CYRO EDUARDO DE CARVALHO OTTONI

**Avaliação histomorfométrica da neoformação
óssea de enxertos de fosfato de cálcio amorfo
e de hidroxiapatita em alvéolos dentais de ratos**

São Paulo
2015

CYRO EDUARDO DE CARVALHO OTTONI

Avaliação histomorfométrica da neoformação óssea de enxertos de fosfato de cálcio amorfo e de hidroxiapatita em alvéolos dentais de ratos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Matsuyoshi Mori

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3205
FMVZ

Otoni, Cyro Eduardo de Carvalho

Avaliação histomorfométrica da neoformação óssea de enxertos de fosfato de cálcio amorfo e de hidroxiapatita em alvéolos dentais de ratos / Cyro Eduardo de Carvalho Otoni. -- 2015.
100 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Matsuyoshi Mori.

1. Fosfato de cálcio amorfo. 2. Hidroxiapatita. 3. Reparação alveolar. 4. Neoformação óssea.
5. Enxerto ósseo. 6. Ratos. I. Título.

Parecer da Comissão de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Avaliação histomorfométrica da neoformação de enxertos de fosfato de cálcio amorfo e de hidroxiapatita em alvéolos dentais de ratos”, protocolado sob o nº 2363/2011, utilizando 42 (quarenta e dois) ratos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Matsuyoshi Mori, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no Uso de Animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/8/2011.

São Paulo, 7 de agosto de 2015.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: OTTONI, Cyro Eduardo de Carvalho

Título: Avaliação histomorfométrica da neoformação óssea de enxertos de fosfato de cálcio amorfo e de hidroxiapatita em alvéolos dentais de ratos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____.

Instituição: _____ Julgamento:_____.

Prof. Dr. _____.

Instituição: _____ Julgamento:_____.

Prof. Dr. _____.

Instituição: _____ Julgamento:_____.

Prof. Dr. _____.

Instituição: _____ Julgamento:_____.

Prof. Dr. _____.

Instituição: _____ Julgamento:_____.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às duas pessoas que entraram na minha vida já no andamento deste estudo se tornando a verdadeira razão da minha vida e a força motriz de minhas metas e projetos.

Que me fizeram repensar meu passado e meu futuro.

Que me fizeram voltar a acreditar em mim mesmo.

À mulher que esteve ao meu lado durante todo esse tempo, me aturando e me dando suporte. Que se apresentou como realidade numa pessoa que eu só tinha na imaginação e nos meus sonhos.

Ao “meninão” que tomou seu lugar no meu coração, na minha vida e que tenho comigo como se fosse meu...

Alcione e Yago, meus grandes amores...

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Matsuyoshi Mori, Professor do Departamento de Prótese Dentária da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pela sua confiança, orientação, disponibilidade e apoio. Abraçou minha causa de olhos fechados.

Ao Prof. Dr. Renato Paulo Chopard, Professor Livre-Docente do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, meu eterno orientador... Um exemplo de cientista, de professor e de homem. Muito mais do que um amigo ou um espelho.

Ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo que me acolheu para a realização deste projeto.

À Comissão de Pós-graduação do Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ-USP e a todos seus professores, na pessoa do seu coordenador Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior.

Aos Professores Francisco J. C. BRAGA e Antonio C. Silva (AC) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, desenvolvedores do produto utilizado neste trabalho. Pela confiança, disponibilização dos materiais de enxertia e pelo apoio científico numa área que não me era de domínio.

Ao Laboratório de Biologia Celular e Anatomia Funcional do ICB III-USP, na pessoa da Prof^a Dr^a Maria Luiza M. B. Chaves, pela sempre pronta atenção e pela permissão de uso do seu espaço e de seus equipamentos.

À Universidade Ibirapuera, na pessoa de seu Diretor Acadêmico Prof. Alan Almario, pela amizade, compreensão e disponibilidade.

À Profª Drª Mariana Matera Veras, pesquisadora científica do Hospital das Clínicas da FM-USP pela sua disponibilidade e atenção quando precisei de seus esclarecimentos técnicos.

À Marta Maria da Silva Rigueti, técnica de laboratório do Departamento de Anatomia do ICBIII-USP, pela presteza e paciência no auxílio ao processamento das amostras.

A todos os funcionários do Departamento Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ-USP responsáveis pelo perfeito funcionamento daquela Instituição. Em especial aos técnicos André, “Índio” e a secretária Jaqueline. Sempre prestimosos nos meus pedidos de ajuda e esclarecimentos.

À minha família e amigos que entenderam e souberam conviver com as ausências durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

À Alcione Freire da Cruz e ao Yago Ronaldo dos Santos. Porque simplesmente são o que são. Tudo para mim.

RESUMO

OTTONI, C. E. C. **Avaliação histomorfométrica da neoformação óssea de enxertos de fosfato de cálcio amorfo e de hidroxiapatita em alvéolos dentais de ratos.** [Histomorphometric evaluation of bone formation of amorphous calcium phosphate and hydroxyapatite grafts in dental alveoli of rats]. 2015. 100f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Apesar do caráter cada vez mais preventivo, a Odontologia ainda lida com a realidade terapêutica de reabilitação de uma população cujo mais grave problema de saúde bucal é a ausência dental. A implantodontia apareceu como uma opção para essas reabilitações, porém, não raro, se vê diante de reabsorções ósseas que inviabilizam a instalação direta de implantes. A utilização de enxertos ósseos é o grande recurso para essas áreas. Os enxertos autógenos são uma excelente opção, mas vêm acompanhados de alguns inconvenientes como maior morbidade e risco de infecção, maior tempo de recuperação e maior custo. Esses dificultadores têm contribuído para o desenvolvimento de materiais alternativos. Um desses materiais é o fosfato de cálcio amorfo (FCA), cuja forma cristalina é a hidroxiapatita (HA). Nesse estudo utilizou-se de uma inédita apresentação do mesmo, em forma filamentosa, para avaliar a neoformação óssea na reparação alveolar. A hidroxiapatita em grânulos foi utilizada como referência comparativa. Foram utilizados 44 animais da espécie *Rattus Novergicus albinus*, linhagem Wistar, machos e adultos. Estes foram submetidos à exodontia do incisivo superior cuja loja alveolar foi imediatamente preenchida com um biomaterial, a saber: FCA, HA e FCAHA (mistura de 50%-50% de cada um deles). Ao término de 28 dias foram sacrificados e seus alvéolos analisados em microscopia de luz convencional quantificando a formação de coágulo, a neoformação óssea, a deposição de tecido osteóide e a presença de vasos no tecido de reparação. As células típicas do tecido ósseo se mostraram presentes. Osteoblastos e osteoclastos na superfície das trabéculas e profusão de fibroblastos no tecido ósseo imaturo, ocupando os espaços intertrabeculares. A deposição de tecido osteóide e de tecido ósseo neoformado apresentou-se em todos os grupos, porém com diferenças em relação à sua distribuição. O grupo controle apresentou reparação óssea compatível com o clássico descrito em literatura, ou seja, de maneira centrípeta. Também foi evidenciada a presença de um coágulo central ou paracentral em relação ao alvéolo. No grupo FCA a quantidade de tecido ósseo neoformado era mais evidente do que nos demais. Já no grupo HA a presença dos cristais sugeriu uma concorrência espacial com a formação tecidual. No grupo FCAHA a deposição tecidual mostrou-se nitidamente irregular. Nos grupos onde foi utilizado o FCA a

