

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

RODRIGO CAMPOS RODRIGUES TRINDADE

**AVALIAÇÃO DA HIDRÓXIAPATITA SINTÉTICA COMO SUBSTITUTO ÓSSEO EM
ASSOCIAÇÃO COM MEMBRANA BIOLÓGICA EM DEFEITOS CRÍTICOS EM
FÍBULA DE RATOS WISTAR.**

**ALFENAS/MG
2020**

RODRIGO CAMPOS RODRIGUES TRINDADE

**AVALIAÇÃO DA HIDRÓXIAPATITA SINTÉTICA COMO SUBSTITUTO ÓSSEO
EM ASSOCIAÇÃO COM MEMBRANA BIOLÓGICA EM DEFEITOS CRÍTICOS
EM FÍBULA DE RATOS WISTAR.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG. Área de concentração: Odontologia. Linha de Pesquisa: Bioengenharia de materiais odontológicos e reparo tecidual.
Orientador: Tomaz Henrique Araújo

**ALFENAS/MG
2020**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

T833a Trindade, Rodrigo Campos Rodrigues.
Avaliação da hidroxiapatita sintética como substituto ósseo em associação com membrana biológica em defeitos críticos em fíbula de ratos Wistar. / Rodrigo Campos Rodrigues Trindade - Alfenas/MG, 2020.
72 f.: il. --

Orientador: Tomaz Henrique Araújo
Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) – Universidade Federal de Alfenas, 2019.
Bibliografia.

1. Transplante Ósseo. 2. Durapatita. 3. Regeneração Óssea. 4. Engenharia Tecidual. I. Araújo, Tomaz Henrique. II. Título.

CDD-610.28



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL - MG
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Alfenas/MG CEP 37130-001



Rodrigo Campos Rodrigues Trindade

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA HIDRÓXIAPATITA SINTÉTICA COMO SUBSTITUA
ÓSSEA E COM ASSOCIAÇÃO DE MEMBRANA BIOLÓGICA EM DEFEITOS CRÍTICOS E
FÍBULAS DE RATOS

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Mestre em
Ciências Odontológicas pela Universidade
Federal de Alfenas. Área de concentração:
Odontologia.

Aprovado em: 05/12/2019

Prof. Dr. Tomaz Henrique Araújo
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura:

Profa. Dra. Deila Rosely Carneiro
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura:

Prof. Dr. Fábio Teixeira Cardoso de Carvalho
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura:



SHOT ON MI 9
TOMTERRA

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus por guiar meus passos e iluminar meu caminho. A minha mãe pelo amor incondicional e por me fazer chegar até essa vitória, mesmo sem poder estar ao meu lado para comemorar. Ao meu pai e a minha irmã por todo carinho e amor dedicado. Aos amigos e professores, pela paciência e pelos ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, gratidão eterna por seu imenso amor e misericórdia infinita. Agradeço pela oportunidade da vida e da família que me foi concedida. Os seus planos foram perfeitos e muito maiores do que eu poderia sonhar. Fui abençoada com uma família que me moldou com amor e amor incondicional. Através dos seus projetos, meus pés trilharam todo um caminho até aqui. Hoje sei que nada foi ao acaso e que pertenço ao lugar em que cheguei. Obrigado por cuidar e conduzir cada detalhe na minha vida.

A minha mãe, obrigado pelo seu lindo esforço em me fazer um homem bem-sucedido na vida. O seu amor incondicional, as suas lições, todas as correções, o seu sorriso, o seu abraço e o seu olhar, são a minha inspiração para ser alguém melhor todos os dias ao acordar. Obrigado por me ensinar no caminho em que devo andar. Além de todo agradecimento aqui está toda a minha dedicação, amor, carinho e respeito. Esta nova etapa vencida é uma dedicação, um presente para você, mãe. Sinto muita a sua falta e queria muito que você estivesse aqui presente para me ver vencer, mais uma vez. Obrigado pela sua vida ter se conectado com a minha. Te amo, mãe. Saudades eternas.

Ao meu pai e irmã, sem vocês, eu nada seria. Pai, obrigado pela sua luta árdua em me fazer ser alguém. Por nunca desistir de mim, principalmente nos momentos mais difíceis da vida. Obrigado por me ensinar valores. Te agradeço por lutar por mim e por me amar incondicionalmente. Eu nunca vou ter palavras para dizer tudo o que significa para mim e nem o quanto eu te amo. Eu só posso agradecer a Deus e ao senhor, pai, por ter me dado vida. Se um dia eu for três por cento do que o você é, eu serei um grande homem e a vida terá valido a pena. Obrigado.

Minha querida irmã, obrigado por ser minha protetora, por ser a minha razão quando eu era tão perdido. Agradeço a Deus pela família que pertencemos. Eu te amo e sou grato por todos os anos em que vivemos juntos e por todo aprendizado que você me proporcionou. Eu não trocaria por nada e nem por ninguém a irmã que você é e foi para mim. Te amo.

“Não precisa ter conta sanguínea, é preciso ter sempre um pouco mais de sintonia”

A Universidade Federal de Alfenas, aqui aprendi a ensinar e aprender. Conheci pessoas que se tornaram amigos, além de amigos de profissão. Agradeço pela oportunidade de moldar, mais uma vez, as minhas experiências, conhecimento e comportamento. Muito obrigado pelo tempo em que conquistei conhecimento, UNIFAL-MG.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Tomaz Henrique Araújo, obrigado por todos os “puxões de orelha”, por me ensinar, pela paciência e pela dedicação ao fazer este trabalho acontecer. Com certeza, para mim, não poderia ter sido melhor. Sinto-me privilegiado em ser orientado por um profissional de tamanha competência e conhecimento. Obrigado por enriquecer as minhas experiências, o meu conhecimento e a minha sabedoria. Sinto-me honrado e agradecido em tê-lo como meu orientador.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Wagner Rossi Júnior, obrigado por toda a atenção dispensada, pelas dicas e pelos ensinamentos. Agradeço toda sua disponibilidade e interesse em ajudar e fazer com que este trabalho acontecesse. Sou grato pelo seu tempo, onde sempre que precisei, fui atendido da melhor forma possível, com respeito e atenção. Obrigado.

Ao biotério central da Unifal, obrigado a todos os funcionários pela ajuda e parceria. Em especial, à médica veterinária Érika Incerpi, sempre disposta a me orientar no manejo com os animais, me auxiliar na metodologia da pesquisa, e sobretudo, a doar carinho àqueles que tiveram suas vidas sublimadas em nome da ciência.

Aos funcionários do laboratório de morfologia DO ICB, Fernando, Moacyr e Andréia, obrigado pela companhia e auxílio na parte histológica envolvendo minha pesquisa.

A todos da clínica de cirurgia, aos alunos, agradeço a amizade e confiança, fomos grandes parceiros na construção do saber. Dividimos conhecimentos, brincadeiras, ansiedades e receios. Vocês me ensinaram como aprender a ensinar. Com certeza, vocês vão ficar marcados nas memórias dos meus passos. Meus agradecimentos à Val e Daiana, por todo o carinho e respeito compartilhado nestes dois anos.

À todos os meus amigos do mestrado 2017, vocês tornaram esta jornada leve, alegre, divertida e, principalmente, possível. Além de me ajudarem com o saber

científico, se tornaram amigos e companheiros de profissão para as tarefas da vida! Meus sinceros agradecimentos por dividirem comigo momentos de muita alegria, preocupação e suor neste caminho.

Ao Professor Dr. Denismar Alves Nogueira, obrigado pela atenção, disponibilidade e paciência em me ajudar a aprender e confiar na minha capacidade. Sua direção foi uma lição devida para os passos futuros.

Ao Professor Dr. Carlos Eduardo Gomes do Couto Filho, foi muito mais que aprendizado! Foi a construção de uma amizade, de parcerias e de muito conhecimento adquirido e compartilhado. Agradeço cada minuto de experiência, profissionalismo, dicas e conselhos. Me despeço com a certeza de ser melhor do que ontem. Que os nossos sonhos nunca envelheçam.

A minha amiga, graduanda e futura colega de profissão, Ligia Reis, o tempo é umas das nossas maiores riquezas. Gostaria de agradecer imensamente por dedicar grande parte do seu tempo para ajudar na minha formação. Foram dias, manhãs, tardes e, às vezes, até noites trabalhando juntos para que pudéssemos concluir as minhas tarefas. Obrigado pela sua disposição, atenção, carinho, respeito e vontade em ajudar. Sem você, seria imprescindível a conclusão desta etapa. A você, todo meu agradecimento, carinho e respeito. Obrigado.

À Barbara Maria Fernandes, agradeço, de coração, pela sua paciência, carinho, compreensão e incentivo em todo período dessa jornada. Cada conselho e cada palavra mais rígidos de apoio. A sua preocupação e determinação em elevar a minha essência, colocaram meus pés na direção da superação. Obrigado por tudo, até aqui.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”
Carl G. Jung, 1969

RESUMO

Tanto na área médica quanto odontológica, diferentes pesquisas na procura de substâncias naturais ou sintéticas que possam substituir tecidos corpóreos perdidos, moles ou duros, têm sido realizadas. Na atualidade, devido ao grande desenvolvimento tecnológico dos biomateriais, aliado ao avanço dos conhecimentos sobre a biologia do tecido ósseo, há uma maior possibilidade de se influenciar seletivamente a formação óssea, permitindo o controle da qualidade e a quantidade de osso no interior das estruturas bucais. A falta de osso é um grande problema na reabilitação estético-funcional. Quando lesado, possui capacidade de regeneração e reparação. Porém, em situações em que o tamanho do defeito é muito grande, ele não se regenera por completo. Devido a isso a classe dos biomateriais tem ganhado destaque nas reconstruções ósseas. No campo da Odontologia, os biomateriais podem ser aplicados como enxerto ósseos em cirurgias regenerativas ou corretivas. A área da bioengenharia tecidual busca desenvolver biomateriais que se aproximem cada vez mais dos tecidos biológicos naturais, com o intuito de aprimorar a resposta tecidual na formação de um novo tecido. A presente pesquisa realizou uma análise comparativa da neoformação óssea entre a hidroxiapatita sintética (HAP) e o osso autógeno, considerado padrão ouro para enxertia óssea. Foram confeccionados defeitos críticos de aproximadamente 4mm em fíbulas de ratos, terço médio, para observar o comportamento da neoformação óssea frente ao biomaterial sintético HAP, observando a formação de osso das margens do defeito para o centro. Os grupos são divididos em grupo controle negativo: coágulo (COA), n=10; grupo experimental: grupo de enxerto da HAP + Membrana de Colágeno, =10; grupo com Membrana de Colágeno apenas, n=10. Foram realizadas análise histológica com hematoxilina e eosina e microscopia eletrônica de varredura. Os resultados mostraram o real potencial do biomaterial para promover uma neoformação óssea, relacionada à sua característica de osteocondução, ausência de antigenicidade bem como suas propriedades bioativas.

Palavras-chave: Enxerto Ósseo. Hidroxiapatita. Regeneração Óssea. Engenharia Tecidual.

ABSTRACT

In both the medical and dental areas, different researches in the search for natural or synthetic substances that can replace lost, soft or hard bodied tissues have been performed. At present, due to the great technological development of biomaterials, together with the advancement of knowledge about the biology of the bone tissue, there is a greater possibility of selectively influencing the bone formation, allowing the quality control and the quantity of bone inside the buccal structures. Lack of bone is a major problem in aesthetic-functional rehabilitation. When damaged, it has the capacity for regeneration and repair. However, in situations where the size of the defect is too large, it does not regenerate completely. Due to this the class of biomaterials has gained prominence in the bone reconstructions. In the field of dentistry, biomaterials can be applied as a bone graft in regenerative or corrective surgeries. The area of tissue bioengineering seeks to develop biomaterials that are increasingly approaching natural biological tissues, aiming to improve the tissue response in the formation of a new tissue. This research realized a comparative analysis of bone neoformation between synthetic hydroxyapatite (PAH) and autogenous bone, considered the gold standard for bone grafting. Critical defects of approximately 4 mm were made in the fibula of rats, medium third, to observe the behavior of the bone neoformation against the synthetic biomaterial HAP, observing the bone formation of the margins of the defect to the center. The groups are divided into negative control group: clot (COA), n = 10; experimental group: PAH graft group + Collagen Membrane, = 10; group with Collagen Membrane only, n = 10. Histological analysis with hematoxylin and eosin and scanning electron microscopy were performed. The results shown or the actual potential of biomaterial to promote bone neoformation, including osteoconduction characteristic, absence of antigenicity as well as its bioactive properties.

Keywords: Bone grafts, Hydroxyapatite, Bone Regeneration, Tissues Engineering.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Criação de defeito crítico em fíbula de ratos.....	37
Figura 2 -	Materiais usados e aplicação.....	38
Figura 3 –	Exame radiográfico inicial.....	40
Figura 4 –	Exame radiográfico pós-cirúrgico.....	40
Figura 5 –	Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo COA, 28 dias.....	42
Figura 6 –	Exame radiográfico em período de coleta, grupo COA, 28 dias.....	42
Figura 7 –	Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo COA, 45 dias.....	43
Figura 8 –	Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo COA, 45 dias.....	43
Figura 9 –	Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo COA, 45 dias.....	44
Figura 10 –	Exame radiográfico em período de coleta, grupo COA, 45 dias.....	44
Figura 11 –	Vista panorâmica do defeito ósseo do grupo Membrana Biológica, 28 dias (200X).....	45
Figura 12 –	Vista panorâmica do defeito ósseo do grupo Membrana Biológica, 28 dias (100X).....	45
Figura 13 –	Exame radiográfico em período de coleta, grupo Membrana Biológica, 28 dias.....	45
Figura 14 –	Exame radiográfico em período de coleta, grupo Membrana Biológica, 28 dias.....	45
Figura 15 –	Vista panorâmica do defeito ósseo do grupo Membrana Biológica, 45 dias (200X).....	46
Figura 16 –	Vista panorâmica do defeito ósseo do grupo Membrana Biológica, 45 dias (100X).....	46
Figura 17 –	Vista panorâmica do defeito ósseo do grupo Membrana Biológica, 45 dias (100X).....	47
Figura 18 –	Exame radiográfico em período de coleta, grupo Membrana	

	Biológica, 45 dias.....	47
Figura 19 –	Vista panorâmica do defeito ósseo do grupo Hidroxiapatita (HAP) GenPhos ® HA TCP GENIUS associada com Membrana Biológica GenDerm® GENIUS, 28 dias (100X).....	48
Figura 20 –	Vista panorâmica do defeito ósseo do grupo Hidroxiapatita (HAP) GenPhos ® HA TCP GENIUS associada com Membrana Biológica GenDerm® GENIUS, 28 dias (400X).....	48
Figura 21 –	Vista panorâmica do defeito ósseo do grupo Hidroxiapatita (HAP) GenPhos ® HA TCP GENIUS associada com Membrana Biológica GenDerm® GENIUS, 28 dias (200X).....	48
Figura 22 –	Vista panorâmica do defeito ósseo do grupo Hidroxiapatita (HAP) GenPhos ® HA TCP GENIUS associada com Membrana Biológica GenDerm® GENIUS, 28 dias (400X).....	49
Figura 23 –	Vista panorâmica do defeito ósseo do grupo Hidroxiapatita (HAP) GenPhos ® HA TCP GENIUS associada com Membrana Biológica GenDerm® GENIUS, 28 dias (100X).....	49
Figura 24 –	Exame radiográfico em período de coleta, grupo Hidroxiapatita (HAP) GenPhos ® HA TCP GENIUS associada com Membrana Biológica GenDerm® GENIUS, 28 dias.....	50
Figura 25 –	Vista panorâmica do defeito ósseo do grupo Hidroxiapatita (HAP) GenPhos ® HA TCP GENIUS associada com Membrana Biológica GenDerm® GENIUS, 45 dias (400X).....	50
Figura 26 –	Vista panorâmica do defeito ósseo do grupo Hidroxiapatita (HAP) GenPhos ® HA TCP GENIUS associada com Membrana Biológica GenDerm® GENIUS, 45 dias (100X).....	51

Figura 27 –	Vista panorâmica do defeito ósseo do grupo Hidroxiapatita (HAP) GenPhos ® HA TCP GENIUS associada com Membrana Biológica GenDerm® GENIUS, 45 dias (200X).....	51
Figura 28 –	Vista panorâmica do defeito ósseo do grupo Hidroxiapatita (HAP) GenPhos ® HA TCP GENIUS associada com Membrana Biológica GenDerm® GENIUS, 45 dias (200X).....	52
Figura 29 –	Vista panorâmica do defeito ósseo do grupo Hidroxiapatita (HAP) GenPhos ® HA TCP GENIUS associada com Membrana Biológica GenDerm® GENIUS, 45 dias (200X).....	52
Figura 30 -	Exame radiográfico em período de coleta, grupo Hidroxiapatita (HAP) GenPhos ® HA TCP GENIUS associada com Membrana Biológica GenDerm® GENIUS, 45 dias.....	53
Figura 31 -	Exame radiográfico em período de coleta, grupo Hidroxiapatita (HAP) GenPhos ® HA TCP GENIUS associada com Membrana Biológica GenDerm® GENIUS, 45 dias.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AO – Osso autógeno
- BMP – Proteína morfogenética óssea
- COA – Coágulo
- Ca/P – Razão cálcio; fosfato
- EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
- FA – Fosfatase alcalina
- HA - Hidroxiapatita
- HAP – Hidroxiapatita nanométrica carbonatada
- INPI – Instituto Nacional de Propriedade Intelectual
- OC – Osteocalcina
- PVPI – Polivinilpirrolidona-iodado
- L-PRF – Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	BIOLOGIA BÁSICA DO OSSO.....	19
2.2	MARCADORES DA REMODELAÇÃO ÓSSEA.....	21
2.3	BIOMATERIAIS PARA ENXERTOS ÓSSEOS.....	22
2.4	HIDROXIAPATITA SINTÉTICA.....	28
2.5	MEMBRANAS BIOLÓGICAS.....	31
3	OBJETIVOS	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	MODELO EXPERIMENTAL.....	35
4.1.1	Grupos controle.....	35
4.1.2	Grupos experimentais.....	35
4.2	PROCEDIMENTOS CIRURGICOS.....	36
4.3	EUTANÁSIA.....	39
4.4	PROCESSAMENTO DAS PEÇAS.....	39
4.5	EXAME RADIOGRÁFICO.....	40
4.6	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	41
5	RESULTADOS	42
5.1	Análise histológica qualitativa.....	42
5.1.1	Grupo Coágulo (COA).....	42
5.1.2	Grupo Membrana Biológica.	44
5.1.3	Grupo Hidroxiapatita (HAP) com Membrana Biológica.....	47
6	DISCUSSÃO	53
7	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60
	ANEXOS	72

1 INTRODUÇÃO

A humanidade, desde épocas remotas, tem procurado maneiras de substituir tecidos vivos, utilizando como substitutos substâncias sintéticas ou naturais, as quais, mais recentemente, têm sido genericamente chamadas de biomateriais. Verificando o histórico dos biomateriais na área médico-odontológica, inúmeras pesquisas têm sido realizadas na procura por substâncias naturais ou sintéticas que possam substituir tecidos corpóreos, moles ou duros, perdidos. (CARVALHO et al., 2010)

A engenharia tecidual vem se apresentando como uma estratégia promissora para a área de regeneração óssea. Estima-se que em 2020, no mundo todo, aproximadamente 6,6 milhões de cirurgias ortopédicas serão realizadas anualmente para reparo de defeitos ósseos provenientes de fraturas, doenças ou má formação. Nos estados unidos, 1,3 milhões de pessoas se submetem a cirurgias do sistema ósseo anualmente. Nesse contexto, faz-se necessário desenvolver substitutos biológicos que imitam a estrutura e a função dos tecidos originais. (MANDAL et al., 2012; MCNAMARA et al., 2014; MELKE et. al., 2016.)

