínas ósseas morfogenéticas praticamente idênticas às encontradas em humanos (10).

Estudos físico-químico e mineral do pó da casca da ostra (*Crassostrea rhizophorae*) de amostras colhidas dos municípios de Alcântara, Cururupu e Raposa, localizados no estado do Maranhão, revelaram valores ricos em óxido e carbonato de cálcio, mineral este que compõe a calcita, fonte promissora na confecção de biomateriais, tornando esta matéria prima de fácil acesso uma fonte favorável para a aplicação (11). Este trabalho visa um estudo preliminar utilizando conchas da *Crassostrea Rhizophorae* em ratos, como fonte alternativa na confecção de um biomaterial.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Preparo e caracterização química do material experimental**

Foram coletadas ostras (*Crassostrea rhizophora*) com o mesmo tempo de vida, oriundas de um mesmo viveiro biologicamente assistido, provenientes do município Raposa, Maranhão, Brasil. As conchas das ostras foram limpas em água corrente com auxílio de

escovão de aço e secas em exposição solar. A superfície externa da concha foi removida sob irrigação, o que resultou na camada interna da concha, livre de resíduos e/ou contaminantes.

Com auxílio de um pilão manual em porcelana, a camada interna da concha foi triturada e peneirada em uma peneira com orifícios de 1,5 mm para padronização do tamanho das partículas. O material peneirado resultou em 6 gramas do produto final, o qual foi esterilizado por meio de irradiação Gama. O produto foi armazenado em frasco estéril apropriado e denominado de Substituto Ósseo Experimental (SOE).

## **2.2. Caracterização química do SOE**

Aproximadamente 160-180 mg de SOE, em triplicata foi submetido ao processo de digestão química com ácido sulfúrico a 98%, ácido nítrico P.A a 65% e peróxido de hidrogênio a 30%. Depois de finalizada a digestão, armazenou-se a amostra em recipiente para a análise dos metais, os quais foram investigadas por Espectrometria de Emissão Óptica em Plasma individualmente acoplado (ICP-OES).

## **2.3. Caracterização de superfície do SOE e do Bio-Oss**

Aproximadamente 1,0 grama das partículas do SOE e do substituto ósseo utilizado como grupo controle positivo (Bio-Oss, Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland) foram colocadas em suporte metalizado e observadas em Microscópio Eletrônico de

Varredura (MEV), afim de avaliar o tamanhos das partículas e sua superfície.

#### **2.4. Aplicação em modelo animal**

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade CEUMA, sob o número de protocolo 202/2015. Foram selecionados aleatoriamente 36 ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Holtzman*) machos, saudáveis, adultos jovens com aproximadamente 4 meses de vida e peso corporal aproximado de 180 gramas.

Previamente à realização dos procedimentos cirúrgicos, foi realizado um protocolo de destresse, no qual os animais foram mantidos individualmente em gaiolas durante 24 horas. Após, os animais foram anestesiados via intramuscular com (Ketamina, Paulínia, São Paulo, Brasil) na dose de 60 mg/kg de peso corporal, associado com Xilazina (Kensol, Avellaneda, Argentina) na dose de 8 mg/kg de peso corporal.

Foi realizada a tricotomia da região submandibular esquerda de cada animal e, em seguida, a antissepsia local com iodo. Cada animal foi posicionado em decúbito lateral esquerdo no qual recebeu um campo fenestrado cirúrgico estéril na região de cabeça-pescoço.

Uma incisão de 2 cm foi realizada em região submandibular esquerda de maneira linear com auxílio de uma lâmina de bisturi 15C descartável. A incisão foi realizada em planos teciduais, seguido de

rebatimento da pele, músculo e periósteo para exposição do osso mandibular.

Um defeito circunferencial de aproximadamente 3 mm de diâmetro e 2mm de profundidade foi realizado com auxílio de uma broca diamantada esférica em baixa rotação sob irrigação copiosa.

Os animais com os defeitos confeccionados foram sorteados de forma aleatória simples e divididos em 3 grupos, conforme a Tabela 1.

**Tabela 1. Divisão dos animais em grupos e subgrupos.**

<b>Grupo</b>	<b>1 Semana</b>	<b>3 Semanas</b>	<b>6 Semanas</b>	<b>8 Semanas</b>
<b>Controle -</b>	C1	C3	C6	C8
<b>Controle +</b>	P1	P3	P6	P8
<b>Experimental</b>	E1	E3	E6	E8

*n total de cada grupo= 12, n de cada subgrupo =3*

Os animais do **grupo controle negativo** receberam o defeito ósseo, no entanto, nenhum substituto ósseo foi inserido neste defeito, a fim de avaliar o crescimento ósseo fisiológico.

Os animais do **grupo controle positivo** receberam o defeito ósseo e, logo após foi inserido o substituto ósseo de origem bovina Bio-Oss® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland). A quantidade de material introduzido no leito cirúrgico foi de aproximadamente 7,0 mg. Sob o Bio-Oss® foi posicionada uma membrana biológica de origem bovina (GenDerm, Baumer, Mogi

Mirim, São Paulo, Brasil) para propiciar a condução isolada do substituto ósseo.

Os animais do **grupo experimental** receberam o defeito ósseo e, logo após foi inserido aproximadamente 7,0 mg do SOE também recoberto sobre uma membrana biológica de origem bovina.

Ao término dos procedimentos cirúrgicos, o perióstio e os planos musculares foram reposicionados e suturados com fio Catgut 4.0 mm (Bioline, Anápolis, Goiás, Brasil), e pele com fio nylon 5.0 mm (Technofio, Goiânia, Goiás, Brasil). Os animais foram mantidos isolados em gaiolas em boas condições de nutrição, temperatura, iluminação e higiene. Todos os animais receberam terapia antibiótica com Cefalotina por via subcutânea (25 mg/kg, ABL, Cosmópolis, São Paulo, Brasil) por 5 dias, e única dose de morfina por via subcutânea (1 mL, Bayer, Alemanha) logo após o término do procedimento.

Para todos os grupos experimentais, as eutanásias ocorreram de forma humanizada com uso de câmara de CO<sub>2</sub> (Insight – EB 248, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) nos tempos de 1, 3, 6 e 8 semanas pós-cirurgia. As mandíbulas foram removidas com técnica cirúrgica apropriada e o bloco da região do defeito ósseo foi extraído. As peças foram fixadas em formol tamponado a 10% em um recipiente de vidro durante 96 horas.

## **2.5. Processamento das peças cirúrgicas**

As peças foram descalcificadas em solução de EDTA durante 30 dias com troca de solução a cada 3 dias, sendo mantidas em cassetes plásticos a fim de impedir o contato do material com a superfície do frasco, facilitando a descalcificação. Após, o material foi lavado em água corrente por 10 minutos e, em seguida processado no aparelho histotécnico (Thermo scientific - STP 120, San José, Califórnia, EUA) em uma sequência de desidratação com álcoois crescentes (70%, 80%, 90% e absoluto). Foi realizada a diafanização em xilol, embebidos e incluídos em módulo de inclusão de parafina aquecida (Leica-EG 1150 H, Guadalajara, Jalisco, México) e resfriado em prancha fria (Microm-AP 280-1, Alemanha).

O material processado foi cortado em micrótomo (Microm-HM 315, Alemanha) com cortes semi-seriados com 4,0 µm de espessura, utilizando lâminas descartáveis. O plano de secção dos cortes foi transversal em relação ao defeito ósseo. As lâminas foram desparafinizadas e reidratadas para posterior coloração.

Os cortes foram corados pela Hematoxilina e Eosina (H&E) para análise morfológica, e em Tricrômico de Masson (TM) a fim de evidenciar a neoformação óssea frente às condições experimentais.

## **2.6. Análise histológica**

A análise histológica foi realizada com auxílio de um microscópio óptico (Zeiss- Axio Imager 2, Oberkochen, Alemanha), utilizando como critério a formação e qualidade do tecido ósseo

neoformado (Quadro 1). Para tal, cada lâmina foi analisada nos aumentos de 5 a 40X, em 10 campos distintos, percorridos de forma aleatória, sendo realizadas fotomicrografias para documentar os diferentes escores avaliados. As análises histológicas foram conduzidas de forma “cega” por um especialista em histologia.

### Quadro 1. Formação e qualidade do tecido ósseo neoformado.

Score	Caracteres avaliados
1	Neoformação tecidual (preenchimento do defeito com tecido conjuntivo contendo capilares sanguíneos, fibroblastos, macrófagos e neoformação fibras colágenas).
2	Tecido conjuntivo denso sugerindo a diferenciação para tecido ósseo com presença de muitas células, fibroblastos e osteoblastos, e fibras em processo de organização.
3	Neoformação óssea, no qual o tecido conjuntivo encontra-se em processo de diferenciação formando matriz óssea, ou ósteon; apresentando, portanto, osteoblastos, osteoclastos e osteócitos.
4	Presença de tecido ósseo lamelar imaturo.