deposição de tecido ósseo neoformado foi superior àqueles onde esse biomaterial não estava presente. Nosso estudo sugere que o FCA tem uma característica osteoindutora mais evidente do que a HA. Justifica-se por, dentro do período estudado, verificar-se o maior depósito de tecido neoformado e a menor quantidade de tecido osteóide quando os comparamos com os outros grupos. Concluimos que o FCA apresentado na forma de filamentos comportou-se *in vivo* com características comparáveis a de outros materiais biocompatíveis, mostrando boa resposta osteoindutora, e uma reparação e neoformação mais rápida que a da HA.

Palavras-chave: Fosfato de cálcio amorfo. Hidroxiapatita. Reparação alveolar. Neoformação óssea. Enxerto ósseo. Ratos.

ABSTRACT

OTTONI, C. E. C. **Histomorphometric evaluation of bone formation of amorphous calcium phosphate and hydroxyapatite grafts in dental alveoli of rats.** [Avaliação histomorfométrica da neoformação óssea de enxertos de fosfato de cálcio amorfo e de hidroxiapatita em alvéolos dentais de ratos]. 2015. 100f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Despite its increasingly preventive character, dentistry also deals with the reality of therapeutic rehabilitation of a population whose most serious oral health problem is dental absence. Dental implant appeared as an option for these rehabilitations, however, often, is faced with bone resorption that prevents direct implant placement. The use of bone grafts is a great resource for those areas. Autogenous grafts are an excellent option, but comes accompanied by some drawbacks as higher morbidity and risk of infection, longer recovery time and higher cost. These have contributed to hindering the development of alternative materials. One such material is amorphous calcium phosphate (ACP), which is the crystalline form hydroxyapatite (HA). In this study, we used an unprecedented presentation of the same in filamentous form, to evaluate new bone formation in the alveolar repair. The hydroxyapatite granules were used as a comparative reference. 44 animals were used species *Rattus Norvegicus Albinus*, Wistar, adult males. These were subjected to extraction of the upper incisor whose cellular store was immediately filled with a biomaterial, namely: ACP, and ACPHA (mixture of 50% -50% of each). At the end of 28 days they were sacrificed and their alveoli analyzed by conventional light microscopy quantifying clot formation, bone formation, deposition of osteoid tissue and the presence of vessels in tissue repair. The cells typical of bone tissue showed present. Osteoblasts and osteoclasts on the surface of trabecular and profusion of fibroblasts in the immature bone tissue, occupying the intertrabecular spaces. The deposition of osteoid tissue and newly formed bone appeared in all groups, but with differences regarding their distribution. The control group exhibited bone repair compatible with the classic described in the literature, centripetal manner. In addition, it revealed the presence of a central clot or para in relation to the alveolus. ACP group in the amount of newly formed bone was more evident than in others. Already in the HA group the presence of crystals suggested a space competition with tissue formation. The group ACPHA tissue deposition was shown to be clearly irregular. In groups which was used ACP deposition of newly formed bone was higher than those where this biomaterial were not present. Our study suggests that the ACP has clearer osteoinductive characteristic of the HA. Justified by, within the study period, check it

the largest deposit of newly formed tissue and the least amount of osteoid tissue when compared with the other groups. We conclude that the ACP presented in the form of filaments behaved in vivo comparable characteristics of other biocompatible materials, showing good osteoinductive response, a faster repair and neogenesis the HA.

Keywords: Amorphous calcium phosphate. Hydroxyapatite. Alveolar repair. Boneformation. Bone grafting. Rat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.2.1 -	Fosfato de Cálcio Amorfo.....	44
Figura 4.2.2 -	Hidroxiapatita LUMINA-BONE.....	44
Figura 4.2.2.1 -	Fibras de Fosfato de Cálcio Amorfo.....	46
Figura 4.2.2.2 -	Fibras de FCA fraturadas.....	47
Figura 4.2.2.3 -	Fibras de FCA após ensaio de imersão em SBF por 7 dias e mantido a 37°C.....	48
Fig. 4.2.2.4 -	Fibras de FCA após ensaio de imersão em SBF.....	49
Fig. 4.2.2.5 -	Fibras de ACP após ensaio de imersão em água destilada por 7 dias a 37°C.....	50
Fig. 4.2.2.6 -	Difratograma do Lumina-ACP®.....	51
Fig. 4.2.2.7 -	Citotoxicidade do Lumina-ACP®.....	52
Figura 4.4.1 -	Esculpidor Hollembach.....	53
Figura 4.4.2 -	Fórceps de número 44.....	54
Figura 4.4.3 -	Condensador modelo Paiva nº4.....	54
Figura 4.4.4	Incisivo superior Direito de um Rato Wistar adulto.....	55
Figura 4.4.5 -	Tomadas radiográficas do crânio de um animal do grupo Controle após sua eutanásia e dissecação.....	56
Figura 4.4.6 -	Condensador de Paiva nº 4 modificado pelo autor.....	56
Figura 4.9.1 -	Coleta e redução das amostras.....	60
Figura 4.10.1 -	Lavagem das amostras.....	61
Figura 4.12.1 -	Reprodução do Gradil utilizado na histomorfometria.....	65
Figura 4.12.2 -	Fotomicrografia com a sobreposição do gradil.....	65
Figura 5.1.1 -	Aparência do loco cirúrgico aos 28 dias de pós-operatório.....	66
Figura 5.3.1 -	Aspecto macroscópico de uma das amostras.....	71
Figura 5.4.1.1 -	Aspecto geral os alvéolos do grupo Controle.....	73
Figura 5.4.1.2 -	Aspecto geral os alvéolos do grupo CT.....	74
Figura 5.4.2.1 -	Aspecto geral da distribuição tecidual nos alvéolos do grupo FCA....	75
Figura 5.4.3.1 -	Aspecto geral da distribuição tecidual nos alvéolos do grupo HÁ.....	76
Figura 5.4.4.1 -	Aspecto geral da distribuição tecidual nos alvéolos do grupo FCAHA.....	78