O tecido ósseo é um tecido que possui capacidade de regeneração tecidual frente a uma lesão, porém, essa regeneração possui limitações relacionadas ao tamanho do defeito gerado. (MAVROPOULOS et al., 2013).

Os defeitos ósseos, quando muito extensos, não tem a capacidade de regeneração espontânea, sendo denominados, nestes casos, como defeitos críticos (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

Defeitos ósseos críticos são defeitos que apresentam a neoformação óssea das margens do defeito para o centro, portanto o tecido ósseo por si só não regenera. (MAVROPOULOS et al., 2013).

Defeitos ósseos críticos geralmente resultam em comprometimento estético e funcional e necessitam de algum tipo de intervenção clínica como, por exemplo, a aplicação de um enxerto ósseo autógeno (SPICER et al., 2012).

Sobre a enxertia é preciso salientar que os enxertos ósseos podem ser obtidos de diferentes origens: autógeno (do mesmo indivíduo), alógeno (de indivíduos da mesma espécie), xenógenos (de espécies diferentes) ou aloplástico (sintético). (SOARES, 2015)

Misch (2000), descreveu o osso autógeno como o padrão ouro nos enxertos ósseos, devido aos mecanismos biológicos presentes para a neoformação óssea. Sendo que a osteogênese, a osteoindução e a osteocondução são os mecanismos orientadores para a formação óssea no local do enxerto. É preciso salientar que apesar da grande facilidade de execução e da excelente qualidade dos resultados obtidos, na maioria dos casos, a enxertia autógena possui limitações como o sacrifício de cartilagem não danificada para extração do material, bem como possíveis alterações celulares associadas e mudanças degenerativas (SHIMOMURA, et al, 2018).

Mas, mediante à necessidade cada vez maior de cirurgias reconstrutivas, alternativas de enxertos aloplásticos (sintéticos ou inorgânicos) tem se destacado nas pesquisas odontológicas por substitutos ósseos. Uma vez que os produtos sintéticos não possuem potencial antigênico, e podem ser adquiridos em grandes quantidades, a sua utilização vem sendo preconizada na literatura, em associação a outros biomateriais, ao osso autógeno, e também à concentrados plaquetários.

Para se utilizar um biomaterial com segurança, o mesmo deve apresentar algumas características básicas, tais como: (1) biocompatibilidade, não induzindo respostas biológicas adversas, como reações alérgicas e inflamatórias não toleráveis pelo organismo; (2) alta osteocondutividade, estimulando o crescimento de células ósseas; e (3) bioatividade, que é a capacidade do material em se unir com tecido biológico.(SOARES, 2015)

Existe no mercado uma grande variedade de biomateriais, sintéticos ou biológicos, com tamanhos variáveis de partículas e principalmente classificados quanto ao seu modo de ação: osteocondução, osteoindução ou osteogênese. (CARVALHO et al., 2010)

Entre os diversos biomateriais, fosfatos de cálcio têm atraído grande interesse devido à variedade de aplicações no campo biomédico e odontológico. Além da questão de seu baixo custo, potencial biodegradável e biocompatibilidade. (ANGHELINA, et al., 2013 ; WANG, 2017).

O fosfato de cálcio é um componente inorgânico presente em tecidos biológicos duros (por exemplo, ossos e dentes), onde se encontra sob a forma de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$ (MANCARDI; TERRANOVA; LEEUW, 2016). Hidroxiapatita é capaz de se integrar biologicamente quando diretamente implantado em um defeito ósseo, não causando efeito nocivo sobre o sistema imunológico, inclusive por não ser

tóxico e por apresentar comportamento osteocondutivo (ANGHELINA, et al., 2013 ; AZZAOU, et al., 2017).

A hidroxiapatita constitui um avanço na síntese de materiais biocerâmicos, sendo o principal componente inorgânico nos ossos, dentes e unhas (JAMARILLO et al., 2010).

É o biomaterial mais utilizado na substituição e reconstrução óssea devido a sua similaridade com o tecido ósseo, além de ser uma biocerâmica bioativa, capaz de induzir atividade biológica no tecido hospedeiro, possuindo ainda propriedades osteocondutoras (KAWACHI, 2000; HALMODIA, 2010).

Porém, frequentemente, na utilização de hidroxiapatita faz-se necessária a associação de membranas ou barreiras teciduais. As membranas, reabsorvíveis ou não, oferecem uma barreira mecânica com o intuito de impedir a migração de células dos tecidos moles ao redor da região enxertada, favorecendo a qualidade do osso neoformado (PARRISH et al., 2009).

Assim, a necessidade de reconstruções dos tecidos ósseos perdidos levou ao aprimoramento técnico e ao avanço do estudo de biomateriais que pudessem substituir ou aperfeiçoar os procedimentos de enxertia (SOARES, 2015).

Graças ao desenvolvimento tecnológico dos biomateriais, associado ao avanço dos conhecimentos acerca da biologia do tecido ósseo, tornou-se possível influenciar seletivamente a formação óssea controlando a qualidade e a quantidade de osso no interior das estruturas bucais. Contudo, a pesquisa do material de implante ideal para substituição do enxerto ósseo autógeno, o melhor substituto ósseo, ainda persiste como um dos maiores desafios da Odontologia moderna (CARVALHO et al., 2010).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOLOGIA BÁSICA DO OSSO

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo, formado por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea (JUNQUEIRA ; CARNEIRO, 2008).

Lindhe (2010), relata que no interior desta matriz, temos íons cálcio e fosfato, entre outros, organizados na forma de hidroxapatita.

As células são: os osteócitos, que se situam em cavidades ou lacunas no interior da matriz; os osteoblastos, que sintetizam a parte orgânica da matriz e localizam-se na sua periferia; e os osteoclastos, células gigantes, móveis e multinucleadas que reabsorvem o tecido ósseo, participando dos processos de remodelação dos ossos.

Os osteócitos são células achatadas, que exibem pequena quantidade de retículo endoplasmático rugoso, aparelho de Golgi pouco desenvolvido e núcleo com cromatina condensada. Embora essas características ultraestruturais indiquem pequena atividade sintética, os osteócitos são essenciais para a manutenção da matriz óssea. Sua morte é seguida por reabsorção da matriz.

Os osteoblastos são as células que sintetizam a parte orgânica (colágeno tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas) da matriz óssea. São capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. Dispõem-se sempre nas superfícies ósseas, lado a lado, num arranjo que lembra um epitélio simples. Quando em intensa atividade sintética, são cuboides, com citoplasma muito basófilo. Porém, em estado de pouco ativo, tornam-se achatados e a basófila citoplasmática diminui.

Os osteoblastos são conhecidos como células formadoras de osso. São responsáveis pela síntese de BMP (proteína óssea morfogenética), que ficará alojada na matriz extracelular.

Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas, localizadas nas lacunas de Howship, móveis e responsáveis pela reabsorção óssea. Junto com o osteoblasto formam a unidade óssea multicelular, responsáveis pelo processo de remodelação óssea (JUNQUEIRA ; CARNEIRO, 2008).

Os osteoclastos estão envolvidos no processo de reparo ósseo, principalmente quando utilizamos de enxertos ósseos para reconstrução, e o papel destas células nos mecanismos de enxertos resultará na resposta tecidual positiva, fazendo com que

o enxerto, de qualquer natureza, passe a pertencer biologicamente ao hospedeiro.

O metabolismo ósseo compreende os processos de modelação e remodelação óssea, atuando principalmente na homeostase de cálcio à níveis sanguíneos.

A modelação óssea corresponde a qualquer transformação ou alteração na forma ou tamanho do osso, mediante um processo anabólico ou catabólico, por exemplo na osseointegração, onde ocorre uma formação óssea sem ser precedida de reabsorção. Na remodelação, temos ações conjuntas e sequenciais de osteoclastos e osteoblastos, na reabsorção de osso velho e substituição por novo osso (PELEGRINE et al. 2009).

A remodelação óssea é um processo fisiológico constante no qual a formação óssea é correspondente à reabsorção, sendo regulada por diversos fatores, como mecanismos regulatórios intracelulares, influência hormonal, fatores locais e externos. Alterações nesse processo podem resultar em diferentes distúrbios, entre eles a osteoporose (NAJJAR; KAHN, 1977).

Na remodelação óssea nós temos a Unidade Óssea Multicelular, onde a ação conjunta das células presente numa mesma interface concretiza o processo de remodelação fisiológico sem perda de massa óssea (PELEGRINE et al. 2009). O processo de remodelação ocorre em pequenos conjuntos de células chamadas de unidades multicelulares básicas de remodelação óssea (BMU), sendo caracterizado pelo acoplamento das funções dos osteoclastos e osteoblastos. Cada unidade é geográfica e cronologicamente separada de outros conjuntos, sugerindo que a ativação de sequência de ocorrências celulares responsáveis pela remodelação seja também controlada localmente por fatores gerados no microambiente ósseo. (AMADEI et al., 2006)

Os sinais mecânicos são sobrecarga patológica, hipertrofia fisiológica, atrofia por desuso; os sinais metabólicos incluem os sinais endócrinos: através do paratormônio, calcitonina, estrogênio, testosterona, vitamina D, hormônio de crescimento; e de sinais autócrinos/parácrinos: prostaglandinas, interleucinas.

Todo o processo metabólico ósseo está intimamente relacionado a homeostasia de cálcio no organismo, a níveis séricos, para que os processos celulares se desenvolvam corretamente. A homeostasia de cálcio ocorre por três mecanismos: fluxo rápido de cálcio do fluido ósseo; resposta a curto prazo dos osteoclastos e osteoblastos regulados pelas atividades hormonais; controle prolongado da renovação óssea por fatores biomecânicos e hormônios sexuais (LINDHE, 2010).

Doenças sistêmicas metabólicas como a diabetes influenciam nos eventos celulares, seja na resposta imunológica, seja na modulação da atividade osteoclástica e osteoblástica, na vascularização dos tecidos corporais e chegada de glicose na célula; o fumo também contribui para a deficiência das respostas celulares nos mecanismos de renovação e reparação, tanto pelas substâncias tóxicas, como pela dificuldade de oxigenação celular. Vários estudos constataram que as células osteogênicas pré osteoblásticas provém do tecido perivascular adjacente, isso confirma o princípio cirúrgico de que o suprimento sanguíneo é essencial (MISCH, 2008).

2.2 MARCADORES DA REMODELAÇÃO ÓSSEA

O osso é um tecido conjuntivo especializado, vascularizado e dinâmico que se modifica ao longo da vida do organismo. Quando lesado, possui uma capacidade única de regeneração e reparação sem a presença de cicatrizes, mas em algumas situações devido ao tamanho do defeito, o tecido ósseo não se regenera por completo (ARANEGA et al., 2010).

Após uma lesão óssea, uma sequência de eventos dinâmicos ocorre com o objetivo de restaurar a forma e a função do osso. Muitos desses mecanismos biológicos celulares ainda não foram completamente identificados, porém sabe-se que o processo é ativado pela liberação de fatores de crescimento e citocinas no local.

A reparação óssea é semelhante tanto para pequenas quanto para grandes injúrias, para fraturas ósseas e para defeitos cirúrgicos. Quando um osso é lesado, periósteo, vasos na cortical, medula e tecidos circundantes são rompidos. Ocorre um sangramento oriundo das margens do tecido ósseo lesado e dos tecidos moles vizinhos. É formado um hematoma ou coágulo sanguíneo dentro do canal medular, entre as extremidades da fratura óssea e o periósteo (AMADEI et al., 2006).

O coágulo que ocorre após a fratura consiste em extravasamento de eritrócitos, fibrina e plaquetas, que liberam PDGF, FGF e TGF-alfa, fatores quimiotáticos e reguladores da atividade celular (HOLLINGER; WONG, 1996).

Para que o reparo se inicie, o coágulo sanguíneo e os restos celulares e da matriz devem ser removidos pelos macrófagos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011). Simultaneamente à formação do coágulo, o tecido imediatamente adjacente à fratura se necrosa. Esse tecido necrótico estimula intensa resposta inflamatória,

caracterizada por vasodilatação, exsudação do plasma, leucócitos e células mesenquimais (AMADEI et al., 2006).

A fosfatase alcalina (FA) é medida através de sua atividade e corresponde à uma das diversas isoformas presentes no soro. É o marcador de formação óssea mais frequentemente utilizado. Os fenômenos ósseos associados a elevação de fosfatase alcalina necessitam ser de grande intensidade, como ocorre nas fraturas, lesões de furca ou defeitos críticos, pois quando se busca maior sensibilidade e especificidade, a fosfatase alcalina óssea é a mais indicada.

A osteocalcina (OC) é a proteína não colágena mais abundante no osso e dentina, sabe-se que é sintetizada predominantemente pelos osteoblastos diferenciados, incorporada à matriz óssea extracelular e relacionada à mineralização da matriz osteóide. Possui em sua estrutura três ácidos glutâmicos que lhe conferem a capacidade de ligar-se ao cálcio e isto pode ser importante no processo de mineralização da matriz óssea já formada. Os fragmentos de pró-colágeno produzidos durante o processo de maturação do colágeno são liberados para a circulação e também podem ser dosados por ensaios específicos, representando a formação óssea, é um marcador bastante específico da atividade osteoblástica (SARAIVA, 2002).

2.3 BIOMATERIAIS PARA ENXERTOS ÓSSEOS

Biomaterial é descrito como um material compósito utilizado na área da saúde, podendo ser usado para substituir no todo ou em parte o sistema biológico. Deve apresentar características como, biocompatibilidade, bioatividade, resistência mecânica e porosidade, para ser considerado ideal para uso interno no corpo humano (SZCZES, 2017).

Um material bioativo é aquele que se liga ao osso adjacente, sem a formação de tecido fibroso (MASAELI et al., 2016).

O envelhecimento da população mundial, a elevação da expectativa de vida e os maus hábitos alimentares aliados a má higiene bucal são alguns fatores que levam a necessidade de busca, melhorias tecnológicas e desenvolvimento de biomateriais para diferentes finalidades (PIRES ; BIERHALZ ; MORAES, 2015).

Classicamente, os materiais para enxerto ósseo podem ser classificados como osteogênicos, osteoindutores e osteocondutores (FARDIN ; JARDIM ; PEREIRA,

2010).

Pelegrine et al. (2009), nos descreve a osteogênese como o mecanismo pelo qual células vitais são transplantadas para o sítio receptor e desencadeiam o processo de formação óssea; osteoindução: reguladores biológicos e/ou fatores de crescimento na região do enxerto são capazes de recrutar e induzir a diferenciação e proliferação de células ósseas e osteogênicas; osteocondução: mecanismo pelo qual biomateriais com suas propriedades específicas de superfície são capazes de conduzir a formação óssea por substituição através da arquitetura do espaço que preenchem.

A biocompatibilidade é uma propriedade que os materiais devem apresentar para que eles possam ser utilizados em um sistema biológico, sem provocar reações adversas e nem impeçam a diferenciação tecidual característica do local da implantação (CARVALHO et al., 2010).

De acordo com Williams (1987), substitutos ósseos devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com o tecido vivo do hospedeiro, sinalizando uma resposta tecidual adequada, característica esta que denominamos por biocompatibilidade.

Não existe o material para enxertia dito ideal, mas o osso autógeno é consagrado na literatura mundial como o que consegue reunir características mais próximas do ideal. Possui como principal vantagem seu potencial de integração ao sítio receptor com mecanismos de formação óssea de osteogênese, osteoindução e osteocondução (FARDIN ; JARDIM ; PEREIRA, 2010).

Williams (1987), relata que durante a remoção do osso da área doadora, células ósseas são transplantadas para o sítio receptor. O osso autógeno também contribui para o crescimento do osso com BMP (proteína morfogenética óssea), e outros fatores de crescimento que são liberados durante a incorporação do enxerto.

Os enxertos alógenos são assim chamados por ocorrerem entre indivíduos diferentes de uma mesma espécie. Encontramos o osso congelado, seco e desmineralizado ou não. Misch (2008), relata que o osso desmineralizado tem potencial osteoindutor maior, devido à rápida exposição das BMPs, enquanto o osso não desmineralizado tem sua característica mais osteocondutora, pelo tempo de reabsorção da porção mineral do osso. Os resultados com estes enxertos são conflitantes, pois muitos são os questionamentos quanto à antigenicidade e à osteoindução desses enxertos.

Com o advento da implantodontia, novas alternativas cirúrgicas reconstrutivas têm

sido discutidas no campo dos enxertos ósseos, pois a amplitude de biomateriais disponíveis, associados ou não à concentrados plaquetários, tem mostrado eficácia e resultados positivos nas reconstruções ósseas prévias ao tratamento com implantes.

Tem-se destacado então, os biomateriais, sintéticos, naturais ou xenógenos, com alternativas viáveis para substituição óssea, a fim de reduzir as taxas de morbidade das cirurgias de enxerto, bem como menor tempo de exposição cirúrgica e facilitação da técnica (HELMUS ; TWEDEN, 1995). Independentemente da origem ou métodos de produção, os materiais utilizados para enxerto ósseo devem respeitar certos critérios e características adequadas para os princípios de enxerto. O material utilizado para enxerto deve ser seguro e biocompatível para evitar o risco de transmissão de doenças ou respostas imunes (BUSER, 2010). Os biomateriais são caracterizados por seu potencial osteocondutor. A osteocondução é caracterizada pela substituição do biomaterial enxertado pelo osso neoformado, através da manutenção do arcabouço pelo enxerto. Os materiais osteocondutores são biocompatíveis, e demonstram a formação óssea por substituição e aposição de tecido mole adjacente sem nenhuma reação tóxica.

Os materiais osteocondutores mais comumente utilizados na implantodontia são os alógenos mineralizados, os xenógenos e os aloplásticos. A variedade de biomateriais aloplásticos é grande, destacando-se entre as cerâmicas, os polímeros e os compósitos. As cerâmicas mais utilizadas são as cerâmicas bioativas, incluem os fosfatos de cálcio e seus produtos, tais como a hidroxiapatita sintética e matriz orgânica óssea bovina, fosfatos tricálcicos, e carbonatos de cálcio.