FONTE: Adaptado de Dahlin et al., 1988; Hedner & Linde, 1995; Pretel, 2005.

### 2.7. Análise Estatística

Os dados obtidos a partir da codificação dos resultados foram tratados estatisticamente através de testes não-paramétricos. Foram considerados como fatores de estudo os grupos C-, C+ e E. As variáveis respostas foram os escores referentes à formação e qualidade óssea. Com auxílio do software SAS 9.0 foi empregado o teste de Kruskal-Wallis com finalidade de comparação entre os

grupos. O nível de significância empregado foi de 5% para todos os testes.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Caracterização química do SOE

O cálcio (Ca) foi o mineral que apresentou-se de forma predominante frente aos demais minerais representando aproximadamente 71,68% do total da amostra (Tabela 2). Minerais contaminantes não predominaram, representando valores insignificantes (Tabela 3).

**Tabela 2. Quantidades expressas de minerais (g/kg).**

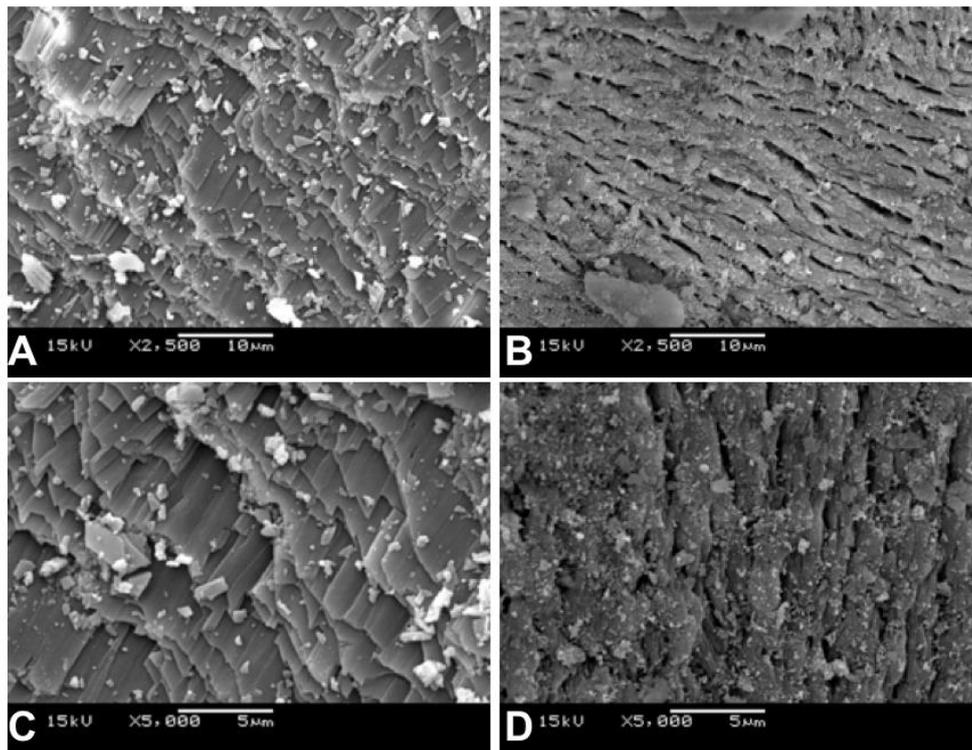
Minerais		g/kg
Cálcio	Ca	5.52 ± 0.17
Potássio	K	0.019 ± 0.00032
Magnésio	Mg	0.517 ± 0.26
Manganês	Mn	0.005 ± 0.0004
Sódio	Na	1.429 ± 0.041
Fósforo	P	0.211 ± 0.062
Ferro	Fe	ND
Zinco	Zn	ND

**Tabela 3. Quantidades expressas de contaminantes (g/kg).**

Contaminantes		g/kg
Alumínio	Al	0.004 ± 0.0038
Cádmio	Cd	ND
Cromo	Cr	ND
Cobre	Cu	ND
Mercúrio	Hg	0.0004 ± 0.0002
Chumbo	Pb	0.011 ± 0.005

### **3.2. Caracterização de superfície do SOE e do Bio-Oss**

Nos aumentos de 2.500X (Figuras 1a e 1b) e de 5.000X (Figuras 1c e 1d) pode-se perceber uma irregularidade maior no tamanho das partículas do SOE (Figuras 1a e 1c), enquanto o Bio-Oss apresentou uma maior homogeneidade em suas partículas (Figura 1b e 1d).



**Figura 1. Caracterização de superfície por MEV utilizando aumento de 2.500X do (A) SOE e (B) Bio-Oss; e utilizando aumento de 5.000X do (C) SOE e (D) Bio-Oss.**

### 3.3. Análise histológica

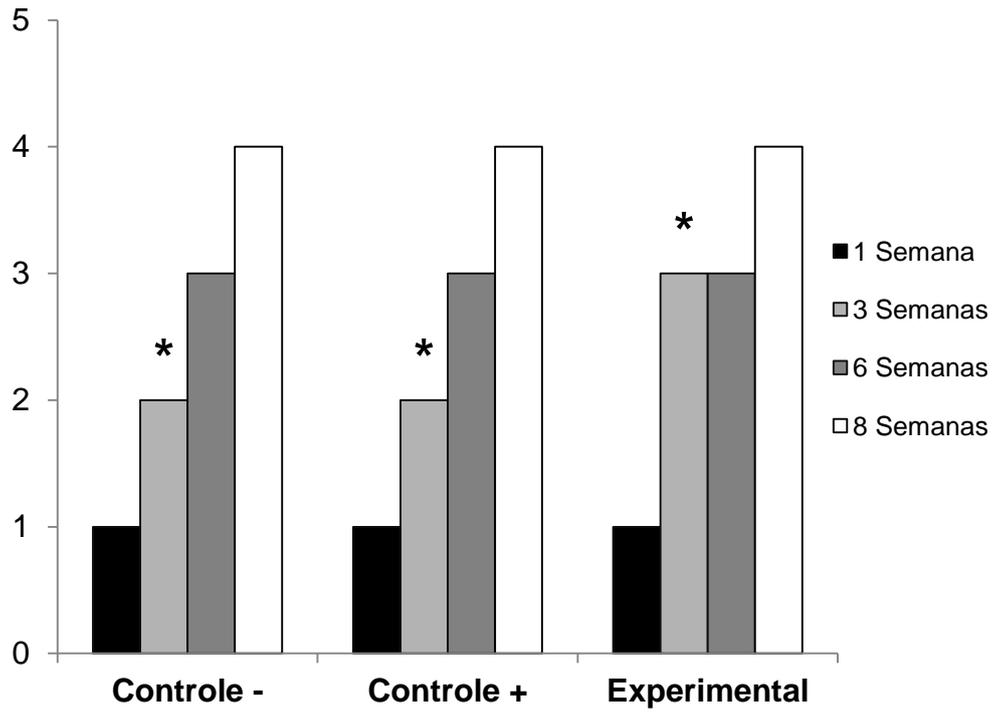
Na análise histológica dos três grupos foi constatada a ausência de processo inflamatório em todos os tempos selecionados, que corresponderam a 1, 3, 6 e 8 semanas após a realização do defeito ósseo.

Em relação à distribuição dos animais quanto aos escores de da formação e qualidade do tecido ósseo percebeu-se diferentes escores conforme os grupos, bem como graus progressivos do processo de neoformação durante cada período avaliado (Tabela 4).