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.2.1 - Variação de massa corpórea por grupo de animais.....	70
Gráfico 5.6.1.1 - Área ocupada por coágulo (Coa) em relação à área total do alvéolo....	82
Área ocupada por osso neoformado (ONf) em relação à área total do	
Gráfico 5.6.2.1 - alvéolo.....	83
Área ocupada por tecido osteóide (Ost) em relação à área total do	
Gráfico 5.6.3.1 - alvéolo.....	85
Gráfico 5.6.4.1 - Área ocupada por vasos (Vas) em relação à área total do alvéolo.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.2.1 -	Variação de massa corpórea por grupo de animais.....	70
Tabela 5.5.1 -	Médias por grupo dos resultados de cada estrutura estudada.....	81
Tabela 5.6.1.1 -	Distribuição do coágulo sanguíneo (Coa) em cada grupo.....	82
Tabela 5.6.1.2 -	Comparação duas a duas das médias obtidas na aparição de coágulo sanguíneo (Coa).....	82
Tabela 5.6.2.1 -	Distribuição de osso neoformado (ONf) em cada grupo.....	83
Tabela 5.6.2.2 -	Comparação duas a duas das médias obtidas para Osso Neoformado (ONf).....	84
Tabela 5.6.3.1 -	Distribuição de tecido osteóide (Ost) em cada grupo.....	84
Tabela 5.6.3.2 -	Comparação duas a duas das médias obtidas para tecido Osteóide (Ost)....	85
Tabela 5.6.4.1 -	Distribuição de vasos (Vas) em cada grupo.....	86
Tabela 5.6.4.2 -	Comparação duas a duas das médias obtidas aparição de Vasos (Vas).....	86

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1.1 - Grupos, identificação e número de animais utilizados no experimento.....	43
Quadro 4.2.1 - Porcentagem de biomaterial utilizado no preenchimento da loja alveolar.....	43
Quadro 4.10.1 - Série de álcoois para desidratação.....	62
Quadro 4.10.2 - Série de álcoois para reidratação.....	63

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1	O TECIDO ÓSSEO.....	23
2.2	A REPARAÇÃO TECIDUAL.....	24
2.3	OS BIOMATERIAIS.....	27
2.4	O USO DOS ENXERTOS.....	39
3	OBJETIVOS.....	41
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
4	MATERIAL E METÓDOS.....	42
4.1	ANIMAIS.....	42
4.2	MATERIAIS DE ENXERTIA.....	42
4.2.1	Caracterização industrial e comercial do FCA.....	44
4.2.2	Caracterização estrutural e química do FCA.....	45
4.3	ANESTESIA.....	52
4.4	INSTRUMENTAL CIR[URGICO.....	53
4.5	TÉCNICA CIRÚRGICA.....	57
4.5.1	Protocolo cirúrgico.....	57
4.6	MEDICAÇÃO PÓS-OPERATÓRIA.....	58
4.7	CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS.....	59
4.8	EUTANÁSIA.....	59
4.9	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	60
4.10	PROCESSAMENTO DO MATERIAL.....	61
4.10.1	Preparo do Laminário.....	61
4.10.2	Coloração por Hematoxilina-Eosina (HE).....	63
4.11	ANÁLISE HISTOLÓGICA E FOTOMICROGRAFIAS.....	64
4.12	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	64
4.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	67
5	RESULTADOS.....	68
5.1	OBSERVAÇÕES EXPERIMENTAIS.....	68/
5.2	EVOLUÇÃO DE MASSA CORPÓREA.....	69
5.3	ASPECTOS MACROSCÓPICOS DAS AMOSTRAS.....	71
5.4	ANÁLISE DO GRUPO CONTROLE.....	72
5.4.1	Análise do grupo Controle.....	72
5.4.2	Análise do grupo FCA.....	75
5.4.3	Análise do grupo HÁ.....	76
5.4.4	Análise do grupo FCAHA.....	77
5.4.5	Análise qualitativa entre os grupos.....	79
5.5	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRIA.....	79

5.5.1	Dados obtidos para prevalência do Coágulo (Coa).....	79
5.5.2	Dados obtidos para prevalência do Osso Neoformado (ONf).....	80
5.5.3	Dados obtidos para prevalência do Tecido Osteóide (Ost).....	80
5.5.4	Dados obtidos para prevalência de Vasos (VAS).....	80
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS APARIÇÕES.....	81
5.6.1	Comparação entre as áreas com apresentação de Coágulo (Coa).....	81
5.6.2	Comparação entre as áreas com apresentação de Osso Neoformado (ONf)....	83
5.6.3	Comparação entre as áreas com apresentação de tecido osteóide (Ost).....	84
5.6.4	Comparação entre as áreas com apresentação de Vasos (Vas).....	85
6	DISCUSSÃO.....	87
7	CONCLUSÕES.....	91
7.1	CONCLUSÕES GERAIS.....	91
7.2	CONCLUSÕES ESPECÍFICAS.....	91
	REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

Apesar da Odontologia buscar cada vez mais uma atuação preventiva, a realidade social e cultural por vezes não consegue acompanhar os anseios dos que preconizam e lutam por essa vertente.

Dessa forma uma boa parte da população ainda fica atrelada a necessidade de intervenções restauradoras e reabilitadoras, uma vez que os processos evolutivos da cárie e as doenças periodontais são, segundo um levantamento epidemiológico em saúde bucal realizado em caráter nacional, as causas mais comuns envolvidas nas perdas dentais. Ainda de acordo com esse levantamento a ausência dental é um dos mais graves problemas de saúde bucal do brasileiro (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2012).

Segundo Çiftçioglu (2000), por conta de diversos fatores, houve um importante incremento na expectativa de vida da população mundial durante o século XX. No início daquele século cerca de 60% dos seres humanos não viveu o suficiente para comemorar o seu 70º aniversário. Para este século um número significativo de pessoas alcançarão os 90 anos de idade.

O advento da implantodontia viabilizou uma boa gama dessas reabilitações apresentando-se como uma boa alternativa para pacientes portadores de perdas dos seus elementos dentais. Esse procedimento é correntemente aceito por profissionais e pelo público em geral, já que inúmeros trabalhos têm demonstrado que essa terapia é confiável e durável o suficiente para a utilização de próteses implantossuportadas (OTTONI, 2002).

Segundo Widmark (1997), boa estabilidade inicial do implante, volume suficiente e qualidade óssea adequada são três fatores que influenciam o resultado da cirurgia de implantes osteointegráveis. Portanto, um rebordo alveolar demasiadamente reabsorvido após a perda dental consiste em um possível fator limitante para instalação de implantes.