Muitas são as características dos biomateriais, relacionadas ao aumento ou manutenção de tecido duro. Segundo Misch (2008), podem ser classificados em reabsorvíveis e não-reabsorvíveis, densos ou porosos, cristalinos ou amorfos. Por conseguinte, são essas características de superfície e forma que irão guiar as indicações de cada biomaterial. As formas mais densas, apresentam-se mais duras, similar a dentina, são dificilmente reabsorvidas, portanto seu objetivo maior é preencherem espaço e manter contorno, como nos casos em que desejamos aumentar suporte para próteses totais. Formas mais cristalinas, principalmente das hidroxiapatitas, são mais resistentes à destruição celular que as amorfas, porém, podem sim ser reabsorvidas, num processo mais lento, dependendo do pH do meio, e da porosidade da estrutura. As formas mais porosas e amorfas de materiais osteocondutores, são reabsorvidos tanto em tecido duro quanto em tecido mole,

processo similar à remodelação óssea natural. À medida que o campo da implantodontia avança nas pesquisas, muito tem-se pesquisado e evoluído nesta classe de biomateriais, que visam proporcionar a preservação da anatomia do rebordo alveolar após a perda dos dentes. Esses materiais são a hidroxiapatita, fosfato betatricoálcico, porções inorgânicas de osso xenógeno ou combinações deles.

Na terapia reconstrutiva óssea, a velocidade de reabsorção do biomaterial é um fator determinante para a seleção e indicação de cada biomaterial, de acordo com a finalidade cirúrgica. A reabsorção ocorre principalmente por meio de dois mecanismos distintos: mediada por células ou por dissolução. A reabsorção por dissolução é dependente do pH circundante, e ocorre em biomateriais mais mineralizados, mais inorgânicos. Este tipo de reabsorção é mais lento, comparando com a reabsorção mediada por células, onde ocorre a fagocitose de maneira rápida pelos osteoclastos ou células fagocíticas. A taxa de reabsorção é afetada pelo tamanho da partícula, pela porosidade e pela composição do material. O leito receptor também interfere na velocidade de reabsorção, seguindo a sua atividade metabólica de remodelação.

Sendo assim, as características geométricas do material devem favorecer a invaginação dos vasos sanguíneos, cruciais para a formação óssea dentro do biomaterial. Isto significa que a porosidade é importante, mas também a interconexão entre os macroporos. As características superficiais dos substitutos ósseos são determinadas pela composição química, microporosidade, rugosidade superficial, cristalinidade e tamanho do cristal. A fase inicial da neoformação óssea se relaciona diretamente com tais características, pois elas determinam a resposta tecidual do hospedeiro como adsorção proteica inicial, adesão de osteoblastos e osteoclastos, e deposição de osteoide para a aposição direta do osso recém-formado na superfície do material (BUSER, 2010).

Os materiais para substituição óssea conhecidos como xenoenxertos são minerais ósseos derivados de animais, corais, ou algas calcificadas. O componente orgânico é removido a fim de se evitar respostas imunogênicas ou transmissão de doenças. A remoção do componente orgânico pode ocorrer por reação térmica ou por método de extração química. São biomateriais com potencial enorme de osteocondução, porém sua reabsorção é algo bastante questionado na literatura, são materiais com velocidade de reabsorção bastante lenta, sendo alguns casos encontrados em biópsias até 10 anos depois do enxerto, porém, como ponto positivo, eles mantem o volume ósseo no local (BUSER, 2010).

Os biomateriais aloplásticos vem como grande promessa no campo das cirurgias reconstrutivas, por serem de origem sintética há a possibilidade de individualizar o material de acordo com a necessidade clínica de cada paciente. Todas as características podem ser controladas no laboratório, como a interconectividade dos poros, o tamanho dos poros, a forma cristalina ou amorfa, e morfologia dos blocos e grânulos.

Muitos pesquisadores têm idealizado o biomaterial perfeito, que apresente adsorção inicial de proteínas e outras macromoléculas séricas para a adesão de células osteogênicas e a reprodução de um material macroporoso com rugosidade superficial que simule o mineral ósseo natural. Lindhe (2010), relata que os mais comumente usados em odontologia são os fosfatos de cálcio: hidroxiapatita e trifosfato de cálcio beta, a principal característica que os diferencia é a velocidade de reabsorção, onde a mais lenta é da HA. A reabsorção ocorre por dois processos, ou o material é reabsorvido por células fagocíticas, que ocorre rapidamente, ou é dissolvido pela influência do meio (ph), que ocorre mais lentamente. O que caracteriza a escolha do material é justamente a aplicabilidade clínica, onde áreas que buscamos melhor recontorno ósseo com volume ósseo, utilizamos os reabsorvidos mais lentamente, e áreas em que desejamos neoformação óssea com aumento de volume para instalação de implantes usamos materiais com reabsorção adequadamente mais rápida.

Kawachi et al. (2000), descreveu que dentre as cerâmicas de fosfato de cálcio, a hidroxiapatita com razão Ca/P igual a 1,67, por ser o principal componente presente na fase mineral dos ossos é, sem dúvida, a mais estudada e a mais utilizada para as finalidades clínicas. O uso clínico da hidroxiapatita, por outro lado, é limitado devido a sua lenta biodegradação. Estudos efetuados por longos períodos de tempo têm mostrado que a hidroxiapatita começa a ser reabsorvida gradualmente após 4 ou 5 anos de implante. A reabsorção é uma característica desejada para um biomaterial em alguns tipos de implantes, nos quais o processo de degradação é concomitante com a reposição do osso em formação.

Misch (2008), preconiza que para os procedimentos reconstrutivos para colocação de implantes, idealmente a utilização simultânea dos biomateriais com características diferentes levaria a resultados melhores, como uma variação da técnica.

Os biovidros tem sido uma classe muito descrita de biomateriais sintéticos a base

de sílica, formando compósitos bioativos, mas sua aplicação tem direcionado para cirurgias ortopédicas.

De acordo com Silva et al. (2016), a doxiciclina, antibiótico amplamente utilizado em doenças periodontais, demonstrou capacidade de estimular a diferenciação de células osteoprogenitoras e osteoprecursão, bem como influência na proliferação de osteoblastos. Este resultado gera novas perspectivas no campo de biomateriais para substitutos ósseos, uma vez que também atua na resposta de defesa local como antibacteriano, anti-inflamatório, inibidor das colagenases e imunossupressor.

Para as reconstruções ósseas, Misch (2008) utilizou da abordagem em camadas como uma técnica que visava agregar todas as características e princípios biológicos de enxertia óssea a fim de promover melhor velocidade na neoformação óssea, qualidade óssea, e proteção através de membranas. Esta abordagem salienta a utilização do enxerto autógeno, em bloco, para aumento volumétrico, seguido da utilização de enxerto alógeno particulado junto aos biomateriais, de origem xenógena e sintética, aumentando consideravelmente a osteocondução com a finalidade de manter o volume ósseo adequado. Após a colocação de todo o material de enxertia óssea, uma membrana envolve-os para protegê-los da invaginação de tecido mole, e também, tratando-se de membrana autógena, liberar gradativamente os fatores de crescimento sobre o enxerto.

A literatura até então descreve muitos benefícios relacionados às modificações em biomateriais sintéticos, modificações químicas que resultam em uma melhor resposta celular ao biomaterial na enxertia. Sendo assim, foi desenvolvida nos laboratórios de química e física da Universidade Federal de Alfenas, a hidroxiapatita nanométrica carbonatada, em que a adição do componente carbonato provê melhoras na adsorção proteica durante o processo de vascularização e implantação do biomaterial no sítio receptor e, conseqüentemente, auxilia na quimiotaxia para diferenciação de osteoblastos e migração de células osteoprogenitoras (MAVROPOULOS et al. 2013).

Um estudo comparativo realizado por Pereira et al. (2013) avaliou a resposta tecidual na regeneração óssea em fíbula de ratos, utilizando três variações de hidroxiapatita. Foram comparadas às hidroxiapatitas nanométrica, nanométrica carbonatada e a hidroxiapatita cristalina (comercial). Os testes mostraram que todas as amostras apresentaram boa regeneração óssea, porém, as hidroxiapatitas em escalas nanométricas apresentaram maior velocidade na neoformação óssea. Podemos considerar esta característica extremamente favorável para biomateriais

com a finalidade de reconstruções ósseas para instalação de implantes, confirmando a eficácia da hidroxiapatita nanométrica como biomaterial osteocondutor.

Mavropoulos et al. (2013), verificou que a adição de íons de zinco à fórmula da hidroxiapatita nanométrica melhorava consideravelmente a adsorção proteica no início da neoformação óssea, o que resulta em um favorecimento para diferenciação osteoblástica no local do enxerto. Tal benefício acarreta em uma melhoria na velocidade da neoformação óssea, como também na qualidade do osso neoformado, que pode ser avaliada através das proteínas ósseas presentes no local do enxerto, como a osteocalcina, fosfatase alcalina, osteopontina e osteoprotegerina.

A comprovação científica do potencial osteocondutor da hidroxiapatita está validada tanto na literatura quanto na experiência clínica, e comercialmente existem vários produtos com a finalidade de induzir a neoformação óssea em locais com reabsorções severas, visando a terapia implantodôntica. A modificação na escala, estrutura e composição da hidroxiapatita nanométrica carbonatada melhora significativamente a resposta tecidual para neoformação óssea (PEREIRA et al., 2013).

2.4 HIDROXIAPATITA (HAP)

A HA pertence ao grupo das apatitas, sendo um dos três componentes básicos do osso humano. De maneira geral podemos dizer que o corpo humano é constituído por três componentes básicos: água, colágeno e hidroxiapatita.

De acordo com, (LOO, et al., 2010), está presente na composição de 55% dos ossos, 96% na composição do esmalte dentário e 70% da dentina.

A hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) é a molécula predominante no osso mineralizado (XIAO-MAN; WEBSTER, 2005).

A hidroxiapatita é, então, um tipo de enxerto do grupo das biocerâmicas (NAGASSE et al., 2010).

A substituição ou regeneração por meio de enxerto de um osso danificado é um grande desafio na cirurgia ortopédica (BASHA ; KUMAR ; DOBLE, 2015).

A hidroxiapatita constitui um avanço na síntese de materiais biocerâmicos, representando uma alternativa para o enxerto autógeno. Ela é o principal componente inorgânico de tecidos, tais como: osso, dentes e unha (JARAMILLO et al., 2010).

É o biomaterial mais utilizado na substituição e reconstrução óssea devido a sua

similaridade com o tecido ósseo, além de ser uma biocerâmica bioativa, a qual induz atividade biológica do tecido hospedeiro, e possuir propriedades osteocondutoras (KAWACHI, 2000; HALMODIA, 2010).

Esta cerâmica bioativa tem sido muito utilizada para reparação e reconstrução de fraturas ósseas, bem como para revestimentos de implantes ortopédicos, dentários e como cimento ósseo para reparação craniofacial, onde uma forte interação entre o implante e a interface com o osso é necessária (AMINZARE et. al., 2013; ANDRADE et al., 2016; LALA et al., 2013; ZILM et al., 2015).

Entre as diferentes categorias de biomateriais, as cerâmicas bioativas, tais como a hidroxiapatita sintética (HA , $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), tornou-se um candidato atraente para substituições de tecidos duros do corpo e um material para aplicações biomédicas, por apresentar composição e estrutura química semelhante a fase mineral do osso, além de que, possui propriedades como a biocompatibilidade e a osteoregeneração (AMINZARE et. al., 2013; ANDRADE et al., 2016; LALA et al., 2013; ZILM et al., 2015).

A hidroxiapatita favorece o crescimento ósseo devido a sua similaridade química com a fase mineral dos ossos. Sua aplicação permite a regeneração do tecido ósseo pelo processo de osteoindução (SZCZES, 2017).

A hidroxiapatita desempenha também um papel de carreador de indutores de crescimento ósseo. A hidroxiapatita é capaz de favorecer e direcionar o crescimento ósseo para os locais onde ela se encontra (osseocondutor), estabelecendo ligações de natureza química entre ela e o tecido ósseo (bioatividade) e permitindo a proliferação de fibroblastos, macrófagos e osteoblastos, entre outras células, para viabilizar a neoformação tecidual (NOTODIHARDJO et al., 2012).

De acordo com Varma et al., (1999), a regeneração do tecido também é induzida pela hidroxiapatita, pois sua superfície permite interações do tipo dipolo, fazendo com que as moléculas de água, proteínas e colágeno sejam absorvidas na superfície, ocorrendo, a partir disto, forte ligação entre a hidroxiapatita e o tecido ósseo na sua superfície sob condições *in vivo*.

Suas principais características consistem na biocompatibilidade, osteocondução e bioatividade. Esta última ocorre devido às similaridades químicas da hidroxiapatita em relação à parte mineral óssea, permitindo diversas ligações químicas. A osteocondutividade, por sua vez, representa a capacidade do enxerto de direcionar a neoformação óssea, por ser um leito favorável para esse processo. Por causa dessas

características, a hidroxiapatita é cotada como um possível substituto do enxerto. Além disso, ela é um produto de menor custo em relação à proteína morfogênica óssea (BMP) e outros aloenxertos, além da sua disponibilidade (NAGASSE et al., 2010).

As hidroxiapatitas, enquanto osteocondutivas, irão agir com suporte para a proliferação de novos vasos sanguíneos e como um guia para a deposição de novo osso através do processo de substituição. Elas também possuem características osteoindutivas, auxiliando na transformação do tecido conjuntivo em osso endocondral (ARAÚJO, 2009).

As características da hidroxiapatita de osteocondução e de biocompatibilidade determina a ausência de resposta local e sistêmica. Este material é muito similar ao osso natural no que se refere à área interna de superfície, à porosidade, cristalinidade e razão molar cálcio-fosfato. Assim, este enxerto é seguro, uma vez que não provoca respostas imunes e apresenta um risco mínimo para a transmissão de doenças. Além do mais, ele apresenta padrões de reabsorção e degradação muito lentos, onde se pode observar a ocorrência de neoformação óssea ao redor de suas partículas (SANCHES, 2010).

Este material é capaz de integrar biologicamente quando diretamente implantado em um defeito ósseo. Além disso, não produz efeito nocivo sobre o sistema imunológico, não é tóxico, e apresenta comportamento osteocondutivo (ANGHELINA, et al., 2013).

A comprovação científica do potencial osteocondutor da hidroxiapatita está validada tanto na literatura quanto na experiência clínica, e comercialmente existem vários produtos com a finalidade de induzir a neoformação óssea em locais com reabsorções severas, visando a terapia implantodôntica (PEREIRA et al., 2013).

Sendo assim, a hidroxiapatita (HAP) é um biomaterial amplamente explorado para aplicações médicas, sendo um fosfato de cálcio estável sob condições fisiológicas. Suas características fazem com que a HAP possa ser aplicada em diferentes áreas médicas, tais como na engenharia de tecido ósseo (SHOJAI et al., 2013; PRAKASAM et al., 2015; IBRAHIM et al., 2017; HAIDER et al., 2017).

As principais aplicações da hidroxiapatita, em medicina e odontologia, são: reparo de defeitos ósseos em aplicações odontológicas e ortopédicas, aumento do rebordo alveolar, coadjuvante na colocação de implantes metálicos, regeneração guiada de tecidos ósseos, reconstrução buco-maxilo-facial, etc. (AOKI, 1991).

Cabral (2014) relata que a hidroxiapatita é, sem dúvida, o material mais usado ao longo dos anos, tendo como característica mais importante a osteocondutibilidade, responsável pela indução de crescimento ósseo no interior do enxerto, promovendo estabilidade e manutenção de volume.

De acordo com Martins et al. (2010), as principais vantagens do uso da hidroxiapatita são: a não necessidade de se abrir um segundo sítio cirúrgico, sua biocompatibilidade e sua capacidade de formar uma ligação direta com o tecido ósseo. Como desvantagens, os autores citam: sua incapacidade de osteoindução e a ausência de células osteoprogenitoras. Loo (2010) diz que as propriedades mecânicas da hidroxiapatita não a torna apropriada para aplicações de resistência à carga, como em ortopedia. Por este motivo, pesquisas são desenvolvidas na área de síntese de hidroxiapatita, para que possua diferenciadas morfologias e estruturas, e consequentemente características diferenciadas para tal uso.

A hidroxiapatita tem sido amplamente testada e utilizada com sucesso para aplicações clínicas, ortopédicas e odontológicas, devido a sua baixa taxa de reabsorção, sua excelente biocompatibilidade com os tecidos humanos e para melhorar a osteocondutividade de implantes metálicos (DINARVAND et al., 2011; HAYAKAWA et al., 2013; RUSSO et al., 2013).

Assim, este enxerto é seguro, uma vez que não provoca respostas imunes e apresenta um risco mínimo para a transmissão de doenças. Além do mais, ele apresenta padrões de reabsorção e degradação muito lentos, onde se pode observar a ocorrência de neoformação óssea ao redor de suas partículas (SANCHES, 2010).

2.4 MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Dentre os biomateriais, as membranas biocompatíveis são muito empregadas na área de Odontologia com intuito de estimular a regeneração óssea em defeitos ósseos perenes na cavidade bucal (LEKOVIC et al., 2001). As membranas devem possuir alguns requisitos indispensáveis para agir como barreira física passiva: biocompatibilidade, propriedades oclusivas, capacidade de criação de espaço, integração tecidual e facilidade de uso (IAMAGUTI; BRANDÃO, 2007).

Existem dois tipos básicos de membranas: as reabsorvíveis e as não reabsorvíveis (PONTORIERO et al., 1989).

As membranas não absorvíveis foram os primeiros materiais aprovados para uso clínico. Elas mantêm sua integridade estrutural e podem ser deixadas por muito tempo sobre os tecidos. Sua estabilidade dimensional e desenho permitem ao operador um completo controle de sua aplicação e minimização das variações de efeito. Requerem um segundo tempo cirúrgico para serem removidas. Sua função é temporal e uma vez completada é removida (JOLY et al., 2002).

A primeira a ser comercializada era feita de politetrafluoroetileno expandido (e-PTFE), membrana porosa de teflon. Depois outras membranas não-absorvíveis surgiram, tais como, membranas de poli-tetrafluoroetileno, silicone (Biobrane®) e celulose (GARBIN, 1994).

A óbvia e maior desvantagem da membrana de PTFE-e é a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica para sua remoção (BORNSTEIN et al., 2007).

As membranas também podem ser constituídas por materiais reabsorvíveis. São aqueles compostos por polímeros sólidos que podem ser degradados e absorvidos *in vivo*, isto é, são eliminados através de vias naturais por simples filtração dos produtos da degradação ou após sua metabolização. Assim, reabsorção é um conceito que indica a total eliminação do material inicial e dos seus subprodutos (compostos de baixo peso molecular), sem efeitos colaterais residuais (VERT, 1992). Membranas R podem ser constituídas de vários materiais que apresentam esta propriedade. Pesquisas foram conduzidas empregando-se colágeno, poliglactina 910, ácido polilático, co-polímero de ácido polilático e ácido poliglicólico, entre outros (HUTMACHER et al., 1996).

As membranas de colágeno têm sido cada vez mais utilizadas por serem biocompatíveis, absorvíveis e por permitirem colonização por células osteogênicas (KASAJ et al., 2008).