Observa-se que o grupo experimental (SOE) apresentou um processo de neoformação óssea mais acelerado comparado aos demais grupos, havendo diferença estatisticamente significativa entre este e os demais grupos a partir da 3ª semana ( $p = 0.03112$ , Figura 2). No entanto, a partir da 6ª semana, o processo de neoformação óssea foi similar entre todos os grupos ( $p > 0,05$ ), sendo que todos os grupos evidenciaram um padrão de osso lamelar imaturo após completadas as 8 semanas de experimentação ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 4. Distribuição dos animais de acordo com os escores atribuídos para a avaliação da formação e qualidade do tecido ósseo neoformado.**

Grupos	n	Escore			
		1	2	3	4
<b>Controle -</b>					
<i>1 semana</i>	3	3	0	0	0
<i>3 semanas</i>	3	1	2	0	0
<i>6 semanas</i>	3	0	1	2	0
<i>8 semanas</i>	3	0	0	1	2
<b>Controle +</b>					
<i>1 semana</i>	3	3	0	0	0
<i>3 semanas</i>	3	0	3	0	0
<i>6 semanas</i>	3	0	0	2	1
<i>8 semanas</i>	3	0	0	1	2
<b>Experimental</b>					
<i>1 semana</i>	3	3	0	0	0
<i>3 semanas</i>	3	0	1	2	0
<i>6 semanas</i>	3	0	1	2	0
<i>8 semanas</i>	3	0	0	1	2



**Figura 2. Avaliação da formação e qualidade do tecido ósseo neoformado nos diferentes tempos investigados. Asterisco (\*) indicam que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no mesmo tempo ( $p < 0,05$ ).**

No **grupo C-** foi verificado na primeira semana o início da neoformação tecidual, com predominância de tecido conjuntivo, em especial nas bordas do defeito ósseo. De forma pontual, verificou-se algumas células com padrão citológico compatível a osteoblastos. Nos períodos subsequentes de avaliação, essa neoformação foi progredindo com a presença de osteócitos e trabéculas ósseas ocupando o espaço outrora preenchido por tecido conjuntivo, caracterizando uma ossificação intramembranosa (Figura 3A). Após 8 semanas, verificou-se na área do defeito uma ampla expansão de preenchimento por osso lamelar imaturo, pequenas áreas multifocais contendo tecido conjuntivo, além de áreas de coaptação de bordas por tecido ósseo e em alguns pontos ainda havia a presença de tecido conjuntivo na periferia do defeito (Figura 3D).

O **grupo C+** demonstrou uma neoformação óssea que se iniciou de modo mais acentuado, apresentando trabéculas ósseas, com osteoblastos, osteócitos e osteoclastos desde a terceira semana de avaliação (Figura 3B). O substituto ósseo utilizado neste grupo persistiu durante todo o período de avaliação, estando completamente envolto por tecido conjuntivo e/ou trabéculas ósseas. De modo semelhante aos demais grupos, o processo de osteogênese iniciou pelas bordas, porém no grupo C+ constatou-se uma coaptação de bordas quase completamente finalizada na área do defeito, apresentando uma pequena região com tecido conjuntivo em transformação (Figura 3E).

O **grupo experimental** apresentou padrão de progressão histológica semelhante ao grupo C-, contudo, é válido ressaltar que desde a primeira semana de avaliação já haviam a presença dos osteoblastos e osteoclastos, em especial ao redor do material basofílico particularizado, estando essas células em maior quantidade no tempo de três semanas (Figura 3C). Adicionalmente, a distribuição das trabéculas ósseas, bem como a formação e organização do ósteon estava mais acentuada do que no grupo C-.

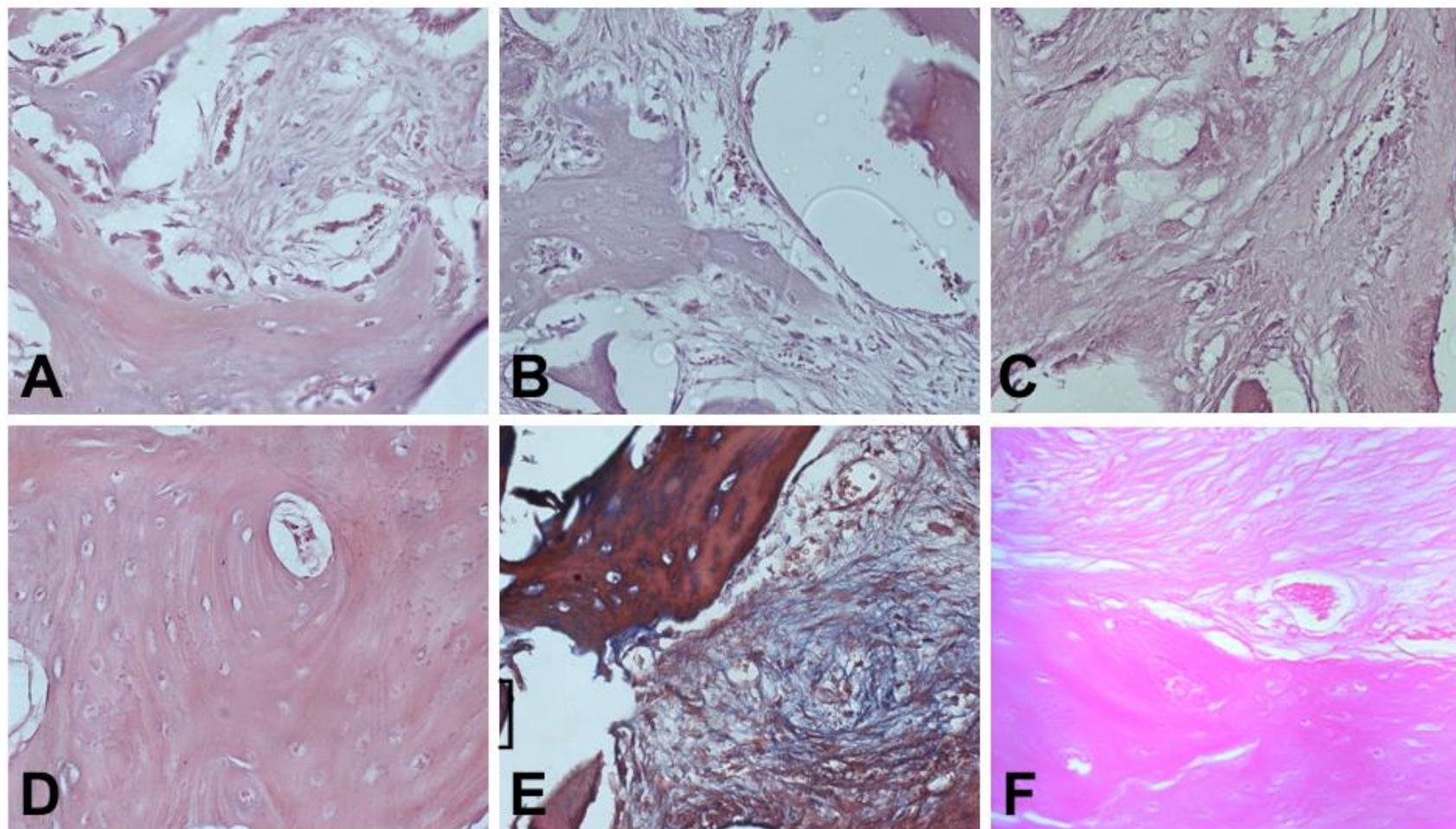


Figura 3. Análise histológica com aumento de 40X após 3 semanas dos grupos (A) C-, (B) C+ e (C) experimental; e após 8 semanas dos grupos (D) C-, (E) C+ e (F) experimental.

#### 4. DISCUSSÃO

O uso de conchas marinhas como biomaterial de enxertia óssea, está em evidência com o desenvolvimento autossustentável e é muito discutido nos tempos de hoje.

Dependendo da injúria, o reparo ósseo envolve fenômenos tanto de regeneração quanto de cicatrização. Apesar de o tecido ósseo apresentar um alto potencial de reparo, defeitos ósseos podem não cicatrizar com o tecido. Materiais de enxerto ósseo podem facilitar o reparo (12). A procura por substitutos que apresentem propriedades similares a do osso autógeno fez com que as pesquisas desenvolvessem materiais sintéticos, com o objetivo de reduzir a morbidade dos procedimentos cirúrgicos (13).

A alta concentração de cálcio, observada no biomaterial oriundo de concha marinhas é confirmada por, Alemida U et al (14) que relata que o cálcio se apresenta sob a forma de algum tipo de óxido. Sciadini et al (15) ressaltam que um alto conteúdo de cálcio, no biomaterial, é essencial para a neoformação do tecido ósseo.

A utilização do osso bovino liofilizado (Bio-Oss®) como biomaterial comparativo, se deu pelo fato de ser um dos substitutos ósseos mais amplamente usados pelo seu ótimo potencial osteocondutor (16). É um osso bovino mineral desproteínizado, com estrutura semelhante ao osso medular humano, tanto em sua morfologia estrutural quanto em sua composição mineral. Possui uma estrutura constituída por uma superfície ultraporosa e um sistema de poros interconectados, que funciona como uma microesponja,

proporcionando a entrada de células sanguíneas, osteoblastos, osteoclastos e proteínas, o que permite, dessa forma, a osseointegração eficaz de suas partículas.