A utilização de enxertos ósseos é um dos recursos para recuperação dessas áreas.

Peltoniemi (2002) cita que a condição de um material para repor estas áreas com defeitos ósseos seria àquele que possui, como principal vantagem, o seu potencial de integração ao sítio receptor. O osso esponjoso e a medula óssea (possuidores de células vivas) são capazes da diferenciação e da formação de osso se aproximando dessas condições, já que as suas ações osteoindutivas fornecem um estímulo biológico (com a presença de proteínas e fatores de crescimento) que induzem a progressão de células mesênquimais e outras células osteoprogenitoras que contribuem para a formação de uma linhagem de osteoblastos

(REYNOLDS et al., 2010).

Jensen e Sindet-Petersen (1991) por meio de análise histológica e histomorfométrica em porcos já haviam observado que o osso autógeno mostrou-se mais eficaz no processo de neoformação óssea quando comparado a materiais como o beta-fosfato-tricálcico e o osso anorgânico bovino, sendo assim ressaltada a já consagrada afirmação de melhor material de enxertia.

Assim o material autógeno é uma importante opção pelas suas propriedades biológicas e a ausência de rejeição. Porém este carrega consigo alguns inconvenientes tais como a extensão da área a ser reparada, a eventual necessidade de hospitalização e de anestesia geral, o maior risco de infecção, um maior período de convalescença e, inclusive, um maior custo (TAGA, 1996). Isso além de se levar em conta os próprios limites naturais do indivíduo.

Esses fatores são dificultadores para a realização desse procedimento e tem contribuído para a busca e desenvolvimento de materiais alternativos, sejam eles de origem biológica ou sintética. O uso desses materiais artificiais, denominados de biomateriais, vem sendo realizado com mais frequência para reparar ou substituir partes doentes, danificadas ou envelhecidas do corpo. Segundo Ducheyne (1998), no começo do século XX, já existiam cerca de 45 diferentes partes do corpo que poderiam ser substituídas por biomateriais. Estes são polímeros sintéticos, metais, cerâmicas, macromoléculas orgânicas (biopolímeros) que são fabricados ou processados para adequar sua utilização como dispositivos médicos ou próteses.

Helmus (1991) cita que a forma do material, como a sua interface com o tecido e o seu tempo de utilização irão determinar a variabilidade dos materiais e suas respectivas propriedades. Nenhum material é único e adequado a todas as aplicações biomédicas. Cerâmicas, vidros e vitrocerâmicos são geralmente adequados para a reparação e substituição de tecidos duros, enquanto os materiais poliméricos são, normalmente, a escolha para aplicações em sistemas cardiovasculares.

A produção de biomateriais exige um esforço interdisciplinar de cientistas, engenheiros, bioquímicos e clínicos para a otimização do grande número de fatores relacionados com a biologia, mecânica de materiais, estrutura química, ciência de superfície e ciências ambientais que têm de ser levado em consideração na sua obtenção (KOHN, DUCHEYNE, 1992).

A aplicabilidade com sucesso da inserção de um material no organismo depende, em primeira mão, da sua biocompatibilidade. Este deve possuir a característica de cumprir uma função específica sem ser acompanhado de danos biológicos ou efeitos tóxicos ao seu

receptor. Uma maior bioatividade implica num menor tempo esperado para a interação entre o material e os tecidos orgânicos (OLIVEIRA, 1995). Segundo Çiftçioglu (2000), biocompatibilidade é a aceitação de um material pelos tecidos circundante de um corpo como um todo. O enxerto deve ser compatível em termos de mecânica, química, de superfície e, principalmente em suas propriedades farmacológicas.

Paiva et al. (2014) ressaltam a busca em desenvolver um material sintético que apresente todos os critérios de um substituto ósseo ideal. Para as alternativas ao enxerto autógeno, existem os biomateriais. Estes apresentam boa resistência à compressão e pouca resistência à tensão, mostrando-se semelhantes ao osso humano. O material sintético deve também possuir uma lenta reabsorção, um elevado grau de porosidade e permitir uma estrutura de suporte para adesão do tecido ósseo durante o processo de osteogênese. Galia (2004) cita o processo de neoformação óssea local propiciado pela indução da formação celular desencadeada no hospedeiro como outro fator determinante relacionado à qualidade de um enxerto como substituto ósseo.

Segundo Guimarães et al. (2011), na metodologia para avaliação do comportamento dos materiais para preenchimento ósseo, a melhor escolha de amostra para modelo animal são os ratos Wistar, machos e adultos jovens. O critério de inclusão da amostra objetivou evitar interferências de fatores hormonais e assegurar condições metabólicas e fisiológicas acentuadas em roedores jovens. Ainda segundo Friesen et al. (1999), os ratos também vêm sendo utilizados como modelo experimental para avaliar a cicatrização óssea por possuir nos ossos laminares e longos uma camada de osso cortical densamente mineralizada e bem formada, não sofrendo remodelação interna e, conseqüentemente, adaptam-se ao estudo da cinética óssea. Outros fatores que justificam este tipo de escolha, de acordo com Schmitz e Hollinger (1986), são que os ratos possuem custo baixo, tem a necessidade de um espaço físico pequeno na manutenção, uma pequena quantidade de material para realizar o estudo piloto e as partículas dos biomateriais são inseridas com facilidade no defeito.

Desde 1926, por estudo de difração de RX, observou-se que a parte mineral do osso tem um padrão semelhante ao da hidroxiapatita (DeJONG,¹ (1926) *apud* POSNER, 1975, p.273-281). E esta é uma forma cristalina do fosfato de cálcio.

Quatro fatores principais são relevantes em materiais alógenos do tipo biocerâmicos que são classificados com implantáveis: nível de bioatividade, área de superfície reativa, facilidade de manipulação e ser um arcabouço para cultura de células. O fosfato de cálcio

¹W.F.DeJONG, Recl. Trav. Chim. Pays-Bas, 45, 445(1926)

amorfo sugere atender tais requisitos (BRAGA et al., 2014). Suas propriedades químicas, mecânicas ou biológicas, mostram que este é um importante produto para a formação de hidroxiapatita in vivo ou in vitro (ZHAO et al., 2011). Guimarães et al. (2011) observaram que o de fosfato de cálcio mostrou características de biocompatibilidade e de osteocondução com resultados bastante satisfatórios em relação ao osso autógeno, inclusive com resultados superiores frente a este último.