Grande parte das membranas de colágeno disponíveis no mercado são provenientes do colágeno tipo I. O colágeno pode ser obtido de diferentes espécies (bovinos, suínos e de ratos) e diferentes sítios anatômicos (pericárdio, dura-máter, fáscia do temporal, derme, tendão, dentre outros) (BUNYARATAVEJ et al., 2001).

Levando em consideração que o colágeno é um agente hemostático natural, essas membranas possuem a habilidade de promover agregação plaquetária, facilitando o início do processo de reparo e a maturação da ferida (ZAHEDI et al., 1998).

O principal obstáculo para a regeneração óssea é a formação mais rápida de

tecido conjuntivo, quando comparada à osteogênese. Na última década, vários estudos em animais documentaram a possibilidade de selecionar células de determinados tecidos e impedir que células de outros tecidos não desejáveis repopulassem uma ferida, utilizando-se de membranas. Este princípio foi desenvolvido para regenerar tecidos periodontais perdidos devido à doença periodontal. Tal procedimento foi denominado regeneração periodontal guiada e teve sua eficácia avaliada em estudos em animais e em humanos (CAFFESSE et al., 1988; CAFFESSE et al., 1990). Para promover a regeneração óssea guiada, uma barreira física é essencial no processo de cicatrização natural do organismo. Afinal, quando ocorre lesão tecidual, a área ao redor é gradualmente preenchida por tecido fibroso e/ou tecido de granulação, impossibilitando o reparo por tecido original. Portanto, ao se inserir uma membrana junto à lesão, previne-se o crescimento de tecidos indesejáveis (TABATA, 2001). Segundo Buser (1996), barreira promove um ambiente adequado que permite ao organismo utilizar seu potencial de cicatrização natural de regenerar os tecidos perdidos e ausentes. Isto se deve à diferença entre as velocidades metabólicas do tecido epitelial e o osso (BUSER et al., 1996).

A área do defeito ósseo no qual é preenchida pelo coágulo sanguíneo e separada do tecido conjuntivo fibroso e do epitélio gengival, por uma barreira mecânica, tem a capacidade de formar um novo osso (BUSER et al., 1999).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a resposta tecidual relacionada aos mecanismos biológicos e osteocondutores do biomaterial sintético (HAP) e membranas biológicas, bem como a viabilidade de sua utilização.

3.2 Objetivos Específicos

Identificar, através da análise histológica, as áreas de tecido ósseo neoformado nos períodos experimentais de 28 e 45 dias, e comparar os resultados obtidos ao grupo coágulo. associadas ou não com a membrana biológica, na regeneração óssea em defeitos críticos em fíbulas de ratos.

Avaliar a eficácia de membranas biológicas como delimitador e estrutura de sustentação em reparo ósseo de defeitos críticos.

Avaliar a eficácia da associação de membranas biológicas e HAP no reparo e regeneração de fraturas críticas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A descrição dos materiais e métodos utilizados para a realização da pesquisa, bem como as análises selecionadas para a verificação dos resultados foram dispostas em tópicos no texto a seguir, com a finalidade de facilitar a compreensão e entendimento por parte do leitor.

4.1 MODELO EXPERIMENTAL

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG sob o número 015/2018 (ANEXO A). Para o presente trabalho foram utilizados 30 ratos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), machos, com peso de aproximadamente 300 gramas (Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas coletivas higienizadas, com 1 (um) animal por gaiola, em ambiente com temperatura entre 22 e 24°C, com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e com consumo de ração sólida e água *ad libitum* durante todo período experimental. Os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos experimentais, conforme o material a ser implantado, de 10 (dez) animais para cada grupo para análise histológica: Controle negativo coágulo (COA), com 10 animais; grupo tratado com membrana biológica de origem bovina (GenDerm® GENIUS - BAUMER) com 10 animais, grupo tratado com HAP (GenPhos® HA TCP GENIUS - BAUMER). Cinco animais de cada grupo serão eutanasiados após 28 dias e, os outros 5, serão eutanasiados após 45 dias do pós-operatórios. Os grupos estão descritos abaixo.

4.1.1 Grupos controles:

COA: coágulo: controle negativo;
5 animais eutanasiados após 28 dias;
5 animais eutanasiados após 45 dias.

4.1.2 Grupos experimentais:

HAP + Membrana biológica: hidroxiapatita nanométrica carbonatada e

membrana biológica:

5 animais eutanasiados após 28 dias;

5 animais eutanasiados após 45 dias.

Membrana: Membrana de Colágeno:

5 animais eutanasiados após 28 dias;

5 animais eutanasiados após 45 dias.

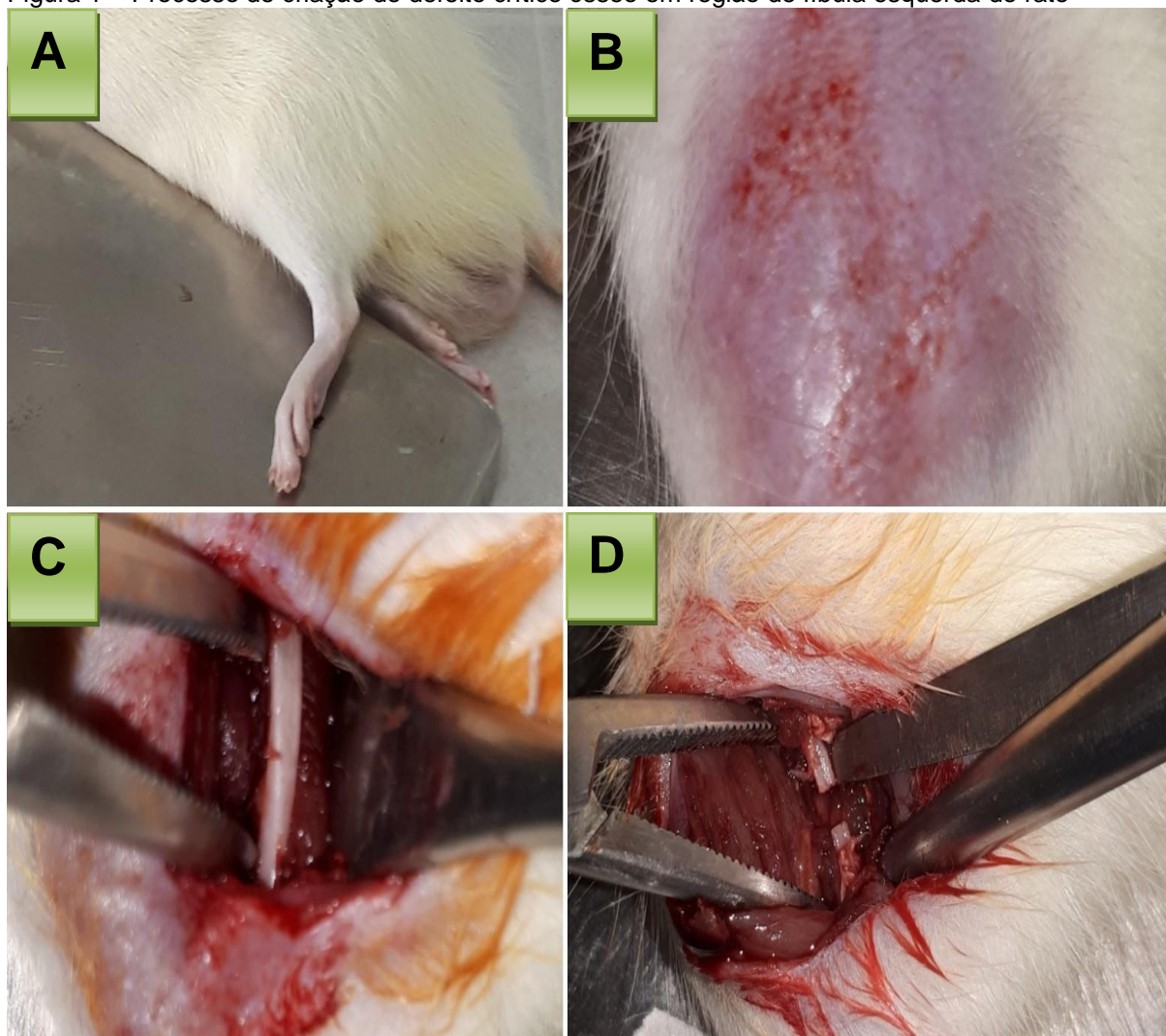
Neste trabalho foi usado o enxerto de hidroxiapatita GenPhos® HA TCP GENIUS produzida pela BAUMER S. A., Brasil. A GenPhos® HA TCP é uma cerâmica de fosfato de cálcio, de alta pureza, composta por Hidroxiapatita e β - Trifosfato de cálcio na proporção 70% - 30%. É reabsorvível e possui ação osteocondutora, não imunogênico, não pirogênicos e estáveis em fluido corpóreo, essas são as características descritas pelo fabricante. Foi utilizado também, a membrana biológica de origem bovina GenDerm® GENIUS produzida pela BAUMER S. A., Brasil. A GenDerm® é uma membrana de cortical óssea bovina reabsorvível, projetada para ser utilizada como barreira biológica impedindo a invaginação de tecidos moles para locais onde está ocorrendo remodelação óssea. Ela é porosa, acelular, biocompatível, não antigênica, com alto grau de pureza, isenta de contaminação por metais pesados. Essas são as características descritas pelo fabricante.

4.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos, inicialmente, os animais foram pesados e anestesiados por injeção intraperitoneal com associação de cloridrato de xilazina (6mg/kg) (Rompum®, Bayer, Brasil), solução sedativa e relaxante muscular, e cloridrato de quetamina (70mg/kg) (Dopalen®, Vetbrands, Brasil), solução anestésica. Após anestesia, os animais foram colocados em decúbito lateral e realizou-se a tricotomia com lâmina de bisturi n°15 em cabo de bisturi n°3, segurando o cabo em uma posição de 45° com movimento de raspagem em uma única direção na região anterolateral da perna esquerda dos animais (para cima de encontro ao corpo do animal) e antissepsia com polivinilpirrolidona-iodado (PVPI) a 10% com 1% de iodo ativo (Riodeine®, Rioquímica Ltda, São José do Rio Preto, SP, Brasil). Em seguida foi realizada uma incisão longitudinal, na pele da região anterolateral da perna

esquerda. A musculatura foi afastada com espátula nº7 e pinça Kelly – delicada 14cm | 5 ½” – curva, para expor a fíbula do rato. Usando-se de instrumentais cirúrgicos foi realizado um defeito ósseo como uma tesoura Ouro – reta, com a retirada de aproximadamente 20% do comprimento da fíbula (terço médio), equivalente a 4mm do terço médio da fíbula.

Figura 1 – Processo de criação do defeito crítico ósseo em região de fíbula esquerda do rato



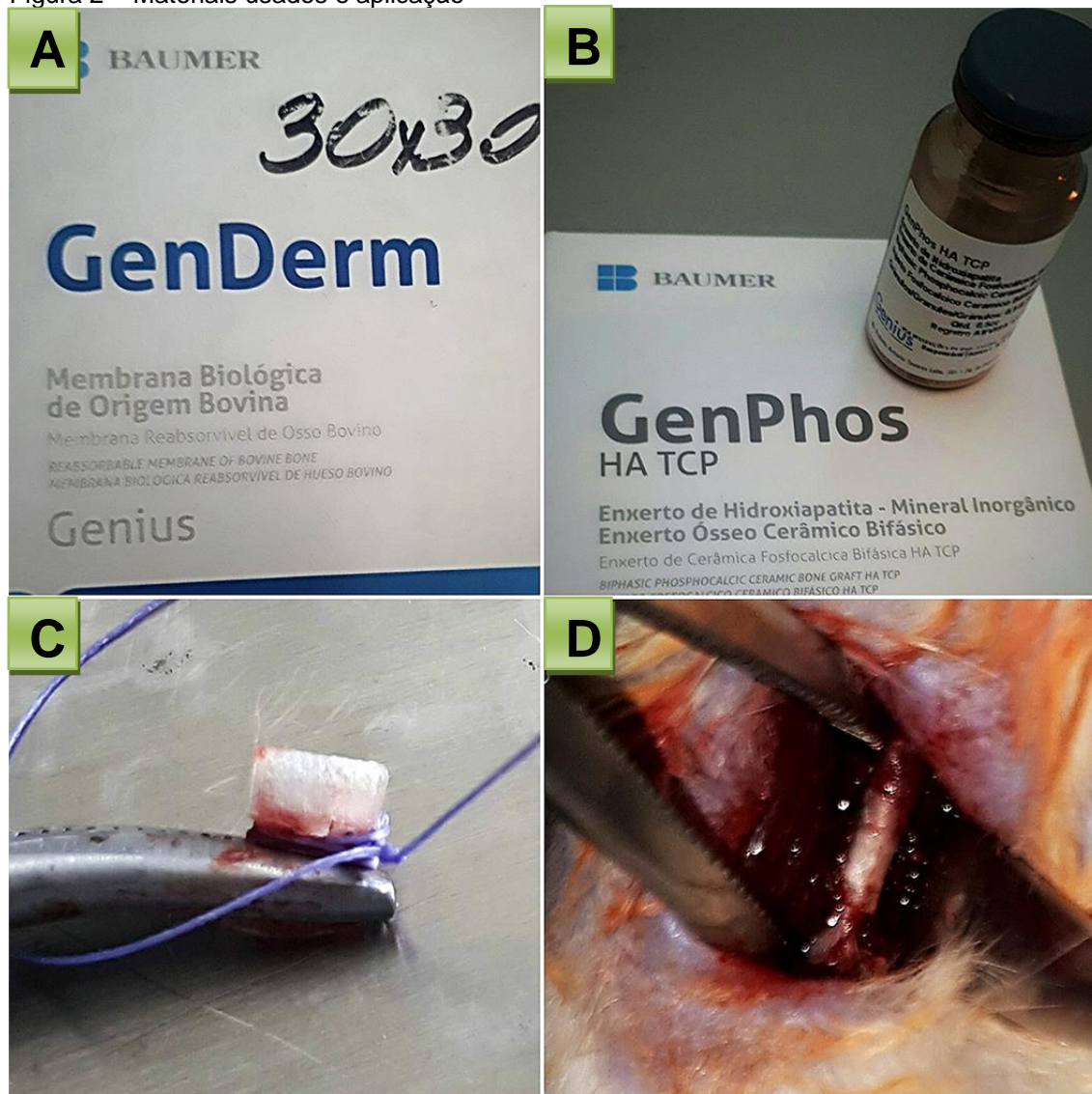
Fonte: Do autor.

Notas: A – Posicionamento da perna do rato; B – Tricotomia latero-lateral; C – Incisão retilínea divulsão dos tecidos circundantes e exposição da fíbula; D – Criação do defeito ósseo em fíbula com tesoura ouro, tamanho do defeito correspondente à 20% do tamanho total da fíbula (+/- 4mm).

Os defeitos ósseos críticos foram preenchidos com os materiais conforme os grupos. O grupo controle foi deixado sem preenchimento, de maneira a permitir a formação de um coágulo sanguíneo. membranas biológicas (nos grupos

experimentais) entre os extremos da fíbula, preenchidos com membranas apenas e com membrana e HAP.

Figura 2 – Materiais usados e aplicação



Fonte: Do autor.

Notas: A – Membrana biológica de origem bovina GenDerm®; B – Enxerto ósseo GenPhos® HA TCP; C – Peça de membrana biológica cortada em forma de cânula para aplicação em região de defeito ósseo; D – Membrana estabilizada entre o defeito ósseo crítico em fíbula de rato.

Todos os defeitos foram confeccionados com uma tesoura Ouro reta (Golgran®).

O grupo que recebeu membrana biológica, teve sua colocação em forma de cânula entre as extremidades superior e inferior do defeito confeccionado. As cânulas de membrana foram confeccionadas enrolando-as e, suturando-as para que elas pudessem se manter em forma de cânulas.

No grupo que recebeu enxerto de HA (GenPhos® - HA TCP) e membrana biológica, a hidroxiapatita foi colocada dentro da membrana em forma de cânula com auxílio de uma agulha hipodérmica 20G. Após completar a cânula de membrana biológica com HA, o conjunto foi colocado entre as extremidades superior e inferior do defeito ósseo crítico confeccionado.

O grupo coágulo teve a remoção da peça óssea através da tesoura Ouro (Golgran®) de aproximadamente 4mm e o fechamento da ferida apenas com o preenchimento de coágulo sanguíneo na região do defeito ósseo crítico. Os retalhos foram reposicionados e suturados com fio de nylon 4.0 (TECHNEW, Brasil). Após a cirurgia, os animais receberam uma dose única de penicilina G - benzatina (Pentabiótico Veterinário para animais de pequeno porte - Fort Dodge, Campinas, SP, Brasil), de 0,03ml via intramuscular. E uma dose analgésica de 0,5 ml de fosfato de codeína 20mg/Kg (ampola 30mg/2mL), por via intraperitoneal. As doses analgésicas foram administradas ao final do procedimento, e por mais 3 dias, de 24/24 horas (MARIANO et al., 2010).

O acompanhamento foi feito todos os dias na primeira semana do pós-operatório e de 15/15 dias, para avaliação clínica.

4.3 EUTANÁSIA

Em conformidade com o Manual de Eutanásia do Biotério Central da Unifal-MG, considerando a amostra de roedores, ratos wistar, a utilização de métodos humanitários para eutanásia visando o controle da dor e diminuição da ansiedade e stress, o método mais recomendável a ser utilizado é a sobredosagem de anestésicos. Será injetada uma quantidade excessiva de 4 mg xilazina 2% e 10 mg cetamina 10%, via intraperitoneal. Os animais foram eutanasiados no período de 28 e 45 dias pós-operatório.

4.4 PROCESSAMENTO DAS PEÇAS

As peças foram fixadas em paraformoldeído 4% (ph=7.2), por 24 horas e depois em álcool 70°, lavadas em água corrente e descalcificadas em solução de ácido etilenodiaminotetracético (E.D.T.A.) a 18% (Ludwig Biotecnologia LTDA, Alvorada, RS, Brasil). Para a obtenção da solução de EDTA 18%, foram utilizadas

250 gramas de pó de edta dissódico, misturadas a 1750 ml de água destilada, e 25 gramas de hidróxido de sódio para neutralizar o ph da solução (ph=7). A solução era trocada do frasco uma vez por semana. O material foi então descalcificado, até ser considerado próprio para microtomia, pelo teste de penetração da agulha. O teste consiste em utilizar uma agulha hipodérmica descartável – 22G e pressiona-la contra o material colido, se a agulha encontrar resistência o material não está suficientemente descalcificado, se a agulha penetrar no material colido superficialmente, o material se encontra descalcificado e pronto para dar sequência ao processo. Em seguida, processado em parafina. Os cortes foram realizados em micrótomo Leica com 6 micrômetros de espessura.

Os cortes foram corados pelas técnicas hematoxilina e eosina (HE) e outros cortes selecionados para coloração pelo método picrossírius para a análise microscópica.

4.5 EXAME RADIOGRÁFICO

Após a submissão a eutanásia e no intuito de analisar a possível regeneração óssea, foi realizado o exame radiográfico com filme periapical; tamanho de 31mm X 35mm; marca Carestream Dental, fabricado no E.U.A.