Segundo a análise da MEV do SOE, pode-se observar que os tamanhos das partículas não se apresentam regular, e sua composição assemelha-se a um aglomerado de outras subpartículas, caracterizando um aspecto de porosidade. Em comparação a MEV do Bio-Oss®, verifica-se uma homogeneidade das partículas e semelhança em seu arcabouço. Logo, as características estruturais de arcabouços para engenharia tecidual afetam a resposta celular e devem ser elaboradas para promover adesão celular, proliferação e a diferenciação. (17). Os microporos garantem a elevada ação capilar, ambiente ideal para a neoformação óssea, pois permitem a entrada de células sanguíneas como os osteoblastos e proteínas nas partículas do material. (18)

Como em outros estudos experimentais o rato foi escolhido como modelo *in vivo*, devido às vantagens em termos de facilidade de aquisição, manutenção e manipulação cirúrgica. Este modelo específico apresentou uma similaridade com as situações clínicas de enxerto ósseo, pois se obteve um comportamento clínico da ferida cirúrgica mais realística, o animal apresenta basicamente os mesmos planos teciduais, além de que os osteoclastos, tanto humanos como de ratos, apresentam um padrão similar de reabsorção (19).

A biocompatibilidade do SOE foi determinada pela ausência de áreas de reação inflamatória aguda persistente após 8 semanas.

Confirmando isto, Lamghari et al (20) descreveram que fragmentos do nacre da concha (*Pinctada máxima*) induzem a uma resposta biológica quando implantados em osso de ovelha, como uma atividade osteogênica local e de integração do nacre no osso do hospedeiro, sem nenhuma reação inflamatória. Ainda, o SOE apresentou um processo de neoformação óssea acelerada, havendo diferença estatisticamente significativa entre este com os demais grupos a partir da 3ª semana, observado na Figura 2.

Confirmando isto, Lamghari et al (20), sugere que a matriz da camada nacre da concha produz sinais químicos que podem ser liberados em um meio fisiológico e que são capazes de ativar osteoblastos. No entanto, a partir da 6ª semana, o processo de neoformação óssea foi similar entre todos os grupos, sendo que todos evidenciaram um padrão de osso lamelar imaturo após completadas as 8 semanas de experimentação. Sabe – se que a formação do osso passa por uma fase inicial de formação de tecido de granulação até o amadurecimento em tecido ósseo mineralizado. Arisawa et al. (21) relata que na fase de cicatrização, o osso vai ganhando quantidades de uma massa fusiforme. No meio da fase reparativa, começa a etapa de remodelação e de reabsorção de porções desnecessárias do calo de colágeno, bem como a fixação da trabécula óssea ao longo das linhas de estresse.

Desde a primeira semana de avaliação o SOE, já havia a presença dos osteoblastos e osteoclastos, em especial ao redor do material basófilo particularizado, estando essas células em maior

quantidade no tempo de três semanas (Figura 3C). Em relação a união das partículas do SOE com o osso, verificou-se, que ao final da avaliação, houve pontos de coaptação do tecido ósseo neo formado com as bordas da incisão. De acordo com Davies (22), esta linha cimentante representa não apenas uma união química do osso com a superfície do biomaterial, mas uma interdigitação micromecânica, possivelmente de proteínas não colagenosas, sinal favorável a migração de osteoclastos, ou seja, ao remodelamento.

Os resultados desta pesquisa indicam que o SOE é aceito pelos tecidos orgânicos de animais e que mesmo de forma moderada aumentou a osteogênese, ou seja, foi capaz de estimular a formação de osso diretamente a partir de osteoblastos; e de forma intensa se caracterizou osteoindutor, onde permite a aposição de um novo tecido ósseo na sua superfície, requerendo a presença de tecido ósseo pré-existente como fonte de células osteoprogenitoras (23).

## **5. CONCLUSÃO**

A caracterização química do SOE apresentou um alto teor de Cálcio, dessa forma a concha da ostra pode ser caracterizada como um material em potencial para o desenvolvimento de biomateriais com características osteoindutoras. Neste estudo preliminar, “in vivo”, pode-se observar que o SOE apresenta biocompatibilidade e um processo de neoformação óssea mais acelerado nas primeiras semanas de experimento. Apesar das limitações deste estudo preliminar, ele servirá de base para novos estudos onde o SOE poderá ser considerado um material de eleição durante as etapas de enxertia óssea.

## REFERÊNCIAS

1. Calixto RFE, Teófilo JM, Bretegeani LG, Lamano T. Comparison of rat bone healing following intra-alveolar grafting with organic or inorganic bovine bone particles. *Braz J Oral Sci* 2008, 7:24.
2. Nkenke E, Neukmam FW. Autogenous bone harvesting and grafting in advanced jaw resorption: Morbidity, resorption and implant survival. *Eur J Oral Implantol* 2014;7:2:203–217.
3. Sun C, Tian Y, Xu W, Zhou C, Xie H, Wang X. Development and performance analysis of Si- CaP/fine particulate bone powder combined grafts for bone regeneration. Sun et al. *BioMed Eng OnLine* 2015.
4. Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O, Ohman A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Int J Oral Maxillof* 1981;10:387-416.
5. De Carvalho PSP, Rosa AL, Bassi APF, Pereira LAVD. Biomateriais aplicados a Implantodontia. *Rev Implantnews* 2010;7:56-65.
6. Stavropoulos A, Karring T. Guided tissue regeneration combined with a deproteinized bovine bone mineral (Bio-Oss) in the treatment of intrabony periodontal defects: 6-year results from a randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2010;37(2):200-10.
7. Dupoirieux L. Ostrich eggshell as a bone substitute: a preliminary report of its biological behaviour in animals--a possibility in facial

reconstructive surgery. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1999 Dec;37(6):467-71.

8. Lamghari M, Berland S, Laurent A, Huet H, Lopez E. Bone reactions to nacre injected percutaneously into the vertebrae of sheep. *Biomaterials* 2001;22(6):555-62.

9. Buser D. Regeneração óssea guiada nos últimos 20 anos. In: Buser D et al. 20 Anos de Regeneração Óssea Guiada na Implantodontia, 2. Ed. São Paulo: Quintessence 2010. Cap. 1, p. 1-13.

10. Kirker-Head CA, Gerhart TN, Schelling SH, Hennig GE, Wang E, Holtrop ME. Long-term Healing of bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2. *Clin Orthop Relat Res* 1995;318:222-230.

11. Freire S F, Rabêlo WF, Filho VEM, Souza CER, Júnior VD, Cutrim E F S, Oliveira ID, Souza GL. Estudo da qualidade físico-química e do mineral cálcio no Pó da Concha de Ostra (*Crassostrea rhizophorae*), comercializado na cidade de São Luís, Maranhão. Available from URL: <http://www.abq.org.br/entequi/2009/trabalhos/13-5878.htm>.

12. Mavrovrogenis AF, Dimitriou R, Parvani J, Babis GC. Biology of implant osseointegration *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2009;9:61-71.

13. Jardim ECG, Dos Santos PL, Junior JFS, Júnior EGJ, Aranega AM, Júnior IRG. Enxerto ósseo em odontologia. *Rev Odontol Araç* 2009;30:24-28.

14. Almeida JD, Carvalho YR, Rocha RF, Arisawa EAL. Estudo da reparação óssea em mandíbula de ratos. Pós-Grad Rev Fac Odontol São José dos Campos 2000;3:49-53.
15. Sciadini M F., et al. Evaluation of bovine-derived bone protein with a natural coral carrier as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model. J Orthop Res 1997;15: 844-857.
16. Gutwald R, Haberstroh J, Kuschnierz J, Kister C, Lysek DA, Maglione M, et al. Mesenchymal Stem Cells And Inorganic Bovine Bone Mineral In Sinus Augmentation: Comparison With Augmentation By Autologous Bone In Adult Sheep. Br J Oral Maxillofac Surg. 2010;48(4):285-90.
17. Smith IO, Liu XH, Smith LA, Ma PX. Nanostructured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2009;1(2):226-36.
18. Bufler MA. Material analysis, department of analytical research, Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Switzerland.
19. Aaron RK, Wang S, Ciombor DM: Upregulation of basal TGFbeta1 levels by EMF coincident with chondrogenesis: implications for skeletal repair and tissue engineering. J Orthop Res 2002; 20:233-240.
20. Lamghari M, Berland S, Laurent A, Huet H, Lopez E. Bone reactions to nacre injected percutaneously into the vertebrae of sheep. Biomaterials 2001;22(6):555-62.

21. Arisawa E et al. The role of calcitonin in bone repair of ovariectomized rats. Pós-Grad. Rev. Fac. Odontol. São José dos Campos 2000;3.
22. Davies JE. Bone bonding at natural and biomaterial surfaces. Biomaterials 2007;28(34):508-5067.
23. Masters DH. Implants. Bone and bone substitutes. Calif Dent Assoc J. 1988;16(1):56- 65.