Já, Kasaj et al. (2005) em estudos histológicos em animais e seres humanos mostraram que o uso de um hidróxido de cálcio também pode ser utilizado como substituto do enxerto autógeno, pois tende a conduzir a uma regeneração óssea acelerada, devido a criar um meio ambiente alcalino (pH 8-9) no local em que é inserido através da liberação de íons de hidróxido de cálcio o que também pode influenciar o tecido em seu processo de reparação.

Posto isso, este estudo se propõe a avaliar a utilização de uma apresentação inédita de fosfato de cálcio amorfo como alternativa viável na utilização como enxerto alógeno.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O tecido ósseo

Burkitt et al. (1994), descrevem o osso como um tecido de sustentação onde os componentes extracelulares se ligam à componentes mineralizados. Em sua porção estrutural, este tecido é formado por células, matriz orgânica e matriz inorgânica.

Hernández-Gil (2006) descreve que o tecido ósseo é bioquimicamente definido por uma mistura especial de matriz orgânica (35%) e elementos inorgânicos (65%), sendo que o principal destes é a hidroxiapatita de cálcio $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, mineral que confere a força e a dureza ao osso. Este se constitui no reservatório de 99% de todo o cálcio, 80% de todo o fósforo e 65% do sódio e magnésio do organismo. Na composição da matriz orgânica o principal componente é representado pelo colágeno tipo I (90%) com a presença de outras substâncias não colágenas (10%), como proteínas morfogenéticas do osso (também chamadas de BMPs), as proteoglicanas e também glicoproteínas como osteocalcina, osteonectina e osteopontina (ROSEMBERG, 1996). E de 3 a 5% de moléculas não colágenas são responsáveis pela promoção de sítios ativos para a biomineralização e para a adesão celular.

De acordo com Davies (2002), 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 defeitos ou reparos, porém nem sempre com um processo completo e maturo de reparação (Ludwig et al., 2000).

Rosemberg (1996) descreve que as principais células encontradas no osso são os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, sendo os dois primeiros tipos celulares derivados das células mesênquimais osteoprogenitoras. Os osteoclastos são derivadas de uma célula precursora granulócito-macrófago localizada na medula hematopoiética. Os osteócitos, células presentes na estrutura do tecido ósseo, podem ser encontrados em cavidades chamadas osteoplastos e desempenham um importante papel no controle dos níveis plasmáticos de cálcio e fósforo.

Gartner (2003) descreve que a parte tecidual apresenta uma capacidade de renovação constante sendo que os processos de crescimento, modelação e reparação dos tecidos ósseos, ocorrem com as células osteoprogenitoras que são os osteoblastos, os osteócitos e os

osteoclastos. Os osteoblastos são células ósseas jovens, presentes em regiões onde o tecido encontra-se em processo de formação.

De fato, segundo Junqueira (2004), tais células apresentam grande atividade na produção de proteínas, principalmente o colágeno, fundamental na organização da matriz óssea. Os osteoblastos originam os osteócitos, células ósseas presentes em cavidades da matriz óssea sendo que estas regulam o crescimento ósseo em função das células viáveis, transferidas no interior do tecido ósseo agindo e coordenando durante a neoformação, denominado processo de osteogênese, impedem a ação de fatores concorrentes inibitórios ao processo de regeneração (LINDHE, 2005). Ainda de acordo com Lindhe (2005) os osteócitos armazenam cálcio além de sintetizar a maior parte orgânica da matriz óssea e onde ocorre a difusão de nutrientes no interior do tecido. Os osteoclastos, ao contrário, tem aspecto de células gigantes multinucleadas, cuja função é de destruir a matriz óssea através da ação de enzimas e posteriormente absorver a matriz digerida agindo de forma modeladora e preparadora para uma futura neoformação óssea.

2.2 A reparação tecidual

Descrito por Junqueira e Carneiro (1979), a formação de osso durante o desenvolvimento do esqueleto ocorre por ossificação intramembranosa ou por ossificação endocondral. Na ossificação intramembranosa, o mineral é depositado diretamente em um tecido mesenquimal, enquanto na ossificação endocondral um modelo cartilaginoso é substituído por osso, se tornando este modelo estático e definitivo. Burkitt et al. (1994) propuseram o reparo de fratura como sendo um modelo de reparo ósseo em que a neoformação óssea seria tanto intramembranosa como endocondral. Segundo os mesmos autores, no local da fratura forma-se um coágulo sanguíneo que é posteriormente substituído por um tecido colágeno altamente vascularizado também descrito como tecido de granulação (uma resposta normal ao processo e não presente naturalmente). Esse tecido torna-se progressivamente mais fibroso. Logo a seguir células mesenquimais diferenciam-se em condroblastos e substituem o tecido de granulação por cartilagem hialina neoformada, prosseguindo assim até a formação um pequeno excesso de tecido provisório, que é flexível. No seguir do processo biológico inicialmente reparador e como resposta a alteração prevista, este excesso é fortalecido pela deposição de sais de cálcio dentro da matriz cartilaginosa.

Ocorre a seguir a ativação de células osteoprogenitoras tanto no endósteo como no periósteo. A partir do momento que são ativadas, começam a secretar um osso imaturo ao redor e dentro deste excesso provisório, que se torna ósseo, já sedimentado e com contínua alteração desta formação. O descrito como osso imaturo formador do excesso ósseo será lentamente remodelado para formar osso lamelar maduro.

O processo de cicatrização é descrito por Ellis III (1996), quando cita que a partir do conhecimento básico de como se dá a cicatrização pode-se entender o que é necessário para avaliar as vantagens dos diversos tipos de enxerto a serem utilizados. Este processo de cicatrização só ocorrerá devido a dois processos básicos: o primeiro ocorre quando surge a partir de células viáveis do próprio enxerto, capazes de formar tecido osteóide. Em uma segunda etapa, visualiza-se também o descrito por Burkitt et al. (1994): que no espaço a ser preenchido pelo enxerto há uma intensa angiogênese e proliferação fibroblástica com posterior osteogênese.

A presença de uma grande vascularização é preponderante para que todo o processo tenha sucesso, pois como afirma Schenk (1996), a formação óssea depende de dois pré-requisitos indispensáveis sendo que o principal é um bom suprimento vascular e o outro um bom suporte mecânico. Ainda ressalta que caso determinadas condições não sejam observadas, pode-se impedir ou simplesmente alterar o reparo ósseo. Cita déficits de vascularização, instabilidade mecânica, defeitos de grandes volumes e tecidos competidores com alta atividade de proliferação (como por exemplo, alterações inflamatórias).