Os exames radiográficos foram feitos pelo aparelho RX GNATUS®, modelo XR6010 TOSHIBA – 60Kv – 10mAs – 60Hz. Todos os exames foram submetidos a tomadas de 0,7 segundos e distancia da fonte de radiação - receptor de 50 cm, angulação vertical de 90° e horizontal 0 (Sito o laboratório de histologia da Unifal-MG).

Com os exames radiográficos padronizados, foram obtidas imagens padrão para todos os grupos de acordo com as fig. 3 e 4

Figura 3 – Exame radiográfico inicial padronizado para todos os grupos.



Fonte: Do autor

Figura 4 – Exame radiográfico pós-cirúrgico para todos os grupos



Fonte: Do autor.

4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As imagens dos cortes histológicos foram capturadas por meio de uma câmera digital (AxioCam MRc 1.4 Mb - Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplada à um microscópio óptico binocular (Axio Lab - Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) com um aumento original de 200X e 400X (lente objetiva N - Achromat) e salvas em um computador.

Os cortes foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) para a análise microscópica.

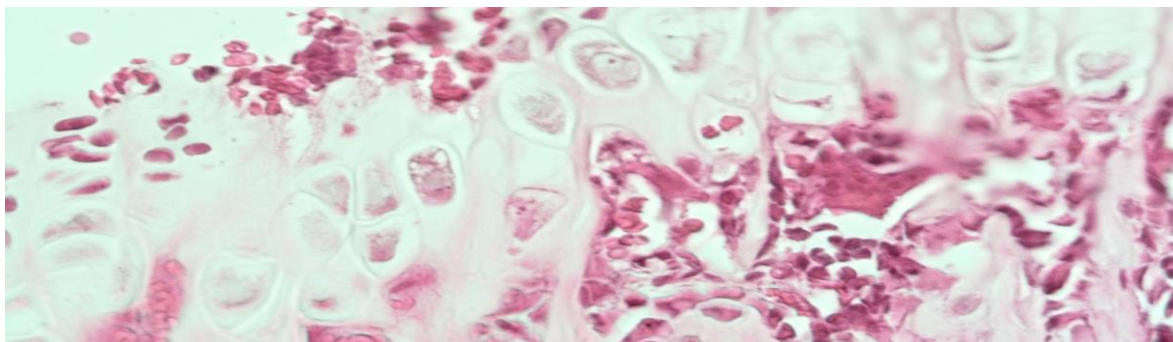
5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA QUALITATIVA

A análise histológica qualitativa foi realizada por meio da descrição das observações feitas nos cortes histológicos de cada grupo realizadas por um único avaliador.

5.1.1 Grupo Coágulo (COA):

Figura 5 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo COA no período experimental de 28 dias (aumento de 400X)



Fonte: Do autor.

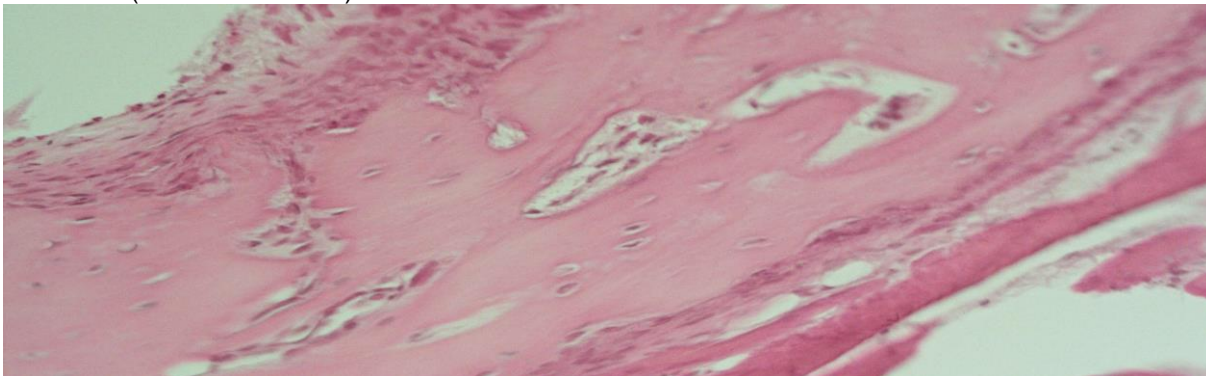
Notas: Células hipertrofiadas, em série, indicando proliferação celular compatíveis com tecido cartilaginoso que será substituído por tecido ósseo, em processo semelhante ao observado no crescimento longitudinal de ossos.

Figura 6 – Exame radiográfico no período de coleta, grupo COA, de 28 dias.



Fonte: Do autor.

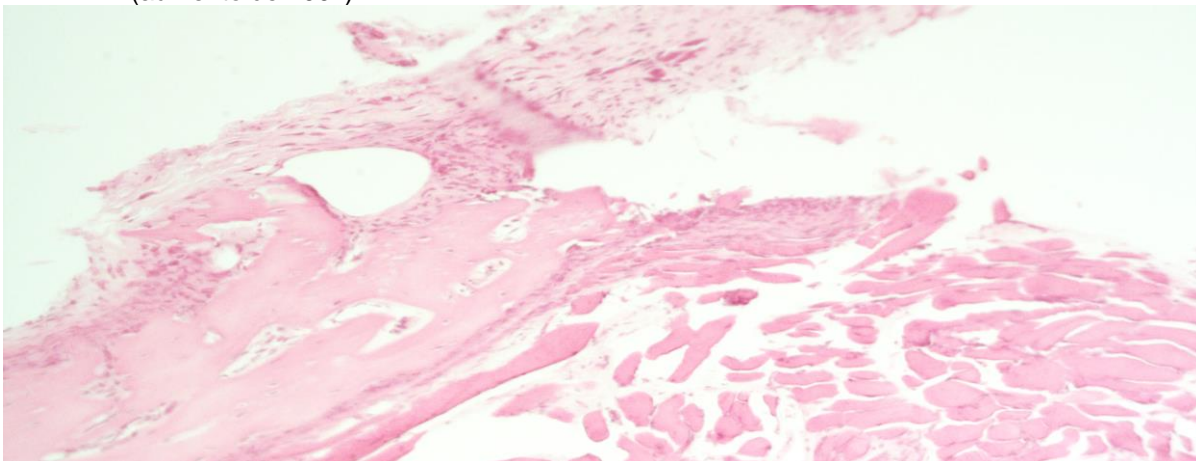
Figura 7 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo COA no período experimental de 45 dias (aumento de 200x)



Fonte: Do autor.

Notas: Tecido ósseo neoformado, presença de osteócitos e osteoblastos.

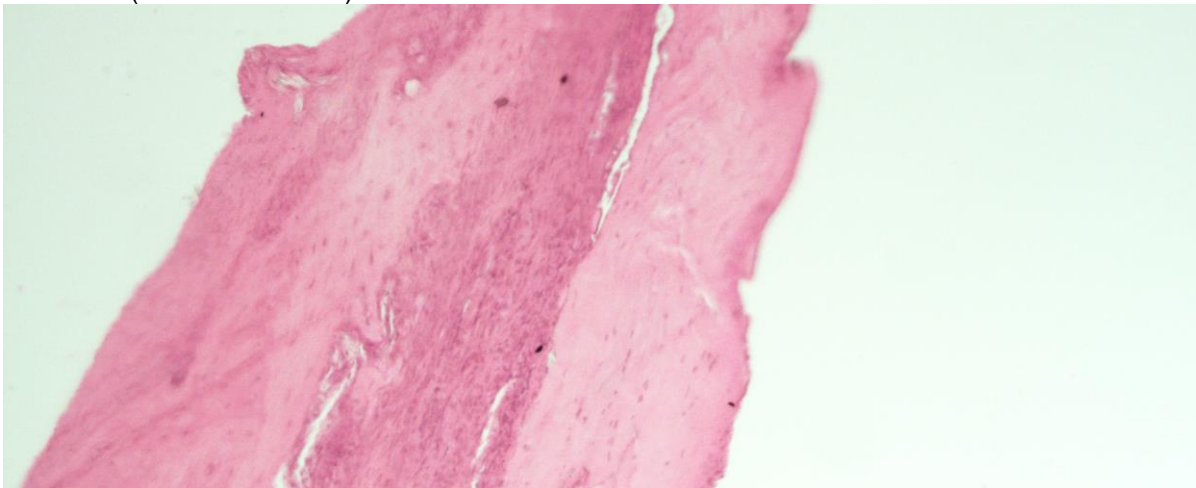
Figura 8 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo COA no período experimental de 45 dias (aumento de 100x)



Fonte: Do autor.

Notas: Tecido ósseo neoformado com osteócitos e osteoblastos. Presença também de fibras musculares no canto inferior direito.

Figura 9 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo COA no período experimental de 45 dias (aumento de 100x)



Fonte: Do autor.

Notas: Tecido ósseo neoformado, presença de osteócitos e osteoblastos.

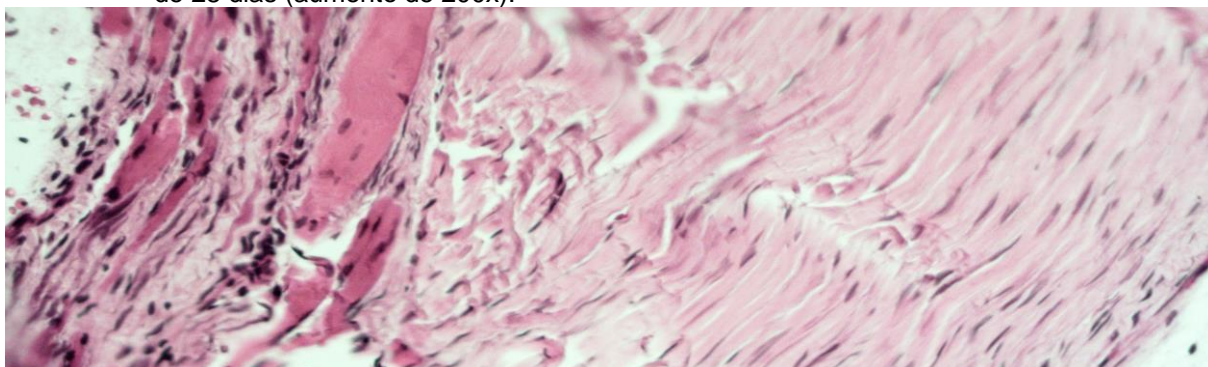
Figura 10 – Exame radiográfico em período de coleta; grupo coágulo de 45 dias.



Fonte: Do autor.

5.1.2 Grupo Membrana Biológica:

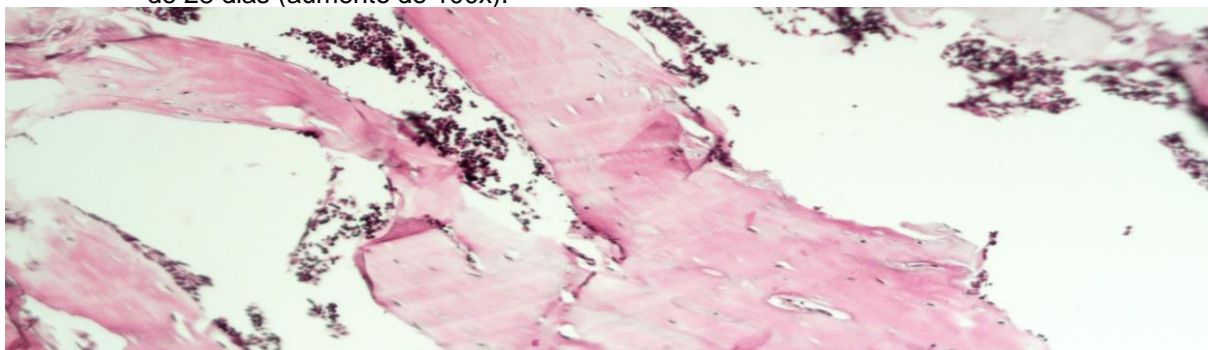
Figura 11 – Vista panorâmica do defeito ósseo do grupo Membrana Biológica no período experimental de 28 dias (aumento de 200x).



Fonte: Do autor.

Notas: Grande quantidade de fibras musculares e colágeno.

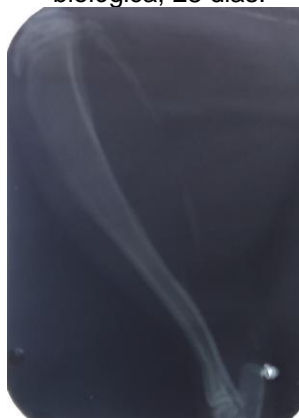
Figura 12 – Vista panorâmica do defeito ósseo do grupo Membrana Biológica no período experimental de 28 dias (aumento de 100x).



Fonte: Do autor.

Tecido ósseo neoformado, presença de osteócitos e osteoblastos.

Figura 13 – Exame radiográfico no período de coleta, grupo membrana biológica, 28 dias.



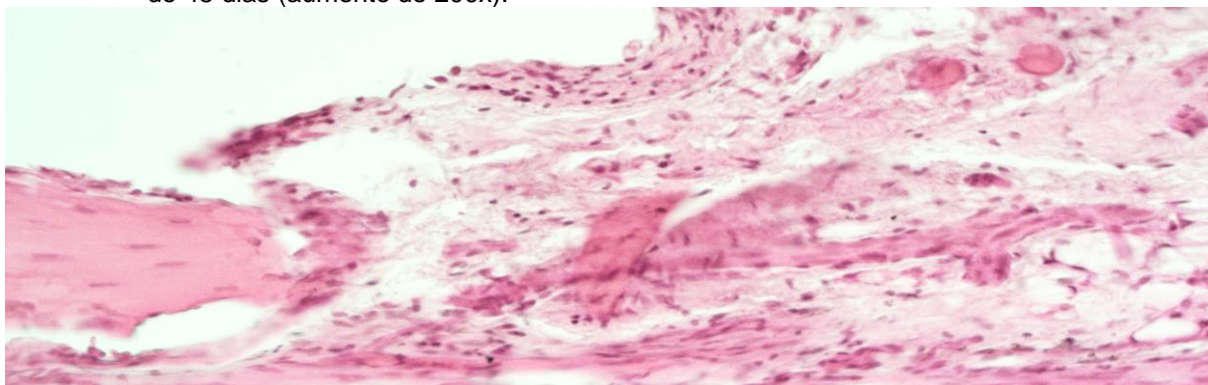
Fonte: Do autor

Figura 14 – Exame radiográfico no período de coleta, grupo membrana biológica, 28 dias.



Fonte: Do autor

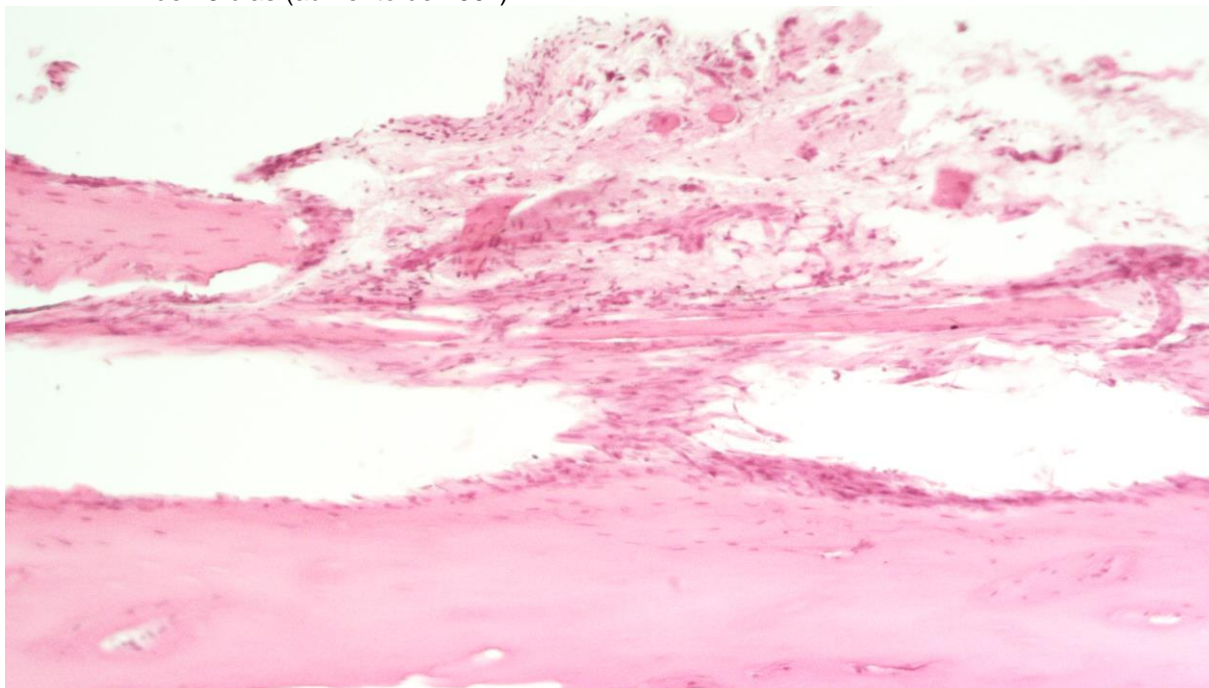
Figura 15 – Vista panorâmica do defeito ósseo do grupo Membrana Biológica no período experimental de 45 dias (aumento de 200x).



Fonte: Do autor.

Notas: Tecido ósseo neoformado, presença de osteócitos e osteoblastos no lado esquerdo da figura com poucas trabéculas ósseas. Grande quantidade de tecido conjuntivo frouxo e fibras colágenas.

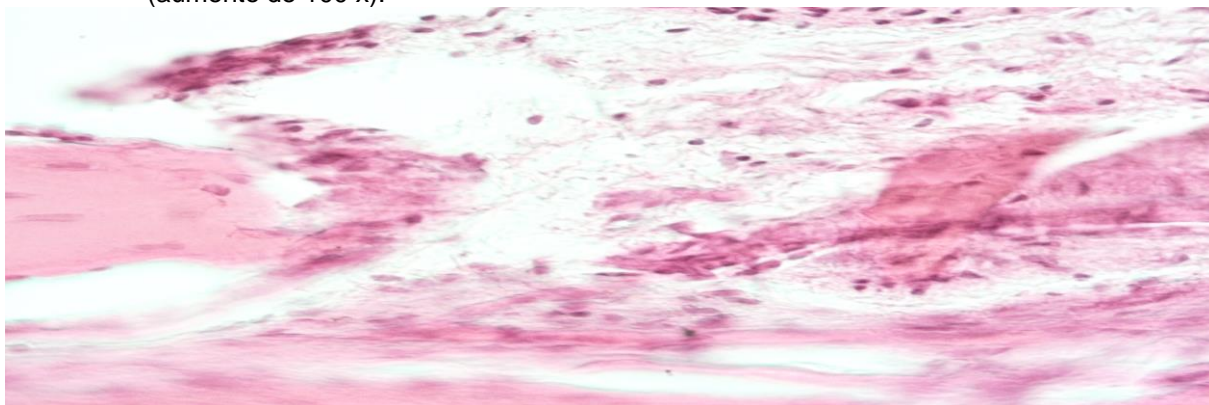
Figura 16 – Vista panorâmica do defeito ósseo do grupo Membrana Biológica no período experimental de 45 dias (aumento de 100x).