# ***Anexos***

## ANEXO 1

### Metodologia Detalhada

#### **Preparo e caracterização química do material experimental**

Foram coletadas ostras marinhas (*Crassostrea Rhizophora*), com o mesmo tempo de vida, oriundas de um mesmo viveiro biologicamente assistido, provenientes do município Raposa, Maranhão, Brasil (Figura 1). As conchas das ostras foram removidas e limpas em água corrente com auxílio de escovão de aço e secas em exposição solar (Figura 2 e 3). A superfície externa da concha foi removida com auxílio de disco de carborundum acoplados em micromotor e peça reta (Driller-BLM 350, Carapicuíba, São Paulo, Brasil), sob irrigação copiosa com água destilada (Isofarma, Eusébio, Ceará, Brasil) (Figura 4). O produto final resultou na camada interna da concha, livre de resíduos e/ou contaminantes (Figura 5).

Este produto foi triturado com auxílio de um pilão manual em porcelana e passado em peneira de aço inox de abertura aproximada de 1,5 mm, para padronização do tamanho das partículas (Figuras 6,7 e 8). O material peneirado foi enviado para esterilização por meio da técnica de irradiação Gama, armazenado em frasco estéril apropriado, o qual foi denominado de Substituto Ósseo Experimental (SOE) (Figura 9).



**Figura 1.** Ostras marinhas (*Crassostrea Rhizophora*) coletadas do viveiro biologicamente assistido proveniente do município Raposa, Maranhão, Brasil.



**Figura 2.** Limpeza primária das ostras com utilização de escovão de aço e água corrente.



**Figura 3.** Secagem das ostras em exposição solar



**Figura 4.** Remoção da superfície externa da concha da ostra com auxílio de disco de carborundum acoplados em micromotor e peça reta, sob irrigação com água destilada



**Figura 5.** Camada interna da concha, após remoção da camada externa, livre de resíduos e/ou contaminantes



**Figura 6.** Trituração da camada interna da concha com auxílio de um pilão em porcelana



**Figura 7 e 8.** Passagem em peneira de aço inox após trituração das conchas, para padronização do tamanho das partículas



**Figura 9.** Armazenamento do produto experimental final após esterilização por raios Gama

### **Caracterizações químicas do SOE**

#### **Digestão ácida**

Seguindo os protocolos do laboratório de química do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão (IFMA). Primeiramente houve a descontaminação dos tubos Kjeldahl utilizados na digestão das amostras, estes foram colocados em banho de detergente neutro (Extran 2% (v/v)) e em seguida em banho de ácido nítrico P.A. a 30% por aproximadamente 72 horas. Colocou-se em bloco digestor por 3 horas a 70°C com ácido nítrico P. A. a 65% (v/v). Por fim, os frascos foram enxaguados com água ultrapura e secos à temperatura ambiente.

Para o processo de digestão, utilizou-se a massa de aproximadamente 160-180 mg de SOE, em triplicata. Acrescentou-se 3 mL de ácido sulfúrico a 98% e aguardou-se 2 horas. Posteriormente,

acrescentou-se 4 mL de ácido nítrico P.A. a 65% e aguardou-se 12 horas. Em seguida, acrescentou-se 4 mL de peróxido de hidrogênio a 30%, aguardou-se 18 horas e, posteriormente, aqueceu-se na temperatura de 90°C a amostra em mesa de bloco digestor digital microprocessado com sistema PID (Tecnal - TE-040/25, Piracicaba, São Paulo, Brasil) por 4 horas (Figura 10) . Após este período, deixou-se a amostra em repouso a 25°C por 1 hora. Acrescentou-se água milli-Q completando-se para os 15 mL o volume da solução da amostra finalizando a digestão. Depois de finalizada a digestão, armazenou-se a amostra em recipiente para a análise dos metais, os quais foram analisados por Espectrometria de Emissão Óptica em Plasma individualmente acoplado (ICP-OES). O *blank* dos reagentes consistiu dos tubos com os reagentes utilizados para a digestão, os quais passaram pelo mesmo procedimento de digestão a que foram submetidas às amostras de SOE.



**Figura 10.** Mesa de bloco digestor digital microprocessado com sistema PID utilizado para aquecimento da amostra experimental na temperatura de 90°C por 4 horas

### **Espectrometria de Emissão Óptica em Plasma Indutivamente Acoplado**

Para a determinação do teor dos minerais, foi utilizado um ICP-OES (Varian-720 ES, Palo Alto, USA) (Figura 11), nas seguintes condições de operação: Potência do plasma 1,0 kW; gás refrigerante (Ar) 15 L/min; Gás Auxiliar (1,5 L/min); Pressão do nebulizador (200 kPa).

Utilizou-se o elemento manganês para determinação multielementar estabelecidas para o alinhamento do espectrômetro de emissão, segundo indicação do fabricante. Foram preparadas soluções estoque a partir de soluções padrão dos metais (Titrisol, Merck), água ultra-pura (Milli-Q) e ácido nítrico grau analítico, em concentrações de 1000 µg mL<sup>-1</sup>. Foram preparadas soluções dos metais de trabalho multielementares em diferentes concentrações em solução de ácido clorídrico a 20% (v/v), por diluição das soluções estoque. Foi preparado o *blank* com solução de ácido clorídrico a 20% (v/v) em água ultra-pura.

Realizou-se a correção de radiação para os elementos determinados pelo do software do ICP-OES. As curvas analíticas para os elementos foram: cobre, ferro, manganês e zinco e de 0,025 a 3mg

L<sup>-1</sup>; potássio de 25 a 500mg L<sup>-1</sup>; cálcio, fósforo, magnésio e sódio de 1 a 50mg L<sup>-1</sup> mostrando-se lineares em toda a faixa.



**Figura 11.** Aparelho utilizado para determinar o teor dos minerais da amostra experimental

### **Caracterização de superfície do SOE e do Bio-Oss®**

Aproximadamente 1 grama das partículas do SOE e do Bio-Oss® foram colocadas em suporte metalizado e observadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV, JSM6360-Lv, Jeol, Tóquio, Japão), para a caracterização das superfícies das suas partículas, experimento realizado na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

### **Aplicação em modelo animal**

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade CEUMA, sob o número de protocolo 202/2015 (Anexo 2).

Foram selecionados 36 ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Holtzman*) de forma aleatória simples, machos, saudáveis, adultos jovens com aproximadamente 4 meses de vida e peso corporal aproximado de 180 gramas (Figura 12). Os animais foram cedidos pelo Biotério da Universidade CEUMA, onde foram mantidos durante todo período experimental.

Todo instrumental cirúrgico utilizado nesta pesquisa foi autoclavado a 121°C por 20 minutos (Figura 13). As cirurgias foram realizadas em sala apropriada por um único operador, sob uma bancada de aço inoxidável previamente descontaminada com álcool 70% (Figura14).

Previamente à realização dos procedimentos cirúrgicos foi realizado um protocolo de destresse, no qual os animais foram mantidos individualmente em gaiolas durante 24 horas. Após, os animais foram anestesiados via intramuscular com Ketamina (Dopalen, Paulínia, São Paulo, Brasil) na dose de 60 mg/kg de peso corporal, associado com Xilazina (Kensol, Avellaneda, Argentina) na dose de 8 mg/kg de peso corporal (Figura 15).

Foi realizada a tricotomia da região submandibular esquerda de cada animal e, em seguida, a antissepsia local com iodo (Riodeine, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil). Cada animal foi posicionado em decúbito lateral esquerdo no qual recebeu um campo fenestrado cirúrgico estéril na região de cabeça-pescoço (Figura 16).

Uma incisão de 2 cm foi realizada em região submandibular esquerda de maneira linear com auxílio de uma lâmina de bisturi 15C

descartável (Lamedid Solidor, São Paulo, São Paulo, Brasil). A incisão foi realizada em planos teciduais, seguido de rebatimento da pele, músculo e periósteo para exposição do osso mandibular (Figura 17).

Um defeito ósseo circunferencial de aproximadamente 3 mm de diâmetro e 2mm de profundidade foi realizado com auxílio de uma broca diamantada esférica acoplada em micromotor cirúrgico em baixa rotação (Driller-BLM 350, Carapicuíba, São Paulo, Brasil), sob irrigação copiosa com água destilada estéril (Isofarma, Eusébio, Ceará, Brasil) (Figura 18). Os animais com os defeitos confeccionados foram divididos em 3 grupos, conforme a (Tabela 1).

**Tabela 01. Divisão dos animais em grupos e subgrupos**

<b>Grupo</b>	<b>1 Semana</b>	<b>3 Semanas</b>	<b>6 Semanas</b>	<b>8 Semanas</b>
<b>Controle -</b>	C1	C3	C6	C8
<b>Controle +</b>	P1	P3	P6	P8
<b>Experimental</b>	E1	E3	E6	E8

*n total de cada grupo= 12, n de cada subgrupo =3*

Os animais do **grupo controle negativo** receberam o defeito ósseo, no entanto, nenhum substituto ósseo foi inserido neste defeito, a fim de avaliar o crescimento ósseo fisiológico (Figura 19).