Consolaro et al. (1997) descrevem que em condições biológicas normais, uma cavidade óssea é reparada através do processo natural, cuja extensão e sua velocidade de reparação varia conforme as condições normais do processo de reparação e também como fatores como as dimensões da lesão, a sua localização anatômica e de fatores genéticos que podem estar envolvidos. O processo de reparação do alvéolo dental é observado imediatamente após a exodontia, onde no processo pós cirúrgico o alvéolo é imediatamente preenchido por sangue proveniente do rompimento dos vasos sanguíneos do ligamento periodontal adjacente e do feixe vasculo-nervoso do dente que acabou de ser removido.. Com a formação do coágulo, tende-se a iniciar-se uma neoformação celular com a invasão de fibroblastos, presença de capilares neoformados e células inflamatórias resultantes de uma resposta inflamatória natural devido ao processo cirúrgico de exodontia como linfócitos e neutrófilos, que caracterizam assim a formação de um tecido de granulação. Seus estudos reforçaram observações de Euler (1923) e Simpson (1969).

A proliferação desses componentes inicia-se a partir das paredes ósseas que

constituem os alvéolos e principalmente do seu terço apical onde podem ser verificada a presença do feixe vasculonervoso remanescente que terá uma ação na formação do tecido conjuntivo neoformado (JOHASEN, 1970, CARVALHO, OKAMOTO, 1978, LIN et al., 1994, KANYAMA et al., 2003).

Logo após os primeiros dias pós exodontia, já é possível detectar a presença de osteoclastos nas cristas alveolares em decorrência do início do processo de reabsorção óssea que ocorrera devido à remodelagem óssea natural (CLAFIN, 1936, HSIEH et al., 1994, LINDHE, 2005).

Neste processo de reparação os osteoclastos são células responsáveis pela síntese da parte orgânica da matriz óssea (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999, ARANA-CHAVEZ, BRADASSCHIA-CORREA, 2012), a presença de células osteoprogenitoras são importantes por serem as responsáveis pela diferenciação em osteoblastos (LIN et al., 1994, DEVLIN, SLOAN, 2002). Os osteoblastos que se encontram no alvéolo dental depositam na matriz orgânica, dando origem a tecido osteóide, de onde a partir da calcificação deste começam a surgir as trabéculas ósseas delgadas. Com o início do surgimento destas, começa a deposição contínua de minerais permitindo o preenchimento em toda a extensão do alvéolo dental. Com o constante preenchimento no espaço alveolar e o espessamento do mesmo, tem-se um estreitamento do espaço intra-trabecular. Esse processo é finalizado com a organização do osso em lamelas, caracterizando assim um processo de maturidade óssea plena (AMLER et al., 1960, EVIAN et al., 1982, CARDAROPOLI et al., 2003).

Além disso, as alterações extra-alveolares como deposição óssea ao longo da cortical externa subperiosteal do alvéolo e adjacente aos espaços medulares são observadas concomitantemente na reparação intra-alveolar (BOYNE-KRUGER, 1962, ASTRAND, CARLSSON, 1969). Okamoto e Russo (1973) observaram que os alvéolos de ratos mostravam trabéculas ósseas neoformadas ao sétimo dia pós-operatório, sendo que ao vigésimo primeiro dia, o alvéolo já se achava totalmente preenchido por tecido ósseo. Barbosa (2013), ao fazer um estudo sobre expressão de proteínas ósseas durante o processo de reparação alveolar de ratos, não observou alteração nessa cronologia quando comparados animais jovens e adultos.

Segundo Lean et al. (1996), o osso é um tecido dinâmico que constantemente sofre remodelação, sendo que seu sinal de início não foi identificado, mas há evidência de que o stress mecânico pode alterar a arquitetura óssea local e esta pode ser detectada pela presença de osteócitos em resposta as diversas forças mecânicas que provocam formações ósseas resultando em uma cascata complexa de eventos que envolve proliferação de células

mesenquimais primitivas também conhecida como osteoindução, ou seja, é a propriedade de uma substância induzir células indiferenciadas em células osteoprogenitoras e estas em osteoblastos, com posterior formação de novo tecido ósseo. A matriz óssea possui fatores proteicos indutores de diferenciação de novas células ósseas e que foram designados de BMP25 (Bone Morphogenetic Protein 25) cuja ação resulta em diferenciação celular para osteoblastos. Sua maturação leva a formação de matriz e, finalmente, a mineralização (DALL'ANTONIA et al., 2006). O surgimento de osteoblastos que convergem na parte inferior da cavidade em reabsorção e formam tecido osteóide coincide com o início do processo que começa uma mineralização após 13 dias. De acordo com Hill (1998) estes osteoblastos continuam a se formar e secretar tecido osteóide até a cavidade ser preenchida.

Schmitz e Hollinger (1986) estudaram defeitos ósseos críticos em calvária e mandíbula de ratos, coelhos, cães e macacos e revisando e comparando os modelos animais tendo descrito que para macacos as pesquisas ainda eram insuficientes.

Okamoto e Fialho (1990) observaram que em cortes transversais de ferida de extração de incisivo superior de ratos, o processo de reparo se completa entre o 24º e o 28º dia pós-operatório. Nos últimos estágios, as observações verificadas através dos cortes longitudinais a partir do 21º dia pós-operatório não percebiam de maneira adequada os aspectos histológicos no processo de reparação. Porém aquelas características apresentadas no 24º dia pós-operatório não diferem quando comparadas às do 28º dia pós-operatório

O tecido ósseo possui células embebidas em matriz extracelular que contém um componente adicional, os cristais de hidroxiapatita, depositados na matriz orgânica secretada pelos osteoblastos. Constituem assim o componente inorgânico ou a chamada fase mineral da matriz do tecido ósseo (ARANA-CHAVEZ, BRADASSCHIA-CORREA, 2012), sendo que este mesmo material serve de base para confecção de enxertos não autógenos.

2.3 Os biomateriais

Segundo Willians (1987) um biomaterial por definição é uma substância ou associação de duas ou mais substâncias, farmacologicamente inertes, de origem natural ou sintética, utilizadas para substituir, aumentar ou melhorar, parcial ou integralmente tecidos e órgãos.

Helmus (1991) estudou diversos biomateriais sintéticos, sua forma e interface e propriedades e cita que nenhum material é único e adequado a todas as aplicações biomédicas.

Legeros (2002) e Murugan e Ramakrishna (2005) descrevem a utilidade dos biomateriais de enxerto ósseo para o aumento ou reconstrução do rebordo alveolar, preenchimento de defeitos intraósseos e de alvéolos dentários após exodontias, em elevações do assoalho do seio maxilar, e tratamento de defeitos perimplantares.

Na área odontológica os biomateriais também se destacam pelo uso nas terapias de cunho regenerativo. Sendo amplamente pesquisados e utilizados na tentativa de recuperar os tecidos perdidos, com bloqueio da entrada de células indesejáveis no leito cirúrgico, potencializando os processos de reparo através do uso simples ou combinado de mais de um biomaterial (BUSO, 2005).