Fonte: Do autor.

Notas: Tecido ósseo neoformado, presença de osteócitos e osteoblastos no lado esquerdo da figura com poucas trabéculas ósseas. Grande quantidade de tecido conjuntivo frouxo e fibras colágenas.

Figura 17 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo COA no período experimental de 45 dias (aumento de 100 x).



Fonte: Do autor.

Notas: Tecido ósseo neoformado, presença de osteócitos e osteoblastos no lado esquerdo da figura com poucas trabéculas ósseas. Grande quantidade de tecido conjuntivo frouxo e fibras colágenas.

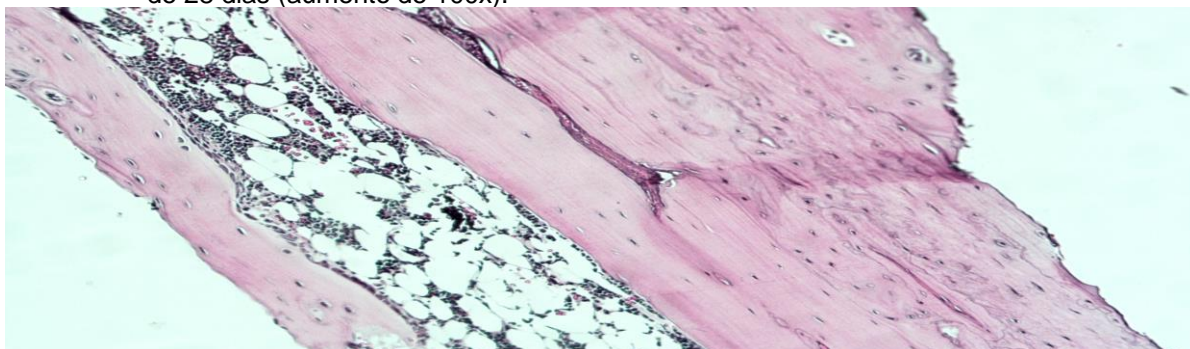
Figura 18 – Exame radiográfico no período de coleta, grupo Membrana Biológica de 45 dias.



Fonte: Do autor.

5.1.3 Grupo Hidroxiapatita associado com Membrana Biológica:

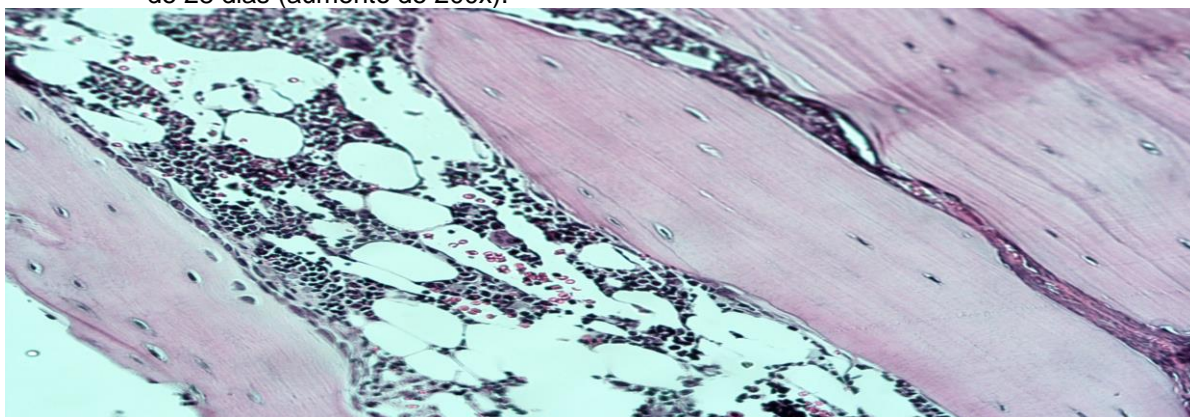
Figura 19 – Vista panorâmica do defeito ósseo do grupo Membrana Biológica GenDerm® GENIUS associada com Hidroxiapatita (HAP) GenPhos® HA TCP GENIUS no período experimental de 28 dias (aumento de 100x).



Fonte: Do autor.

Notas: Tecido ósseo neoformado, presença de osteoblastos e osteócitos.

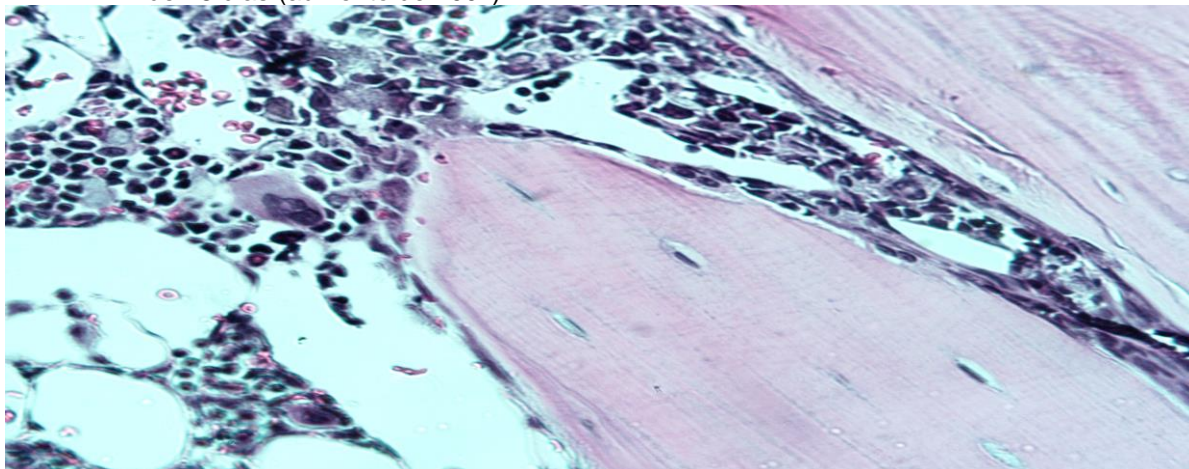
Figura 20 – Vista panorâmica do defeito ósseo do grupo Membrana Biológica GenDerm® GENIUS associada com Hidroxiapatita (HAP) GenPhos® HA TCP GENIUS no período experimental de 28 dias (aumento de 200x).



Fonte: Do autor

Notas: Tecido ósseo neoformado, osteoblastos e osteócitos. Presença de células inflamatórias e tecido hematopoiético.

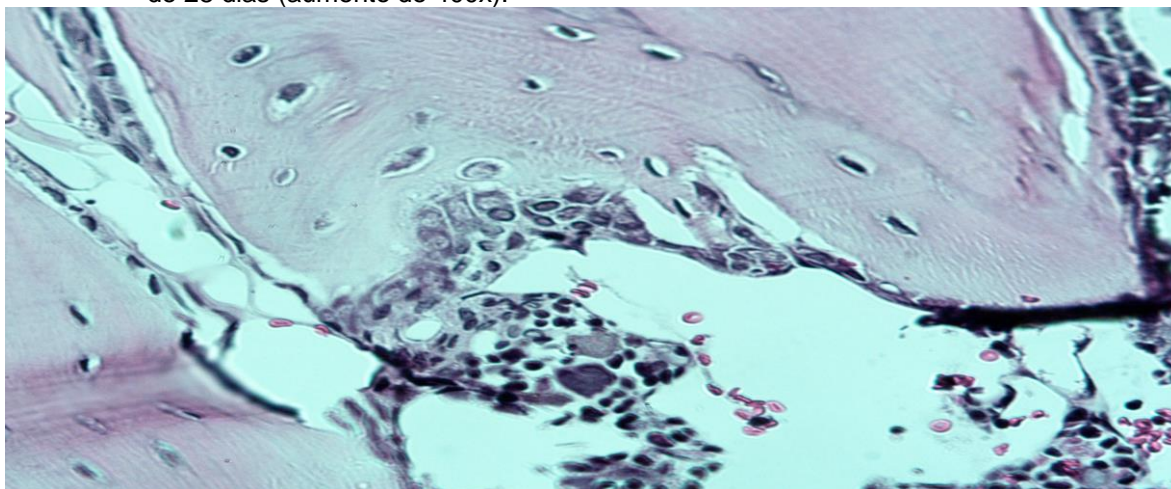
Figura 21 – Vista panorâmica do defeito ósseo do grupo Membrana Biológica GenDerm® GENIUS associada com Hidroxiapatita (HAP) GenPhos® HA TCP GENIUS no período experimental de 28 dias (aumento de 400x).



Fonte: Do autor.

Notas: Tecido ósseo neoformado, osteoblastos e osteócitos. Presença de células inflamatórias e tecido hematopoiético.

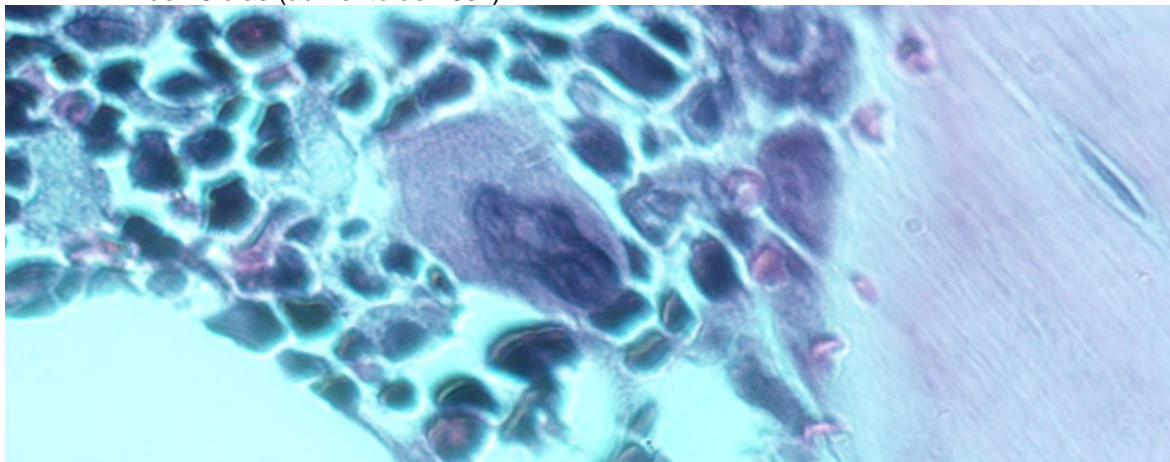
Figura 22 – Vista panorâmica do defeito ósseo do grupo Membrana Biológica GenDerm® GENIUS associada com Hidroxiapatita (HAP) GenPhos® HA TCP GENIUS no período experimental de 28 dias (aumento de 400x).



Fonte: Do autor.

Notas: Tecido ósseo neoformado, osteoblastos e osteócitos. Presença de células inflamatórias e tecido hematopoiético. Células hipertrofiadas, em série, indicando proliferação celular compatíveis com tecido cartilaginoso que será substituído por tecido ósseo, em processo semelhante ao observado no crescimento longitudinal de ossos.

Figura 23 – Vista panorâmica do defeito ósseo do grupo Membrana Biológica GenDerm® GENIUS associada com Hidroxiapatita (HAP) GenPhos® HA TCP GENIUS no período experimental de 28 dias (aumento de 400x).



Fonte: Do autor.

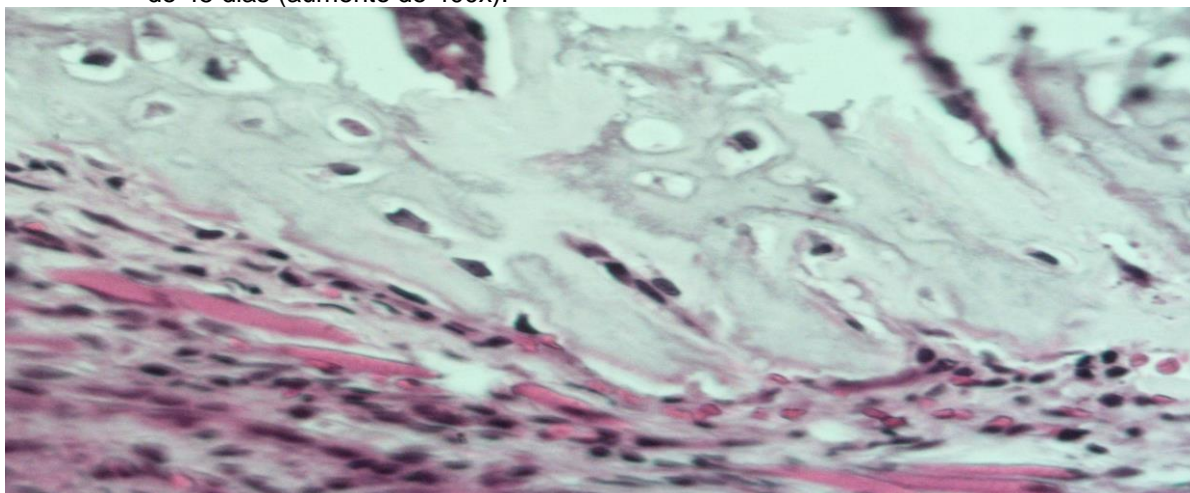
Notas: Tecido ósseo neoformado, osteoblastos e osteócitos. Presença de células inflamatórias e tecido hematopoiético. Megacariócito ao centro da figura.

Figura 24 – Exame radiográfico em período de coleta, grupo Hidroxiapatita GenPhos® HA TCP GENIUS em associação com Membrana Biológica GenDerm® GENIUS, 28 dias.



Fonte: Do autor.

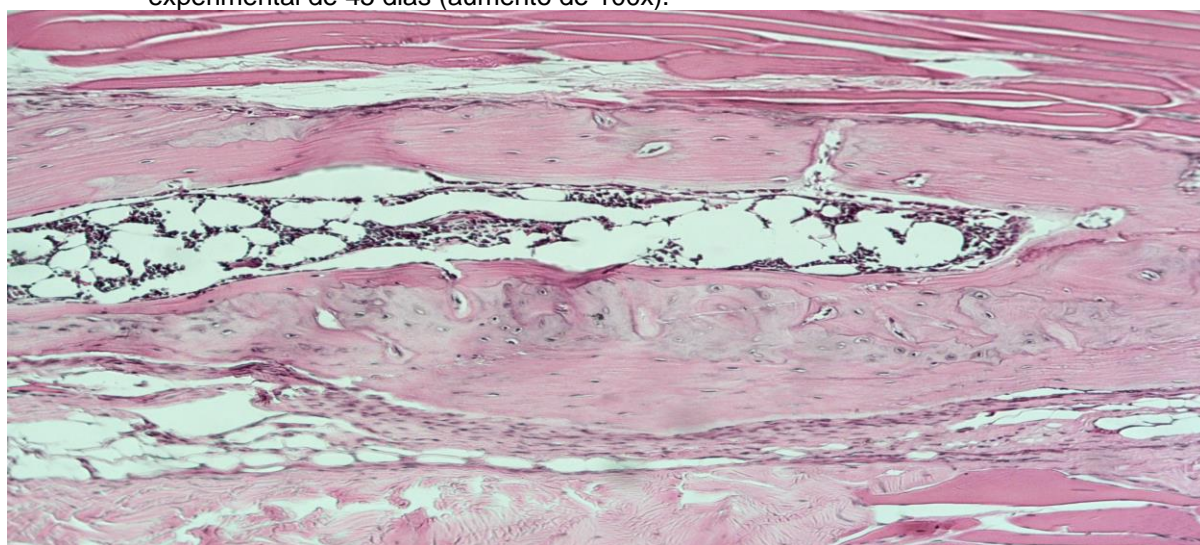
Figura 25 – Vista panorâmica do defeito ósseo do grupo Membrana Biológica GenDerm® GENIUS associada com Hidroxiapatita (HAP) GenPhos® HA TCP GENIUS no período experimental de 45 dias (aumento de 400x).



Fonte: Do autor.

Notas: Tecido ósseo neoformado, osteoblastos e osteócitos. Presença de células inflamatórias e fibras musculares.

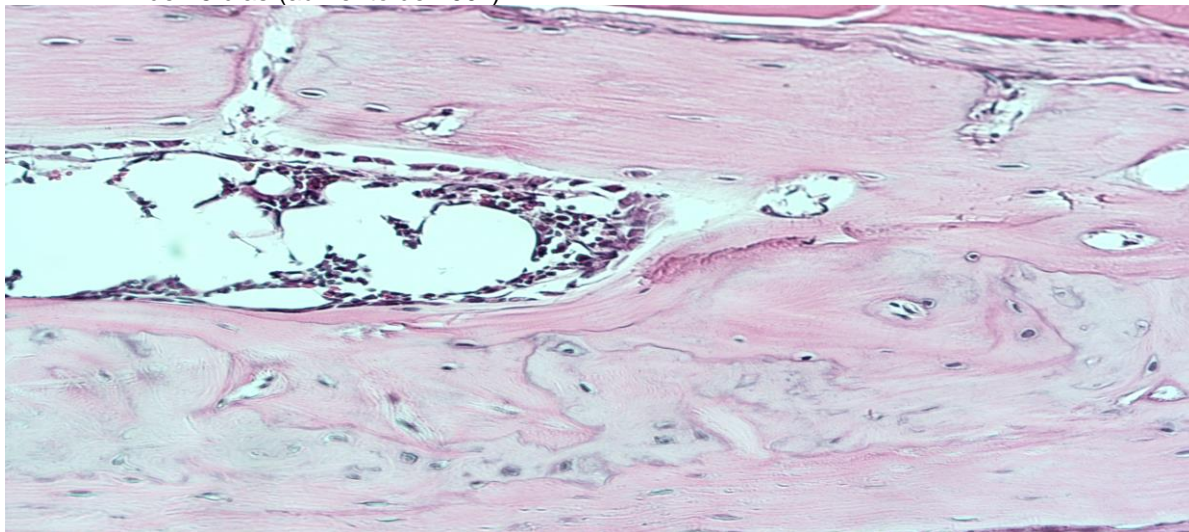
Figura 26 – Vista panorâmica do defeito ósseo do grupo Membrana Biológica GenDerm® GENIUS associada com Hidroxiapatita (HAP) GenPhos® HA TCP GENIUS no período experimental de 45 dias (aumento de 100x).



Fonte: Do autor.

Notas: Tecido ósseo neoformado, osteoblastos e osteócitos. Presença de células inflamatórias e tecido hematopoiético. Presença de fibras musculares esqueléticas na parte superior da imagem.