Os animais do **grupo controle positivo** receberam o defeito ósseo e, logo após foi inserido o substituto ósseo de origem bovina Bio-Oss® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland). A quantidade de material introduzido no leito cirúrgico foi de

aproximadamente 7,0 mg. Sob o Bio-Oss® foi posicionada uma membrana biológica de origem bovina (GenDerm, Baumer, Mogi Mirim, São Paulo, Brasil) para propiciar a condução isolada do substituto ósseo (Figura 20).

Os animais do **grupo experimental** receberam o defeito ósseo e, logo após foi inserido aproximadamente 7,0 mg do SOE também recoberto sobre uma membrana biológica de origem bovina (Figura 21).

Ao término dos procedimentos cirúrgicos, o periósteo e os planos musculares foram reposicionados e suturados com fio Catgut 4.0 mm (Bioline, Anápolis, Goiás, Brasil), e pele com fio nylon 5.0 mm (Technofio, Goiânia, Goiás, Brasil) (Figura 22 e 23).

Os animais foram mantidos isolados em gaiolas individuais no pós-operatório, em boas condições de alimentação, com ração para animais de laboratório (*ad libitum*) e água filtrada em bebedouro, temperatura controlada entre 27° a 30° C, iluminação e higiene adequadas. Todos os animais receberam terapia antibiótica com Cefalotina por via subcutânea (25 mg/kg, ABL, Cosmópolis, São Paulo, Brasil) por 5 dias, e única dose de morfina por via subcutânea (1 mL, Bayer, Alemanha) logo após o término do procedimento (Figura 24).

Para todos os grupos experimentais, as eutanásias ocorreram de forma humanizada com uso de câmara de CO<sub>2</sub> (Insight – EB 248, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) nos períodos de 1, 3, 6 e 8 semanas

pós-cirurgia (Figura 25). As mandíbulas foram removidas com técnica cirúrgica apropriada e o bloco da região do defeito ósseo foi extraído. As peças foram fixadas em formol tamponado a 10% em um recipiente de vidro durante 96 horas (Figura 26).



**Figura 12.** Ratos da raça Wistar machos utilizados no experimento



**Figura 13.** Material cirúrgico esterilizado utilizado no experimento



**Figura 14.** Sala cirúrgica com bancada em aço inoxidável descontaminada, onde foram realizados os procedimentos cirúrgicos



**Figura 15.** Anestesia dos ratos pela via intramuscular



**Figura 16.** Tricotomia em região submandibular esquerda seguido de antissepsia com iodo e posicionamento de campo cirúrgico estéril



**Figura 17.** Incisão de 2 cm em região submandibular esquerda por planos teciduais para exposição óssea



**Figura 18.** Defeito ósseo sendo realizado em mandíbula esquerda



**Figura 19.** Grupo C (controle), defeito ósseo confeccionado sem utilização de nenhum tipo de biomaterial para enxertia óssea



**Figura 20.** Grupo P (padrão), defeito ósseo confeccionado e enxertado com substituto ósseo de origem bovina, seguido do posicionamento de uma membrana biológica de origem bovina



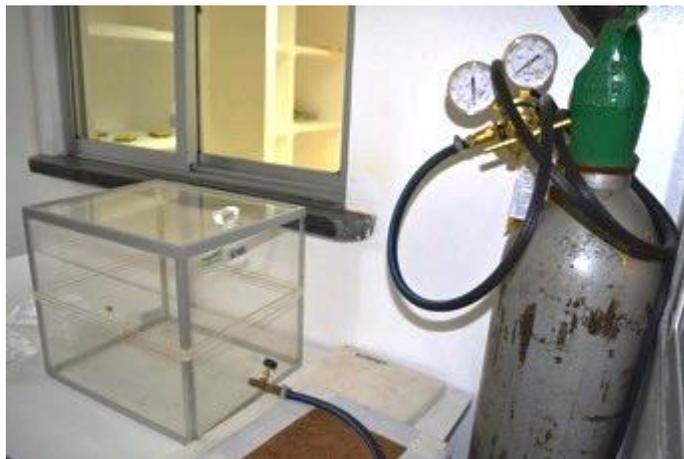
**Figura 21.** Grupo E (experimental), defeito ósseo confeccionado e enxertado com substituto ósseo experimental, seguido do posicionamento de uma membrana biológica de origem bovina



**Figura 22 e 23.** Sutura dos planos teciduais com fio catgut 4.0mm e nylon 5.0mm



**Figura 24.** Manutenção dos ratos após os experimentos



**Figura 25.** Eutanásia dos ratos com câmara de CO<sub>2</sub>



**Figura 26.** Mandíbula removida do rato para realização de estudo histológico

### **Processamento das peças**

Seguindo o protocolo do Hospital Universitário Federal do Maranhão (HU-UFMA). As peças foram descalcificadas em solução de EDTA durante 30 dias com troca de solução a cada 3 dias, sendo mantidas em cassetes plásticos a fim de impedir o contato do material com a superfície do frasco, facilitando a descalcificação.

Após a descalcificação o material foi lavado em água corrente por 10 minutos e, em seguida processado no aparelho histotécnico (Thermo scientific - STP 120, San José, Califórnia, EUA) onde foi submetido a sequencias de desidratação numa sequencia de álcoois crescentes (70%, 80%, 90% e absoluto) (Figura 27). A seguir, diafanização em xilol e finalmente embebidos e incluídos em módulo de inclusão de parafina aquecida (Leica - EG 1150 H, Guadalajara, Jalisco, México) e resfriado em prancha fria ( Microm - AP 280-1, Alemanha) ( Figuras 28 e 29).

O material processado foi cortado em micrótomo (Microm - HM 315, Alemanha) com cortes semi-seriados com 4 µm de espessura, utilizando lâminas descartáveis. O plano de secção dos cortes foi transversal em relação ao defeito ósseo confeccionado na mandíbula. As lâminas foram desparafinizadas e re-hidratadas para posterior coloração (Figura 30).

Os cortes foram corados pela Hematoxilina e Eosina (H&E) para análise morfológica; e em Tricrômico de Masson (TM) a fim de evidenciar a neoformação óssea frente às condições experimentais( Figuras 31 e 32) .



**Figura 27.** Aparelho histotécnico utilizado para desidratação das peças numa sequência de álcoois ( 70%,80%, 90% e absoluto)



**Figuras 28 e 29.** Aparelho para inclusão das peças em parafina aquecida seguido de resfriamento em prancha fria



**Figuras 30.** Aparelho micrótomo utilizado para os cortes histológicos de 4  $\mu\text{m}$  de espessura



**Figuras 31 e 32.** Sequência de coloração das peças por Hematoxila e Eosina (H&E) e Kit de coloração com Tricrômico de Masson (TM)

### **Análise Histológica**

A análise histológica foi realizada com auxílio de um microscópio óptico (Zeiss- Axio Imager 2, Oberkochen, Alemanha) ( Figura 33), utilizando como critério a formação e qualidade do tecido ósseo neoformado (Quadro 1). Para tal, cada lâmina foi analisada nos aumentos de 5 a 40X, em 10 campos distintos, percorridos de forma aleatória, sendo realizadas fotomicrografias para documentar os diferentes escores avaliados. As análises histológicas foram conduzidas de forma “cega” por um especialista em histologia.



**Figuras 33.** Microscópio óptico Zeiss- Axio Imager 2

**Quadro 1.** Formação e qualidade do tecido ósseo neoformado.

<b>Score</b>	<b>Caracteres avaliados</b>
1	Neoformação tecidual (preenchimento do defeito com tecido conjuntivo contendo capilares sanguíneos, fibroblastos, macrófagos e neoformação fibras colágenas).
2	Tecido conjuntivo denso sugerindo a diferenciação para tecido ósseo com presença de muitas células, fibroblastos e osteoblastos, e fibras em processo de organização.

3	Neoformação óssea, no qual o tecido conjuntivo encontra-se em processo de diferenciação formando matriz óssea, ou ósteon; apresentando, portanto, osteoblastos, osteoclastos e osteócitos.
4	Presença de tecido ósseo lamelar imaturo.