De acordo com Schallhorn (1988) há uma enorme diversidade de biomateriais que se diferem pelo modo de aplicação, tempo de permanência em contato com os tecidos e o material utilizado para sua fabricação. Os materiais normalmente usados em todas as abordagens são cerâmica, polímeros ou materiais compósitos (BURG et al, 2000).

Santos (2007) descreve que estes tipos de materiais começaram a ser utilizados ao final da década de 1990 com novas características microestruturais capazes de estabelecer ligação com o tecido ósseo, apresentando boa dissolução do biomaterial e absorção pelos tecidos ósseos, promovendo a neoformação natural do tecido.

Para que um biomaterial possa ser usado de forma bem sucedida, algumas condições devem ser observadas, tendo se em vista que este deve ser biocompatível não causando, portanto, danos locais ou sistêmicos além de não ser tóxico (AMARAL, 2006). O biomaterial deve possuir a habilidade de atuar com uma resposta apropriada do hospedeiro em uma aplicação específica. Sua interação de contato com o ambiente biológico deve ocorrer na sua interface (FREIRE et al., 2012). Segundo Abraham et al. (2004), os biomateriais, tanto naturais quanto sintéticos, apresentam características que definem sua biocompatibilidade e bioestabilidade, as quais devem ser conhecidas para que se possa prever o comportamento do dispositivo durante o período de aplicação clínica.

De acordo com Langstaff (1999) um biomaterial para ser aplicado como matriz de substituição óssea deve ser biocompatível e favorecer a proliferação e desenvolvimento das células em sua superfície e para seu interior, através de sua microporosidade, assim permitindo a sua dissolução e absorção dos íons de Ca^{++} e P dentro do processo de formação óssea. Os biomateriais a base de fosfato de cálcio, tais como fosfato tricálcico e hidroxiapatita, são destaque nas pesquisas por apresentarem biocompatibilidade e semelhança mineralógica com a estrutura do esqueleto humano.

Outra propriedade que deve se considerada é a biofuncionalidade que segundo

Proubasta (2007) é um conjunto de características relacionada à capacidade do biomaterial desempenhar as funções estéticas e dinâmicas desejadas no meio onde se promove a enxertia. A biofuncionalidade implica em que as propriedades mecânicas, físicas, químicas e biológicas sejam cumpridas. Os biomateriais devem possuir também a denominada bioatividade que, segundo Orefice et al. (2006), está relacionada ao comportamento fisiológico e suas interações com o tecido ósseo, por propiciar ligação química estável entre o tecido ósseo e o biomaterial, com formação de hidrocarbonato apatita entre as interfaces, conduzindo de uma maneira natural a osseointegração, a osseoindução e uma neoformação de tecido ósseo. A bioatividade ainda está relacionada à capacidade que o biomaterial apresenta de interagir com tecidos vivos, estimulando os processos físico-químicos naturais ao sistema biológico, favorecendo assim, a integração do biomaterial com o sistema receptor. A bioatividade como propriedade presente na reconstituição de tecido ósseo também é citada por Camargo (2006), relacionando o preenchimento da cavidade, sua absorção e ligação interfacial do biomaterial com o tecido, a neoformação e interação de osseoindução e de osseointegração do biomaterial com o tecido ósseo hospedeiro e a formação do novo tecido ósseo e cicatrização do tecido ósseo hospedeiro.

De acordo com Lindhe et al. (2005), vários enxertos com biomateriais utilizados podem ser classificados quanto a sua composição e comportamento biológico. Quanto à composição pode-se considerar que os enxertos autógenos são transplantados de um lugar para outro no mesmo indivíduo, sendo então, gradualmente reabsorvidos e substituídos por novo osso, sendo que este é o único entre os tipos de enxerto ósseo a fornecer células ósseas vivas imunocompatíveis e que são responsáveis pela proliferação das células ósseas, assim, quanto mais células vivas forem transplantadas, mais tecido ósseo será formado.

Lindhe et al. (2005) disseram que se espera de um material não autógeno algumas características como a necessidade de serem osteoindutores, osteocondutores e osteogênicos.

Os materiais com osteoindução possuem capacidade de atrair células mesenquimais indiferenciadas, que se diferenciam em osteoblastos aumentando o crescimento ósseo. Isto ocorre devido à presença de proteínas ósseas morfogenéticas (BMP's) entre seus componentes (HENCH et al., 1998). Já materiais com a capacidade osteocondutora, segundo Kirkpatrick et al. (1990), caracterizam-se por permitir a aposição de novo tecido ósseo a partir de osso pré-existente, funcionando como um arcabouço para as células osteoprogenitoras se fixarem e atuarem com a participação de vasos sanguíneos proliferados que levam os componentes necessários à formação óssea. Dall'antonia (2006) descreve a osteocondução como a propriedade de um material preenchedor servir como arcabouço e uma posterior diferenciação

terminal em osteoblastos, não servindo, no entanto, para formação óssea quando implantado em tecido mole.

Os materiais osteopromotores são caracterizados pelo meio físico que promove o isolamento anatômico de um local, permitindo a seleção e a proliferação de um grupo de células, predominantemente osteoblastos a partir do leito receptor e, simultaneamente, impedem a ação de fatores concorrentes inibitórios ao processo de regeneração (GATTI et al., 2002).

De acordo com Hanawa (1991), dependendo da resposta induzida ao meio biológico no qual são inseridos, os biomateriais podem ser classificados em bioinertes, biotoleráveis e bioativos. A resposta induzida pelos materiais bioinertes e biotoleráveis, em relação ao tecido ósseo, é a formação de um processo inflamatório que pode culminar com encapsulação na região por uma camada de tecido fibroso não aderente, que impossibilita a interação direta com tecido, podendo levar à instabilidade e uma possível falha óssea. Nos materiais bioativos esta interação tende a ocorrer intimamente com o tecido vivo sem a intervenção de tecido fibroso, podendo ocorrer uma resposta biológica específica com o tecido vivo que possibilita a formação de uma ligação química com o próprio tecido vivo, também chamada de bioadesão.

Burg et al. (2000) citam que a utilização de materiais de substituição óssea bioativos sintéticos é de importância crescente na odontologia moderna como alternativas para enxertos autógenos. Várias substituições de osso por materiais aloplásticos, de origem, composição química e propriedades estruturais diferentes têm sido investigadas nos últimos anos. Os materiais normalmente usados em todas as abordagens são cerâmica, polímeros ou materiais compósitos.