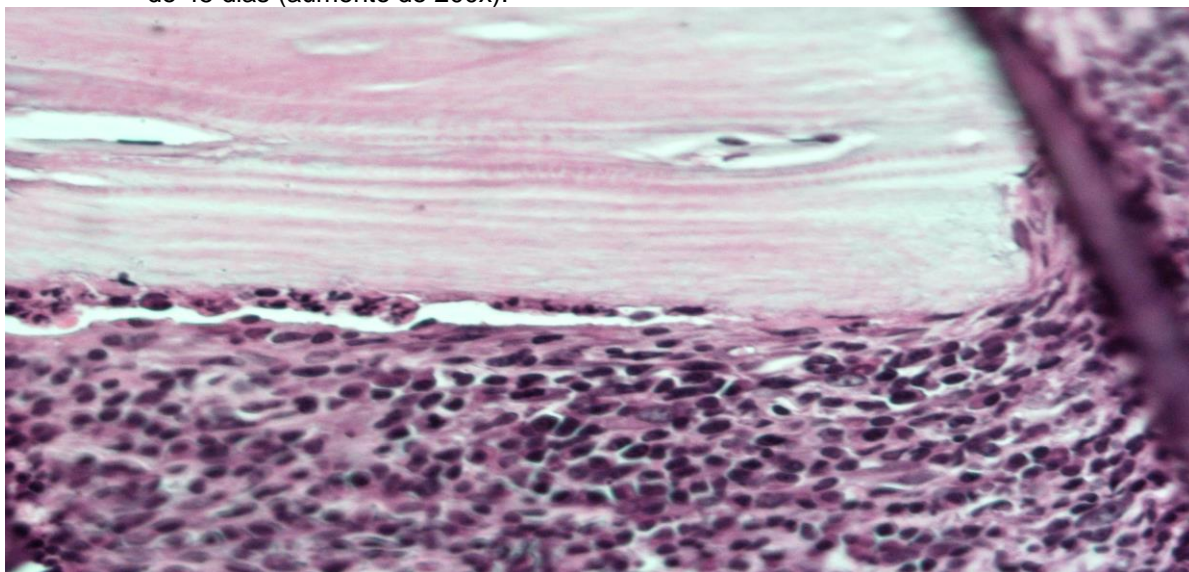
Figura 27 – Vista panorâmica do defeito ósseo do grupo Membrana Biológica GenDerm® GENIUS associada com Hidroxiapatita (HAP) GenPhos® HA TCP GENIUS no período experimental de 45 dias (aumento de 200x).



Fonte: Do autor.

Notas: Tecido ósseo neoformado com osteócitos e osteoblastos.

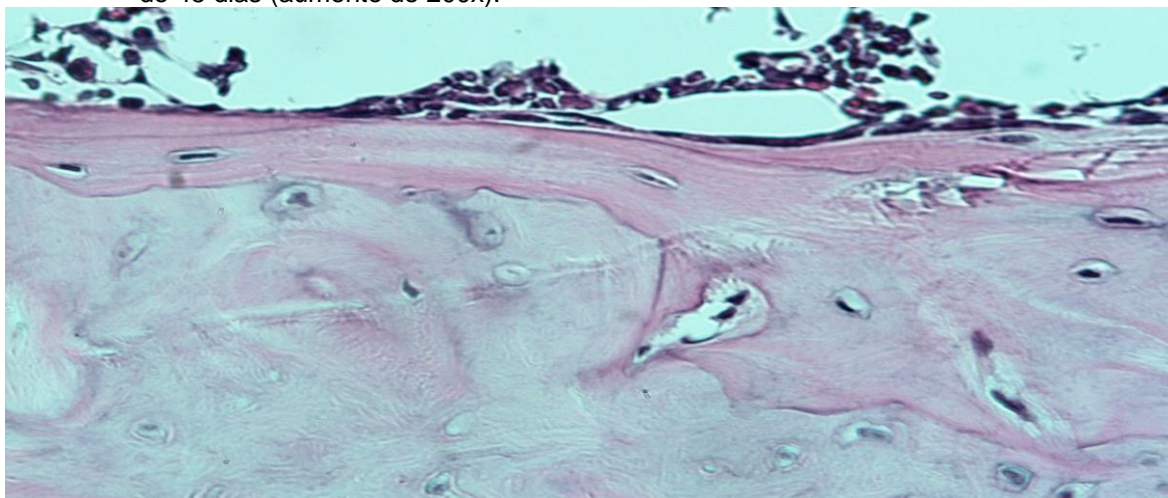
Figura 28 – Vista panorâmica do defeito ósseo do grupo Membrana Biológica GenDerm® GENIUS associada com Hidroxiapatita (HAP) GenPhos® HA TCP GENIUS no período experimental de 45 dias (aumento de 200x).



Fonte: Do autor.

Notas: Presença de tecido ósseo na região do reparo, circundado por aglomerado de células inflamatórias.

Figura 29 – Vista panorâmica do defeito ósseo do grupo Membrana Biológica GenDerm® GENIUS associada com Hidroxiapatita (HAP) GenPhos® HA TCP GENIUS no período experimental de 45 dias (aumento de 200x).



Fonte: Do autor.

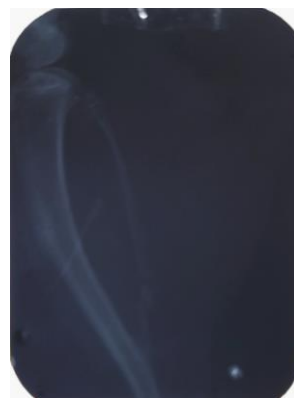
Notas: Presença de tecido ósseo ao longo de toda a região do reparo.

Figura 30 – Exame radiográfico em período de coleta, grupo Hidroxiapatita GenPhos® HA TCP GENIUS em associação com Membrana Biológica GenDerm® GENIUS, 45 dias.



Fonte: Do autor.

Figura 31 – Exame radiográfico em período de coleta, grupo Hidroxiapatita GenPhos® HA TCP GENIUS em associação com Membrana Biológica GenDerm® GENIUS, 45 dias.



Fonte: Do autor

Constata-se nas figuras 30 e 31 formação de estrutura óssea com volumes e formas diferentes, provavelmente resultante de deslocamento da membrana (figura 30) durante o processo de reparo ósseo. Na figura 31 o resultado da radiografia condiz com a imagem de tecido ósseo observado na figura 29.

6 DISCUSSÃO

A utilização de biomateriais data de antes das civilizações antigas. Nas múmias egípcias foram encontrados, olhos, orelhas, dentes e narizes artificiais. Chineses e indianos utilizaram ceras, colas e tecidos na reconstrução de partes perdidas ou defeituosas do corpo. Durante séculos o avanço dos materiais sintéticos, técnicas cirúrgicas e métodos de esterilização tem possibilitado o uso de biomateriais. Hoje em dia, a prática médica utiliza um grande número de dispositivos e implantes (RAMAKRISHNA, 2001).

Os biomateriais são materiais naturais ou sintéticos, que encontram aplicação em um vasto espectro de implantes médicos e dentários e próteses para reparo, aumento ou substituição de tecidos naturais. Esses materiais são utilizados na confecção de implantes, aparelhos ou sistemas que estarão em contato com sistemas biológicos e tecidos vivos com objetivo de reparar perdas teciduais e restaurar funções comprometidas por processos degenerativos ou traumatismos (HENCH, 2006).

As propriedades dos biomateriais dependem não somente da composição química e estrutura de suas fases, mas também do arranjo das mesmas. O arranjo ou microestrutura depende do processamento, matéria prima, relações de equilíbrio, cinética, etc. A microestrutura pode ser descrita por: número e tipo de fases, incluindo porosidade, distribuição de tamanhos, forma e orientação das fases e quantidades relativas de fases (WIESNER, et al., 2007).

Levantando considerações baseadas nas novas substâncias e novas tecnologias medicas atualmente usadas, Williams (2009) redefiniu a palavra biomaterial: "um biomaterial é uma substância que foi projetada para ter uma forma que, por si só ou como parte de um sistema complexo, é usado para dirigir, por controle das interações com os componentes de sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou de diagnostico, em humanos ou medicina veterinária" (WILLIAMS, 2009).

Assim, os biomateriais abrangem uma classe ampla de substâncias naturais ou sintéticas, com propriedades mecânicas, físicas e químicas adequadas para recuperação das funções originais dos tecidos, órgãos ou sistemas. Os materiais são divididos em metais e suas ligas, polímeros, compósitos e os materiais cerâmicos. Os materiais metálicos apresentam alta resistência mecânica a tração, ao impacto, a fadiga e ao desgaste, mas possuem algumas desvantagens exibindo baixa

biocompatibilidade, corrosão em meio fisiológico, alta densidade e diferença de propriedades mecânicas com relação aos tecidos. São aplicados em eletrodos, fios, placas, parafusos, cravos, grampos, pinos, implantes dentários, etc. Os materiais poliméricos são largamente empregados como biomateriais devido a facilidade de fabricação, baixa densidade e boa biocompatibilidade. No entanto, há restrições no emprego destes, pois apresentam baixa resistência mecânica, degradação dependente do tempo, dificuldade para estabilização.

Já os compósitos ainda constituem materiais pouco explorados cientificamente, mas sabe-se que exibem boa biocompatibilidade, inercia química, são resistentes a corrosão e a maioria deles possui alta resistência a tração. Os compósitos mais utilizados atualmente são o teflon-carbono, carbono-carbono e nylon-poliuretano que são empregados como cartilagens, na substituição de tecidos moles, em odontologia e ortopedia. Exemplos: HA/osso auto gênico, vidro cerâmico de superfície ativada/PMMA, vidro de superfície ativada/fibra metálica, PLA (poli (ácido láctico) / fibra de carbono), PLA/HA, PLA/fibra de vidro a base de fosfato de cálcio.

Os materiais cerâmicos abrangem uma grande variedade de substâncias naturais e sintéticas tais como vidro, porcelana, isolantes dielétricos, materiais magnéticos, os não metálicos, refratários para altas temperaturas, cimentos, cerâmica branca, esmaltes e muitas outras.

Apresentam elevado ponto de fusão, propriedades mecânicas tais como dureza, módulo de elasticidade e resistência a compressão que fazem da cerâmica um material em potencial para ser usado em aplicações estruturais e em várias aplicações que exigem alta dureza e resistência ao desgaste (BASU ; KALIN, 2011).

A descoberta por cientistas de que a fase mineral dos ossos e dentes consistia de sais de fosfato de cálcio motivou pesquisas sobre o uso desses sais obtidos em laboratório como material útil na consolidação de fraturas ósseas. Entretanto, somente quando foram desenvolvidas as técnicas de conformação de materiais cerâmicos, ao redor de 1960, é que a utilização dos fosfatos de cálcio como biomateriais foi consolidada.

O termo biocerâmica é um termo relativamente novo e não era conhecido até os anos 70. Entretanto muitas biocerâmicas não são materiais novos. Em 1972, um dentista brasileiro, Amadeo Bobbio, estudando fragmentos de uma mandíbula Maia com mais de 4000 anos, descoberta em 1931, constatou que alguns dentes tinham sido substituídos por um compósito de matriz cerâmica com 95 a 98% de carbonato e

2 a 5% de matéria orgânica composta por proteínas fibrosas. Em ortopedia o uso de biocerâmica de forma controlada começou no século 19 com a utilização do gipsum para preenchimento ósseo (CHEVALIER ; GREMILLARD, 2009).

Os materiais biocerâmicos destacam-se como biomateriais por demonstrarem melhor estabilidade química superficial e biocompatibilidade quando comparados a outros grupos de materiais empregados como implantes, apresentando também, dureza e boa resistência mecânica e alguns possuem composição que aceleram a proliferação de ossos (osteocondutores) (BOCH, 2007). As aplicações biomédicas principais para as cerâmicas se concentram mais nas áreas de ortopedia, odontologia e cardiologia (CAMPBELL, 2003).

As biocerâmicas são classificadas em subgrupos de acordo com sua reatividade no corpo humano:

- Quase inertes: alumina, carbono vítreo e zircônia (ZrO_2). Interação com o tecido: mecânica;

- Bioativas: hidroxiapatita (HA), vidros bioativos, vitrocerâmica bioativa. Interação com o tecido: ligação interfacial;

- Reabsorvíveis: fosfato tri cálcico (TCP), sulfato de cálcio, fosfato tris sódico. Interação com o tecido: substituição; Interação com o tecido: depende do material.

As biocerâmicas bioinerte e bioativas diferem na maneira de interagir com o tecido: na bioativa a fixação acontece através de uma ligação química com o tecido e na bioinerte, a ligação não se dá diretamente com o osso ocorrendo a formação de uma camada fibrosa (LEGEROS et. al., 2006).

As biocerâmicas são utilizadas na forma densa e porosa. A quantidade e distribuição de porosidade nos materiais cerâmicos influenciam fortemente a resistência, módulo de elasticidade, resistência a oxidação, resistência ao desgaste e outras propriedades importantes. Apesar do aumento da porosidade diminuir a resistência mecânica do material isoladamente, a existência de poros com dimensões adequadas pode favorecer o crescimento de tecido através deles, fazendo com que ocorra um forte entrelaçamento do tecido com o implante, aumentando, por conseguinte, a resistência do material *in vivo*. Na forma macroporosa, os implantes aceleram o processo de cura, já que permitem o crescimento progressivo de colágeno e seguinte mineralização de tecido ósseo através dos poros abertos e interconectados (ZAVAGLIA, 2003).

Entre as biocerâmicas merece destaque as hidroxiapatitas devido à similaridade química com a fase mineral dos tecidos ósseos, podemos considerá-la como um dos materiais mais biocompatíveis conhecidos, favorecendo o crescimento ósseo para os locais em que ela se encontra (osteocondutor), estabelecendo ligações de natureza química com o tecido ósseo, permitindo a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas, sendo que as células não distinguem entre a hidroxiapatita e a superfície óssea, o que indica a grande similaridade química superficial.

A hidroxiapatita é produzida por uma série de reações, complexas e demoradas, de síntese do carbonato de cálcio com o ácido fosfórico. Ao final dessas reações de síntese, se obtém as apatitas na forma de um pó, isto é, constituídas por um aglomerado de partículas em simples justaposição, mantidas juntas por ligações muito fracas (NAGEM, 2006).

Nossos achados permitem inferir que a HAP utilizada nesta pesquisa induziu aumento no volume ósseo neoformado e maior densidade óssea. Cremos que a associação de membrana e HAP testada pelo nosso grupo pode apresentar propriedade ósteo indutora já que o crescimento ósseo ocorreu numa patologia (defeito crítico). Para avaliar o desempenho de enxertos com a finalidade para regeneração óssea, os defeitos críticos são os mais indicados. Um defeito crítico é caracterizado por não ter a capacidade de se reconstituir sozinho em um dado período experimental.

Na análise histológica foram identificadas regiões de neoformação óssea nas bordas do defeito, em todos os grupos experimentais. No grupo coágulo, nos períodos de 28 e 45 dias, a neoformação foi bem discreta, iniciando-se nas bordas do remanescente ósseo em direção ao centro do defeito. Essas áreas de tecido neoformado estavam espalhadas por todo o defeito crítico, fato este que sugere um processo de reparo pelas propriedades osteogênicas e osteoindutoras do coágulo. A espessura do tecido neoformado é inferior à espessura original da fíbula. Em defeitos críticos esse tipo de neoformação é comum de ser observado nos grupos que não apresentam osteocondução adequada para guiar a angiogênese e recrutamento celular.

De um modo geral, os grupos coágulo (controle negativo) apresentam esse tipo de característica por não serem capazes de reparar o tecido ósseo se o defeito não for preenchido com algum tipo de enxerto. Amaral (2013) observou estes mesmos resultados quando comparou coágulo, tendão bovino, hidroxiapatita e Bio-oss®. Esse

autor demonstrou que os grupos coágulo e tendão bovino apresentaram discreta formação óssea em suas margens, tendo maior formação de tecido conjuntivo fibroso. Os grupos preenchidos pelas biocerâmicas apresentaram maior neoformação óssea e tecido mineralizado ao longo do defeito.

A área de osso neoformado observada no grupo tratado com HAP apresentou ilhas de neoformação espalhadas ao longo do defeito, principalmente no período experimental de 28 dias. A neoformação óssea com a presença dessas ilhas de neoformação ao longo do defeito pode indicar um potencial osteoindutor, como ocorre nos estudos em que se observa pontos de tecido neoformado no centro de defeito sem estarem associados às margens do osso remanescente (KIM et al., 2015; NOTODIHADRJO et al., 2012; PATEL et al., 2008; WANG et al., 2016a; XIE et al., 2017).

No grupo HAP ao fornecermos ao tecido receptor um biomaterial que mimetiza a estrutura óssea natural em sua composição química e forma, desencadeia-se uma resposta tecidual para que as células interpretem o biomaterial como um meio ósseo e o processo de remodelação óssea ocorra para que novo osso seja formado. No entanto, tratando-se um biomaterial cujo tamanho e forma estrutural se assemelha ao osso natural, a intenção é que seja fornecido um biomaterial que sirva como matéria-prima para iniciar o processo de regeneração óssea sem que antes necessite ser reabsorvido.

Silva et al. (2016) testaram o gel de doxiciclina em defeitos críticos de calvária. Os resultados mostraram resultados relevantes com a utilização da doxiciclina no veículo em gel de natrosol, que serviu como scaffold para garantir que a arquitetura e o espaço a ser preenchido por novo osso fosse garantido. Porém, para que a neoformação óssea ocorra gradativamente e se mantenha nos períodos experimentais mais tardios há a necessidade de se manter um arcabouço que garanta volume e preenchimento do defeito, sem que haja uma reabsorção rápida do enxerto.

Os concentrados plaquetários, como o L-PRF, também podem ser utilizados para aprimorar a resposta tecidual e servir como “*scaffold*” para materiais de ordem nanométrica (OLIVEIRA et al., 2015). O biomaterial Bio-oss® é um dos biomateriais mais utilizados para a regeneração óssea. Nos estudos em calvária de ratos, por ter suas partículas muito cristalinas, ele mantém a microarquitetura no local do enxerto para conduzir o processo de neoformação. Sua reabsorção é lenta, em alguns estudos clínicos, biópsias feitas após dez anos de enxerto apresentaram ainda resquícios do

biomaterial (SARTORI et al., 2003).

As nanopartículas de HAP são capazes de internalizar células mesenquimais e desencadear respostas moleculares para a diferenciação destas células. Sendo assim, a associação da membrana e HAP pode trazer resultados ainda mais satisfatórios para os períodos de cicatrização mais longos como os observados em defeitos críticos.

Supomos que a presença da membrana funcionou como uma barreira mecânica impedindo o povoamento da região lesada por células musculares e de outros tecidos que não fossem o ósseo, evitando assim a formação de pseudoartroses. Essa barreira também orientou todo o processo de reparo, impedindo que ele se estendesse para fora da região delimitada por membrana, de tal forma que nos animais testados nesse trabalho ocorresse apenas formação de tecido ósseo na região do reparo.

7 CONCLUSÃO

O nosso estudo concluiu que a HAP associada à membrana apresentou resultados biologicamente significativos para a neoformação óssea, por que fornecem um biomaterial que mimetiza a estrutura óssea natural em sua composição química e formato e a membrana por que cria uma estrutura de sustentação e delimitação da área de reparo e regeneração óssea.

Esses achados abrem novas perspectivas de tratamento em defeitos críticos que normalmente não se regeneram como estruturas anatômicas e histológicas funcionais.