*FONTE: Adaptado de Dahlin et al., 1988; Hedner & Linde, 1995; Pretel, 2005.*

**ANEXO 2**  
**Aprovação do Comitê de Ética no uso de animais (CEUA)**



**CEUMA – UNIVERSIDADE**  
**Reitoria**  
**Pró-Reitorias de Graduação e Pós-Graduação**  
**Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA UNICEUMA**  
**DECISÃO DA CEUA – UNICEUMA SOBRE PROTOCOLO SUBMETIDO**

**DATA DO RECEBIMENTO: 25/05/2015**

**Nº DO PROTOCOLO: 202/15**

**Nº DO PARECER: 08/15**

**DATA DO PARECER: 03/07/2015**

**TÍTULO DO PROJETO/AULA: Avaliação de um biomaterial confeccionado a partir de conchas marinhas do litoral do Estado do Maranhão em defeitos ósseos provocados em ratos**

**CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA:**

**PESQUISADOR/PROFESSOR RESPONSÁVEL: Leticia Machado Gonçalves**

**COLABORADORES: Ricardo de Sousa Coringa (Universidade Ceuma), Eduardo Martins de Sousa (Universidade Ceuma).**

**DECISÃO: ( X ) APROVADO ( ) PENDENTE ( ) EXCLUÍDO ( ) NÃO APROVADO**

A CEUA-UNICEUMA, em sua função de examinar previamente os procedimentos de ensino e pesquisa a serem realizados na Instituição, para determinar sua compatibilidade com a legislação aplicável (Lei. 11794 e Resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA). Reuniu-se no dia 03/07/2015, para apreciar a análise do relator da proposta de protocolo nº 202/15, tendo chegado por votação da maioria dos membros presentes, as seguintes considerações:

**Considerações:**

O projeto tem por objetivo avaliar o potencial de neoformação óssea em ratos que receberão o substituto ósseo confeccionado a partir de conchas marinhas que serão coletadas de um viveiro biologicamente assistido do litoral do Maranhão.

A amostra do estudo será composta por 52 ratos da espécie *rattus norvegicus*, linhagem Wistar pesando entre 250-300g e serão divididos em 4 grupos; grupo C (controle) composto por 16 ratos com defeito ósseo em mandíbula que não receberão nenhum tipo de enxertia óssea e o Grupo P (padrão) que será composto por 16 ratos com defeito ósseo em mandíbula com enxertia do substituto ósseo confeccionado. Os grupos C e P serão subdivididos em 4 subgrupos de 4 animais, pois serão analisados em quatro diferentes tempos de 1,3, 6 e 8 semanas. Será adicionado o grupo S (Sham) compostos por 4 ratos que não serão submetidos a nenhuma intervenção cirúrgica, avaliando-se apenas o padrão histológico do osso em homeostase.

Todos os animais serão alojados no Biotério da Universidade Ceuma que atende as necessidades dos animais satisfatoriamente. O alojamento será de 3 animais por gaiola com cama de papel toalha picotado. A sala do biotério apresenta exaustão de ar. Não serão utilizados animais infectados.

Animais serão alimentados com ração industrial balanceada própria para ratos e hidratados com água filtrada sem haver nenhuma retenção hídrica ou alimentar.

Haverá imobilização do animal através da contenção manual e haverá cirurgia única por ostectomia seguido de enxerto de biomaterial em região bilateral de mandíbula. Os animais serão observados no pós-

operatório por 72 horas para avaliação da recuperação com a finalidade de verificar desvio do padrão normal de comportamento, serão observados: mudança no padrão de sono, hidratação, higiene, comportamento exploratório, comportamento agressivo, depressão entre outros. Haverá uso de analgesia pela administração subcutânea de 0,05 a 0,1 mg/Kg de buprenorfina por 4/4h por 3 dias.

Haverá outros cuidados cirúrgicos através do exame clínico da ferida e remoção dos pontos após 7 dias. Haverá extração de materiais biológicos: tecido ósseo de mandíbula (2 blocos de 4mmx4mm) e o método de indução de morte será por câmara de gás.

A dosagens dos fármacos utilizados, o procedimento cirúrgico e destino dos animais após experimentos e descarte da carcaça estão de acordo com os procedimentos e regulamentos do CONCEA.

**Conclusão: Aprovado**

Com base nos dados fornecidos pelo proponente, a Comissão, considerou o projeto aprovado.

\* Cópia do protocolo segue anexa.

São Luís 03/07/2015



Lidio Gonçalves Lima Neto  
Coordenador CEUA-UNICEUMA

Prof. Dr. Lidio Gonçalves Lima Neto  
Coord. Comissão de Ética no Uso  
de Animais - CEUA  
Universidade Ceuma



## TABLE OF CONTENTS

---

●	<b>Description</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Audience</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Impact Factor</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Abstracting and Indexing</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Editorial Board</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Guide for Authors</b>	<b>p.4</b>



ISSN: 0142-9612

## DESCRIPTION

---

*Biomaterials* is an international journal covering the science and clinical application of **biomaterials**. A biomaterial is now defined as a substance that has been engineered to take a form which, alone or as part of a complex system, is used to direct, by control of interactions with components of living systems, the course of any therapeutic or diagnostic procedure. It is the aim of the journal to provide a peer-reviewed forum for the publication of original papers and authoritative review and opinion papers dealing with the most important issues facing the use of biomaterials in clinical practice. The scope of the journal covers the wide range of physical, biological and chemical sciences that underpin the design of biomaterials and the clinical disciplines in which they are used. These sciences include **polymer synthesis** and characterization, **drug** and **gene vector** design, the **biology** of the host response, **immunology** and **toxicology** and self assembly at the nanoscale. Clinical applications include the therapies of **medical technology** and **regenerative medicine** in all clinical disciplines, and diagnostic systems that rely on innovative contrast and sensing agents. The journal is relevant to areas such as cancer diagnosis and therapy, implantable devices, drug delivery systems, gene vectors, bionanotechnology and tissue engineering.

### Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://support.elsevier.com>

## AUDIENCE

---

Biomaterials scientists, materials scientists, clinicians (vascular surgeons, orthopaedic surgeons, dentists), biomedical engineers, biochemists, pharmaceutical scientists, tissue engineers and medical device technologists.

## IMPACT FACTOR

---

2014: 8.557 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

## ABSTRACTING AND INDEXING

---

ADONIS  
BECI  
BIOSIS  
Biomaterials Now and Current Titles in Dentistry  
Elsevier BIOBASE  
CTI  
Chemical Abstracts  
Current Contents  
MEDLINE®  
EMBASE  
FIZ Karlsruhe  
INSPEC  
Polymer Contents  
Scopus

## EDITORIAL BOARD

---

### *Editor-in-Chief*

**K.W. Leong**, Columbia University, New York, NY, USA

### *Managing Editor*

**S. Mazzitelli**, Elsevier B.V., Amsterdam, The Netherlands

### *Associate Editors*

**C.R. Arciola**, Istituti Ortopedici Rizzoli, Italy  
**Y. Byun**, Seoul National University, Republic of Korea  
**C.-S. Cho**, Seoul National University, Republic of Korea  
**A.J. Garcia**, Georgia Institute of Technology, USA  
**S. Gong**, University of Wisconsin-Madison, USA  
**S.B. Goodman**, Stanford University, USA  
**D.W. Grainger**, University of Utah, USA  
**J. Hunt**, University of Liverpool, UK  
**D.W. Hutmacher**, Queensland University of Technology, Queensland, Australia  
**X.-J. Liang**, National Center for Nanoscience and Technology, Beijing, China  
**Z. Liu**, Soochow University, China  
**H.-Q. Mao**, Johns Hopkins University, USA  
**Y. Nagasaki**, University of Tsukuba, Japan  
**A. Pandit**, National University of Ireland, Ireland  
**L.A. Poole-Warren**, The University of New South Wales, Australia  
**U. Ripamonti**, University of the Witwatersrand, South Africa  
**H.-W. Sung**, National Tsing Hua University, Taiwan  
**C. Werner**, Leibniz Institute of Polymer Research Dresden, Germany  
**H. Yu**, National University of Singapore, Singapore, Singapore

### *Honorary Editor*

**D.F. Williams**, Wake Forest Institute of Regenerative Medicine, North Carolina, USA

### *International Editorial Board*

**H. Ai**, Sichuan University, China  
**L. Ambrosio**, University of Naples Federico II, Italy  
**J.M. Anderson**, Case Western University, USA  
**S.F. Badylak**, University of Pittsburgh, USA  
**T. Barker**, Georgia Tech, USA  
**S.L. Bellis**, University of Alabama at Birmingham, USA  
**D. Campoccia**, Istituti Ortopedici Rizzoli, Italy  
**Y. Cao**, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, China  
**G.-Q. Chen**, Tsinghua University, China  
**T.V. Chirila**, Queensland Eye Institute, Australia  
**P.K. Chu**, City University of Hong Kong, Hong Kong  
**S. Cool**, A STAR Institute of Medical Biology, Singapore  
**J. Dai**, Chinese Academy of Sciences, China  
**W.H. de Jong**, National Institute of Public Health and Environment, The Netherlands