REFERÊNCIAS

- ADORNATO, M.C.; MARCOS, I.; ROZANSKI, J. The treatment of biophosphonate-associated osteonecrosis of the jaws with bone resection and autologous platelet-derived growth factors. **The Journal of The American Dental Association**, v. 138, n. 7, p. 971-977, 2007.
- AMADEI, S. U.; PEREIRA, A. C.; CARVALHO, Y. R. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 1, p. 5–12, 2006.
- AMARAL, M. B. **Capacidade da regeneração óssea de biomateriais em defeito crítico de calvária: análise histológica e microtomografia computadorizada**. 2013, 110f. Tese (Doutorado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos/Instituto de Química de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- AMINZARE, M. et al. Hydroxyapatite nanocomposites: Synthesis, sintering and mechanical properties. **Ceramics International**, 2013.
- ANDRADE, F. A. C. et al. Preparation, characterization and antibacterial properties of silver nanoparticles-hydroxyapatite composites by a simple and eco-friendly method. **Ceramics International**, 2016.
- ANGHELINA, F.V. et. al. Fine structure analysis of biocompatible ceramic materials based hydroxyapatite and metallic biomaterials 316L. **Applied Surface Science**, Romania, v. 285, p. 65-71, 2013.
- AOKI, H. **Science and medical applications of hidroxiapatita**. Tokyo: Takayama Press System Center, 1991.

ARAÚJO, R. **Enxerto em seio maxilar com colocação simultânea de implante**. 2009. Monografia (Especialista em Implantodontia) - Instituto de Ciências da Saúde, FUNORTE/SOEBRÁS, Montes Claros, 2009.

ARANEGA, A. M.; GÁRCIA JÚNIOR, I. R. Enxerto ósseo em odontologia: revisão de literatura. **Innov Implant J, Biomater Esthet**, São Paulo, v. 5, n. 3, p. 48-52, set./dez. 2010

AZZAOUI, K. et al. Preparation and characterization of biodegradable nanocomposites derived from carboxymethyl cellulose and hydroxyapatite. **Carbohydrate Polymers**, v.167, p. 59–60, 2017.

BASHA, S.; KUMAR., T. S.; DOBLE, M. Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration. **Materials Science and Engineering: C.**, v.57, p .452-463,2015.

BASU, S.; KALIN, M. **Tribology of ceramics and composites: a materials science perspective**. Westerville: Wiley-American Ceramic Society,2011.

BOANINI, E.; GAZZANO, M.; BIGI, A. Ionic substitutions in calcium phosphate synthesized at low temperature. **Acta Biomaterialia**, v.6, n.6, p. 1882-1894, 2010.

BOCH, P.; NIEPCE, J. C. **Ceramics materials: processes, properties and applications**. London: ISTE, 2007.

BORNSTEIN, M. M.; BOSSHARDT, D.; BUSER, D. Effect of two different bioabsorbable collagen membranes on guided bone regeneration: a comparative histomorphometric study in the dog mandible. **J. periodontol.** v. 78, p. 1943-1953, 2007.

BUNYARATAVEJ, P.; WANG, H. L. Collagen membranes: a review. **Journal of Periodontology**, v.72, n.2, p. 215-219, Feb. 2001.

BUSER D., **20 anos de regeneração óssea guiada na implantodontia**. 2. ed. São Paulo: Quintessence, 2010.

BUSER, D.; DAHLIN, C.; SCHENK, R. K. **Regeneração óssea guiada na implantodontia**. São Paulo: Quintessense books, 1996.

BUSER, D. et. al. Belser UC. Localized ridge augmentation with autografts and barrier membranes. **Periodontology** 2000, v.19, p. 151-163, 1999.

CABRAL, T. S. **Enxerto para levantamento de seio maxilar**. 2014.
(Monografia: Especialista em Odontologia) - Instituto de Pós-Graduação, Campo Grande, 2014.

CARVALHO, P. S. P. de et al. Biomateriais aplicados a implantodontia. **Revista Implantnews**, v. 7, p. 56–65, 2010.

CAFFESSE, R.G. et. al. Furcation defects in dogs treated by guided tissue regeneration (GTR). **J Periodontol**, v. 61, n. 1, p. 45-50, Jan. 1990.

CAFFESSE R.G. et. al. New attachment achieved by guided tissue regeneration in beagle dogs. **J Clin Periodontol.**, v. 59; p. 589-594, 1988.

CAMPBELL, A. A. Bioceramics for implant coatings. **Materials Today.**, p. 26-30, 2003.

CHEN, L. et al. The role of surface charge on the uptake and biocompatibility of hydroxyapatite nanoparticles with osteoblast cells. **Nanotechnology**, v. 22, n. 10, 2011.

CHEVALIER, J.; GREMILLARD, L. Ceramics for Medical Applications: A Picture for the Next 20 Years. **Journal of the European Ceramic Society**, v.29, p. 1245-1255, 2009.

DINARVAND, P. et al. New approach to bone tissue engineering: Simultaneous application of hydroxyapatite and bioactive glass coated on a poly(L-lactic acid) scaffold. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 3, n. 11, p. 4518–4524, 2011.

FARDIN, A. C.; JARDIM, E. C. G.; PEREIRA, F. C. Enxerto ósseo em odontologia: revisão de literatura. **Innov. Implant J, Biomater Esthet**, v. 5, n. 3, p. 48–52, 2010.

FISHERO, B. A. et. al. Current concepts of bone tissue engineering for craniofacial bone defect. repair. **Craniomaxilofacial Trauma & Reconstruction**, v.8, n. 1, p. 23-30, 2015.

GARBIN, C. M. **Enxertos ósseos e regeneração tecidual guiada: noções básicas**. São Paulo: Pancast, 1994.

HAIDER, A. et al. Recent advances in the synthesis, functionalization and biomedical applications of hydroxyapatite: a review. **RSC Advances**, v. 7, n. 13, p. 7442–7458, 2017.

HALMODIA, S. et. al. Microstructure, mechanical properties, and in vitro biocompatibility of spark plasma sintered hydroxyapatite–aluminum oxide–carbon nanotube composite. **Materials Science & Engineering C**, v. 30, p. 1162-1169, 2010.

HAYAKAWA, S. et. al. Heterogeneous structure and in vitro degradation behavior of wet-chemically derived nanocrystalline silicon-containing hydroxyapatite particles. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 1, p. 4856-4867, 2013.

HELMUS, M. N.; TWEDEN; K., Materials selection. In: WISE, D. L. **Encyclopedia handbook of biomaterials and bioengineering**. [S.l]: Marcel Dekker, 1995. v. 2, part a, p. 1429-1463.

HENCH, L. L. The story of bioglass. **J Mater Sci Mater Med.**, v. 17, n. 11, p. 967-978, 2006.

HENCH, L. L. Biomateriais: Uma introdução. In: ORÉFICE R. L.; MAGALHÃES, M. M.; MANSUR, H. S., (Ed). **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. p. 1-7.

HOLLINGER, J.; WONG, M. E. K. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 82, n. 6, p. 594–606, dez. 1996.

HUTMACHER, D.; HÜRZELER, M.B.; SCHIEPHAKE, H. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 11, n. 5, p. 667-678, 1996.

IBRAHIM, M. Z. et al. Biomedical materials and techniques to improve the tribological, mechanical and biomedical properties of orthopedic implants – A review article. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 714, p. 636–667, Jan., 2017.

IAMAGUTI, L.S.; BRANDÃO, C.V.S. Uso de membrana biossintética a base de celulose na regeneração tecidual guiada. **Semina Ciênc. Agrar.**, v. 28, n. 4, p. 701-708, 2007.

JAMARILLO, C. D. et. al. Osteoconductive and osseointegration properties of a comercial hydroxyapatite compared to a synthetic product. **Revista Colombiana Ciências Pecuárias**, v. 23, p. 471-483, 2010.

JOLY J, BAZAN D, MARTORELLI A. Clinical and radiographic evaluation of periodontal intrabony defects treated with GTR: A pilot study. **J. periodontol.**, v. 73, p. 353-354, 2002.

JUNG, C. G. In: **Psychology and Education**. Princeton: Princeton University Press, 1969. p. 53–122.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008. p. 108-126.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. Cap.8 p. 134.

KASAJ S. et. al. *In vitro* evaluation of various bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration. **Head & Face Medicine**, n. 14, p. 4-22, 2008.

KAUR, B. et. al. Biomineralization of hydroxyapatite in silver ion-exchanged nanocrystalline ZSM-5 zeolite using simulated body fluid. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 135, p. 201-8, 2015.

KAWACHI, E. Y. et.al. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 518-522, 2000.

KIM, H. J. et. al. Efficacy of rhBMP-2 / hydroxyapatite on sinus floor augmentation: a multicenter, randomized controlled clinical trial. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 9, p. 158-165, 2015

LALA, S. et al. Structural and microstructural characterizations of nanocrystalline hydroxyapatite synthesized by mechanical alloying. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 5, p. 2891-2898, 2013.

LAZARIDES, A. et.al. Custom facial reconstruction for osteosarcoma of the jaw. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 72, n. 11, p. 2375. e1-10, 2014.

LEGEROS, R. Z.; DACULSI, G.; JOHN, P. Orthopedic biology and medicine: musculoskeletal tissue regeneration, biological materials and methods. In: PIETRZAK, W.S. (Ed.). **Bioactive bioceramics**. Totowa: Humana Press, 2006. Chap. 8, p. 153-178.

LEKOVIC V, CAMARGO PM, WEINLAENDER M, KENNEY EB, VASILIC N. Combination use of bovine porous bone mineral, enamel matrix proteins, and a bioabsorbable membrane in intrabony periodontal defects in humans. **J. Periodontol.**, v, 72, n. 5, p. 583-589, 2001.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. **Periodontologia clínica e implantologia odontológica**. 5. ed. São Paulo: Médica Panamericana, 2010.

LOO, S. C.J. et. al. Biomedical applications of hydroxyapatite nanoparticles. **Pharmaceutical Biotechnology**, v. 11, p. 333-343, 2010.

MCNAMARA, S. L. et. al. Silk as bioadhesive sacrificial binder in the fabrication of hydroxyapatite load bearing scaffolds. **Biomaterials**, v. 35, n. 25, p. 6941-6953, 2014.

MACEDO, L. M. Guided bone regeneration with subperiosteal implants of PTFE and hydroxyapatite physical barriers in rats. **Braz. Dent. J.**, v. 14, n. 2, 2003.

MANCARDI, G.; TERRANOVA, U.; LEEUW, N. H. G. de. Calcium phosphate prenucleation complexes in water by means of ab initio molecular dynamics simulations. **Crystal Growth & Design**, United Kingdom, v. 16, p. 3353–3358, 2016.

MANDAL, B.B. et. al. High-strength silk protein scaffolds for bone repair. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 20, p. 7699-7704, 2012.

MARIANO, R. et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in the calvaria of diabetic rat. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, n.109, p. 72–78, 2010.

MARTINS, J. V. et. al. Principais biomateriais utilizados em cirurgia de levantamento de seio maxilar: abordagem clínica. **Revista de Odontologia de Araçatuba**, v. 31, n. 2, p. 22-30, 2010.

MASAEI, R. et al. Efficacy of the biomaterials 3 wt%-nanostronium-hydroxyapatite-enhanced calcium phosphate cement (nanoSr-CPC) and nanoSr-CPC-incorporated simvastatin-loaded poly (lactic- co -glycolic-acid) microspheres in osteogenesis improvement: An explorative multi-ph. **Materials Science and Engineering: C**, v. 69, p. 171–183, Dez., 2016.

MAVROPOULOS, E. et. al. “The impact of the RGD peptide on osteoblast adhesion and spreading on zinc-substituted hydroxyapatite surface”. **J. Mater. Sci. – Mater. Med.**, v. 24, n. 5, p. 1271-1283, 2013.

MELKE, J. et. al. Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 31, p. 1-16, 2016.

MISCH, C. E.; BIDEZ, M. W. Enxertos ósseos e Biomateriais. In: MISCH, C. E. **Implantes dentários contemporâneos**. São Paulo: Santos, 2000. 839 p. Cap. 12.

MISCH, C.E.; BIDEZ, M.W. Enxertos ósseos e Biomateriais. In: MISCH, C.E. **Implantes dentários contemporâneos**. São Paulo: Santos; 2008. Cap. 12.

NAGASSE Y. et. al. Avaliação retrospectiva de artrodese cervical com enxerto autólogo versus hidroxiapatita. **Coluna/Columna**, v. 9, n. 4, p. 440-444, 2010.

NAJJAR, T. A.; KAHN, D. Comparative study of healing and remodeling in various bones. **Journal of Oral Surgery**, v. 35, n. 5, p. 375–379, Mai. 1977.

NOTODIHARDJO, F. Z. et al. Bone regeneration with BMP-2 and hydroxyapatite in critical-size calvarial defects in rats. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, v. 40, p. 287-291, 2012.

PARRISH, L.C. et al. Non-bioabsorbable vs. bioabsorbable membrane: assessment of their clinical efficacy in guided tissue regeneration technique. A systematic review. **J Oral Sci.**, v. 5, p. 383-400, 2009.

PATEL, Z. S. et. al. Dual Delivery of an Angiogenic and an Osteogenic Growth Factor for Bone Regeneration in a Critical Size Defect Model. **Bone**, v. 43, n. 5, p. 931-940, 2008.

PELEGRINE, A. A.; MACEDO, L. G. S.; COSMO, L. A. M. **Transplantes Ósseos na Odontologia. Aplicabilidade clínica e evidências científicas sobre o uso de tecidos provenientes de Banco de Ossos**. Nova Odessa: Napoleão, 2009. 274p.

PEREIRA, M. A. et. al. Nanometric hydroxyapatite use in grafts of rat's fibula. **Ciência et Praxis**, v. 7, n. 11, 2013.

PEREIRA, M. M. Conceitos básicos de ciência dos materiais. In: Oréfice, R. L., MAGALHÃES, M. M.; MANSUR, H. S. (Ed). **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. p. 13-37.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v. 38, p. 957–971, 2015.

PONTORIERO R. et. al. Guided tissue regeneration in the treatment of furcation defects in mandibular molars. **J Clin Periodontol**, v. 16, p. 170-174, 1889.

PRAKASAM, M. et. al. Fabrication, properties and applications of dense hydroxyapatite: a review. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 6, n. 4, p. 1099 -1140, 2015

RAMAKRISHNA, R. S. et. al. Biomedical applications of Polymer-composite materials: a review. **Composites Science and Technology**, v. 61, p. 1189-1224, 2001.

RUSSO, L. et. al. Carbonate hydroxyapatite functionalization: a comparative study towards (bio)molecules fixation. **Interface Focus**, v. 4, n. 1, p. 20130040-20130040, 2013.

SANCHES, J. F. **Biomateriais substitutos ósseos na implantodontia**. 2010. Monografia (Especialista em implantodontia) - Fundação Universitária do Norte, Manaus/AM, 2010.

SARAIVA, G.L.; CASTRO, M.L.; Marcadores Bioquímicos da Remodelação Óssea na Prática Clínica. **Arq. Bras. Endocrinol Metab**, São Paulo, v. 46, n. 1, fev., 2002.

SARTORI, S. et. al. Ten-year follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (Bi-Oss). A case report with histomorphometric evaluation. **Clinical Oral Implants Research**, v. 14, n. 3, p. 369-372, 2003

SCHMITZ, J.P.; HOLLINGER, J.O. The critical size defect as an experimental

model for craniomandibulofacial nonunions. **Clin Orthop Relat Res.**, v. 205, p. 299-308, 1986.

SHIMOMURA, K. et. al. Scaffold-free tissue engineering for injured joint surface restoration . **Journal of Experimental Orthopaedics.**, v. 5, 2018.

SHOJAI, S. M. et al. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. **Acta Biomaterialia**, 2013.

SILVA, A. C. et. al. Effect of doxycycline in gel form in regeneration bone: histomorphometric and tomographic study in rats calvary. **J. Periodontol**, v. 87, p. 74-82, 2016.

SOARES, M. V. R. **Biomateriais Utilizados Na Prática Odontológica: Uma Revisão De Literatura**. 2015. 49p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

SPICER, P. P. et. al. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvaria defect. **Nature Protocols**, v. 7, n. 10, p. 1918-1929, 2012.

SZCZES, A.; HOLYSZ, L.; CHIBOWSKI, E. Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications, **Advances in Colloid and Interface Science**, 2017.

TABATA, Y. Recent progress in tissue engineering. **Drug Discov. Today**, v. 6, n. 1, p. 483-487, 2001.

VARMA H. K. et. al. In vitro calcium phosphate growth over functionalized cotton fiber. **J. Master Sci Mater Med.**, v. 10, n. 7, p. 395-400, 1999.

VERT, M.; LI, S.; GARREAU, H. New insights on the degradation of bioresorbable polymeric devices based on lactic and glycolic acids. **Clin Mater**, v. 10, n. 1-2, p. 3-8, Jan. 1992.

ZAHEDI, S.; BOZON, C.; BRUNEL G. A 2-year clinical evaluation of a diphenylphosphorylazide cross linked collagen membrane for the treatment of buccal gingival recession. **Journal of Periodontology**, v. 69, p. 975-981, 1998.

ZAVAGLIA, A. C. **Curso de introdução em cerâmicas**. Campinas: Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2003. Apostila de biocerâmicas.

ZILM, M.; THOMSON, S. D.; WEI, M. A comparative study of the sintering behavior of pure and manganese-substituted hydroxyapatite. **Materials**, v. 8, n. 9, p. 6419–6436, 2015.

WANG, D. et al. Bone regeneration in critical-sized bone defect enhanced by introducing osteoinductivity to biphasic calcium phosphate granules. **Clinical Oral Implants Research**, v. 28, n. 3, p. 251–260, 2016a.

WANG, W.; YEUNG, K. W. K. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: a review, **Bioactive Materials**, 2017.

WIESNER, M. R.; BOTTERO, J. Y. **Environmental nanotechnology – applications and impacts of nanomaterials**. New York: McGraw Hill, 2007.



WILLIAMS, D.F. **In definitions in biomaterials**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 66-71.

WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, n. 30, p. 5897 – 5909, 2009.

XIAO-MAN, L.; WEBSTER, S. S. J. "Integrated bone tissue anatomy and physiology". In: LIU, Yao-Zhong; DENG, Hong-Wen (Ed.). **Current Topics on Bone Biology**. [S.l.]: World Scientific, 2005. p. 11-21.

XIE, C. et. al. Graphene oxide nanolayers as nanoparticle anchors on biomaterial surfaces with nanostructures and charge balance for bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research – Part A Applied**, p. 2-43, 2017.

ANEXO A – Certificado de aprovação do CEUA:

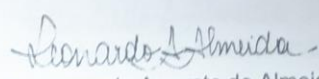
	MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063	
	Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL	

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação histológica da carbopatita manométrica como substituto ósseo em defeitos críticos em fíbulas de ratos", registrada com o nº 15/2018, sob a responsabilidade de Tomaz Henrique Araújo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino	<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 28/05/2018 a 08/03/2019	
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico	
Nº de animais	75	
Sexo	Machos	
Origem	Biotério Central da UNIFAL	

Alfenas, 28 de Maio de 2018.


 Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
 Coordenador do CEUA/UNIFAL-MG