**W.-P. Deng**, Taipei Medical University, Taiwan  
**P. Dubruel**, Ghent University, Belgium  
**P. Ducheyne**, University of Pennsylvania, USA  
**M.D.M. Evans**, CSIRO Materials Science and Engineering, Australia  
**S.-S. Feng**, National University of Singapore, Singapore  
**D.W. Grijpma**, University of Twente, The Netherlands  
**X. Gu**, Nantong University, China  
**V. Hasirci**, Middle East Technical University, Turkey  
**W.E. Hennink**, Utrecht University, The Netherlands  
**K. Ishihara**, The University of Tokyo, Japan  
**H. Iwata**, Kyoto University, Japan  
**D.L. Kaplan**, Tufts University, USA  
**K. Kataoka**, University of Tokyo, Japan  
**C.J. Kirkpatrick**, Johannes Gutenberg University, Germany  
**J. Kopecek**, University of Utah, USA  
**S.C. Kundu**, Indian Institute of Technology Kharagpur, India  
**D. Lacroix**, INSIGNEO Institute for in silico Medicine, Sheffield, UK  
**C.T. Laurencin**, University of Connecticut, USA  
**R.J. Levy**, The Children's Hospital of Philadelphia, USA  
**Y. Li**, Zhongnan Hospital of Wuhan University, China  
**F.-H. Lin**, National Taiwan University, Taiwan  
**W. Liu**, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, China  
**I. Martin**, University Hospital Basel, Switzerland  
**T. Okano**, Tokyo Women's Medical University, Japan  
**R.O.C. Oreffo**, University of Southampton, UK  
**B. Ratner**, University of Washington, USA  
**W.M. Saltzman**, Yale University, USA  
**D. Seliktar**, Israel Institute of Technology Technion City, Israel  
**C.G. Simon, Jr.**, National Institute of Standards and Technology, USA  
**M. Sittinger**, Charité University Hospital Berlin, Germany  
**M.A. Swartz**, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Switzerland  
**V. Trajkovic**, University of Belgrade, Serbia  
**R.S. Tuan**, University of Pittsburgh School of Medicine, USA  
**H. Uludag**, University of Alberta, Canada  
**R.B. Vernon**, Benaroya Research Institute, USA  
**E.A. Vogler**, Pennsylvania State University, USA  
**W. Walsh**, University of New South Wales, Australia  
**S.G. Wang**, Chinese Academy of Sciences, China  
**A. Weiss**, The University of Sydney, Australia  
**M. Yamato**, Tokyo Women's Medical University, Japan  
**N.P. Ziats**, Case Western University, USA  
**P. Zilla**, University of Cape Town, South Africa

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### *Your Paper Your Way*

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

**To find out more, please visit the Preparation section below.**

## INTRODUCTION

### *Types of article*

**Original Research:** Provide a full length account of original research.

**Review:** Provide an in-depth and up to date critical review of a related topic.

**Leading Opinion Paper:** This article type may **only** be submitted by invitation from the Editor-in-Chief.

### *Data in Brief*

Authors have the option of converting any or all parts of their supplementary data or additional raw into one or multiple Data in Brief articles, a new kind of article that houses and describes their data. Data in Brief articles ensure that your data, which is normally buried in supplementary material, is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. Authors are encouraged to submit their Data in Brief article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your Data in Brief article will automatically be transferred over to Data in Brief where it will be editorially reviewed and published in the new, open access journal, [Data in Brief](#). The [Open Access fee for Data in Brief](#) is \$500. Authors who submit in 2015 will receive a reduced fee of \$250. Please use the following [template](#) to write your Data in Brief.

### *Contact details for submission*

The peer review submission system for Biomaterials is located here: <http://ees.elsevier.com/biomat/> The Elsevier Editorial System (EES) is a web-based submission and review system. Authors may submit manuscripts and track their progress through the system to publication. Reviewers can download manuscripts and submit their opinions to the editor. Editors can manage the whole submission/review/revise/publish process.

Referees, whose names are not normally disclosed to the authors, will study all contributions which the Editor-in-Chief deems to be of sufficient significance and interest to be sent for peer review. The criteria by which this initial assessment is made include relevance to the scope of the journal, the originality of the work and its significance to the broad development of the field of biomaterials.

## BEFORE YOU BEGIN

### *Ethics in publishing*

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

### *Submission declaration and verification*

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

### *Mandatory Author Declaration*

When uploading the manuscript, it is required that the corresponding author of each manuscript confirms on behalf of all authors that their submission complies in full with the [Author Declaration](#). Please note that the form itself doesn't have to be uploaded as part of the manuscript files.

This Declaration covers a number of logistic and ethical issues. The editorial process will not begin until and unless the corresponding author has answered the appropriate question during submission.

N.B.: The Author Declaration is independent of, and in addition to, the "Journal Publishing Agreement" agreement which is issued on acceptance.

### **Changes to authorship**

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### **Article transfer service**

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information about this can be found here: <http://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

### **Author rights**

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <http://www.elsevier.com/copyright>.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

### **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

#### **Open access**

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

#### **Subscription**

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<http://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

#### *Creative Commons Attribution (CC BY)*

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

#### *Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)*

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

### **Green open access**

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and begins from the publication date of the issue your article appears in.

This journal has an embargo period of 24 months.

### **Language (usage and editing services)**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

## **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

## **PREPARATION**

### **NEW SUBMISSIONS**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

### **References**

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

### **Formatting requirements**

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

#### *Figures and tables embedded in text*

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

### **REVISED SUBMISSIONS**

#### *Use of word processing software*

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

#### *Article structure*

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, Appendix (where necessary), Figures, Figure Captions and Tables, Supplementary Data. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote including fax number and e-mail address. An abbreviated title for use as a running headline should also be supplied. Authors are requested to acknowledge funding sources for the work.

### **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but

if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

All manuscripts are to be supplied with an abstract of about 100-200 words in length.

### **Keywords**

Authors must provide 4-6 keywords for indexing purposes.

### **Units**

The SI system should be used for all scientific and laboratory data; if, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' (10<sup>9</sup> in America, 10<sup>12</sup> in Europe) is ambiguous and must not be used. If a large number of symbols are used it is helpful if authors submit a list of these symbols and their meanings.

### **Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list. Footnotes on the first page thanking or acknowledging people or places should be moved to the Acknowledgements section.

### *Electronic artwork*

#### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

## Figures

Authors should aim to include not more than 8 figures in their manuscript.

## Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

## References

### Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

### Web References

References to online sources should contain at a minimum the full URL and year the source was accessed. Furthermore, if known, the following information should be given: author names, dates, reference to a source publication. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Examples of formatting of online sources follow:

1. UK House of Commons Science and Technology Committee. Scientific Publications: Free for All? Tenth Report of Session 2003-4 Volume 1. London: The Stationary Office Ltd. Online. 2004 July. Available from URL: <http://www.publications.parliament.uk/pa/cm200304/cmselect/cmsctech/399/39902.html>
2. Wellcome Trust. Economic Analysis of Scientific Research Publishing. Histon, UK: Wellcome Trust. Online. 2003. Available from URL: [http://www.wellcome.ac.uk/doc\\_wtd003181.html](http://www.wellcome.ac.uk/doc_wtd003181.html)
3. Keeney M, Lai JH, Yang F. Recent progress in cartilage tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol*. 2011. Available from URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21531126> (DOI: 10.1016/j.copbio.2011.04.003).

### Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

1. Driessens FCM, Boltong MG, Bermudez O, Planell JA. Formulation and setting times of some calcium orthophosphate cements: a pilot study. *J Mater Sci: Mater Med* 1993;4:503-508.
2. Nancollas H. In vitro studies of calcium phosphate crystallisation. In: Mann S, Webb J, Williams RJP, editors. *Biomaterialization. Chemical and biochemical perspectives*. New York: VCH, 1989. p. 157-182.
3. Brown W, Chow LC. Combinations of sparingly soluble calcium phosphates in slurries and paste as mineralizers and cements. US Patent No. 4612053, 1986.

N.B.: 'Et al' must be used after the first 6 authors have been named. *Biomaterials* does not use the publication month or day.

## Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version

of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **AudioSlides**

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

### **Supplementary material**

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### **Open data**

This journal supports Open data, enabling authors to submit any raw (unprocessed) research data with their article for open access publication under the CC BY license. For more information please visit <http://www.elsevier.com/about/research-data/open-data>.

### **Interactive plots**

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. For instructions please go to <http://www.elsevier.com/interactiveplots>.

### **Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.
- For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

### **AFTER ACCEPTANCE**

### **Use of the Digital Object Identifier**

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

### **Online proof correction**

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### **Amendments to manuscripts**

In order to maintain the integrity of the scientific record, the version that is published in an issue on ScienceDirect and in print MUST be identical. One set of page proofs will be sent to the corresponding author. Please note that authors are urged to check their proofs carefully before return, but corrections are restricted to typesetting errors only. Proofs are NOT to be considered as drafts. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely the responsibility of the corresponding author.

### **Offprints**

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. For an extra charge, more paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

### **AUTHOR INQUIRIES**

You can track your submitted article at <http://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>