De acordo com Carvalho et al. (2004), os biomateriais devem ter como propriedades não induzir à formação de trombos como resultado do contato entre o sangue e o biomaterial, não induzir resposta imunológica adversa, atoxidade, não ser carcinogênico, não alterar o fluxo sanguíneo e não modificar a resposta inflamatória aguda ou crônica que impeça ou desfaça a diferenciação celular.

Murugan e Ramakrishna (2005) classificam os biomateriais com relação à sua origem, assim sendo: autógenos, homógenos, xenógenos e aloplásticos.

Rawlings (1993) descreve que os biomateriais de origem natural podem ser classificados como autógenos, quando o tecido utilizado é proveniente de áreas doadoras do próprio indivíduo. Segundo Marx e Saunders (1986), os enxertos de origem autógena são os que apresentam melhor previsibilidade de regeneração óssea. São ditos enxertos de “padrão

ouro” devido a suas propriedades osteocondutoras, osteoindutoras e osteogênicas (TRIPLETT et al., 1996).

Existem os que podem ser denominados de alógenos ou homólogos, quando o doador é da mesma espécie que o receptor, porém geneticamente diferentes. Os implantes homólogos são os materiais que mais se aproximam dos enxertos autógenos (LYNCH et al., 1999). O tecido pode ser obtido de osso humano, processado e estocado em banco de ossos (BUCK, 1994). Estes enxertos são utilizados na tentativa de estimular a formação óssea em defeitos ósseos envolvendo, porém, um certo risco com relação a antigenicidade, muito embora sejam, usualmente, pré-tratados por congelamento, radiação ou agentes químicos, visando evitar reação de corpo estranho (LINDHE et al., 2005).

Têm-se os heterólogos ou xenólogos quando o material é originário de uma espécie diferente do receptor (WILLIAMS, 1987). São produzidos a partir da porção inorgânica do tecido ósseo, de origem animal (normalmente de bovinos) e classificados como osteocondutores. A matriz inorgânica do osso bovino é produzida a partir de osso cortical e esponjoso e contém apatita carbonada com composição química, porosidade e estruturas cristalinas compatíveis com o tecido ósseo humano, sendo que segundo Tadjedin et al. (2003), esse material é altamente osteocondutivo, sendo química e fisicamente semelhante ao osso humano.

Galia (2000) estudando as características físico-químicas do osso bovino liofilizado (Orthogen[®]) confirma que este produto apresenta excelente biocompatibilidade, com características semelhantes ao osso in natura. Descreve que o processo de neoformação óssea local deve ser buscado pela indução da formação celular desencadeada no hospedeiro como fator determinante relacionado à qualidade de um enxerto como substituto ósseo.

Outra categoria é a dos chamados aloplásticos ou sintéticos. Os biomateriais podem ser de natureza metálica, cerâmica ou plástica. Executam função de preenchimento dos espaços apresentados pelos defeitos ósseos ou preenchimento de apoio para sustentação, sem que haja uma incorporação fisiológica (OKAMOTO, 1994).

Peltoniemi (2002) trabalhando com polímeros reabsorvíveis cita que a condição de um material para repor áreas com defeitos ósseos é o seu potencial de integração ao sítio receptor.

Os biomateriais cerâmicos são aqueles obtidos pelo cozimento ou queima de minerais não metálicos, enquanto que os poliméricos seriam compostos formados pela combinação de unidades menores, unidas por ligações covalentes, formando macromoléculas (WILLIAMS, 1987). Ao observar a neoformação óssea, do ponto de vista quantitativo, os resultados obtidos neste experimento demonstraram diferenças entre os grupos, controle e teste, dos diferentes

materiais de preenchimento ósseo utilizado, assim como destes grupos, em relação ao grupo controle negativo. Maiores áreas de trabéculas ósseas foram observadas nas cavidades teste dos grupos submetidos aos materiais de preenchimento ósseo sem, contudo, associação estatística significativa aos 30 e 90 dias, o que evidenciou a ação positiva da cerâmica bifásica de hidroxiapatita, do cimento fosfato de cálcio e do enxerto ósseo autógeno no processo de reparo ósseo (GUIMARÃES et al., 2011). No início dos anos 70, muitos pesquisadores começaram a estudar um grupo de materiais sintéticos constituídos de cerâmicas de fosfato de cálcio. Segundo Buchaim et al. (2002) estes materiais são biocompatíveis, além de conter cálcio e fosfato, os quais são presentes no tecido ósseo, pois de acordo com Gutierrez et al. (2006) é possível produzir materiais cerâmicos sintéticos com uma composição semelhante à matriz óssea inorgânica. Além do fosfato de cálcio, temos o sulfato de cálcio, os biovidros e materiais cerâmicos que o usam de base como o fosfato tricálcico, a hidroxiapatita, os biocompósitos à base de fosfato de cálcio e os cimentos de cerâmica injetáveis.

Segundo Monteiro et al. (2003), área de superfície, cristalinidade e substituição do carbonato são fatores que são levados em conta para a introdução de um biomaterial, pois uma condição cristalina possui uma organização atômica bem definida, ao contrário de um material amorfo, que apresenta um formato de cristal irregular. A cristalinidade é uma propriedade que altera o índice de dissolução do biomaterial é dependente da temperatura de sinterização, com o aumento da temperatura, mais perfeita a forma do cristal e com isso menor o grau de degradação (CONZ et al., 2011). Quanto menos cristalino for o biomaterial, mais rápida será sua reabsorção.

Çiftçioglu (2000) estudou a hidroxiapatita em pó modificando sua superfície e sua densidade buscando uniformidade de microestrutura e diminuindo a sua porosidade residual.

Segundo Kasajet et al. (2005) o uso de um hidróxido de cálcio também pode ser utilizado como substituto do enxerto autógeno, tendendo a conduzir uma regeneração óssea acelerada, pois cria no local um meio ambiente alcalino (pH 8-9) pela liberação de íons de hidróxido de cálcio o que também pode influenciar o tecido em seu processo de reparação.

Vários tipos de biomateriais (à base de minerais e não minerais, bem como naturais e polímeros artificiais) com características diferentes têm sido utilizados para estudar a formação óssea. Por exemplo, cerâmicas de fosfato de cálcio incluem uma variedade tais como hidroxiapatita, fosfato tricálcico, cimento de fosfato de cálcio e outros (KUNERT-KEIL, 2011). Esta mudança de atitude em busca de materiais alternativos se deve a essas cerâmicas possuírem excelente biocompatibilidade e propriedades de regeneração (ZHAO et al., 2000).

Estes materiais cerâmicos são usados para reparar e reconstruir partes doentes ou danificadas do corpo (geralmente tecidos duros, como ossos e dentes) são chamados de biocerâmicas. Por serem constituídos de tecnicamente de cerâmica inerte, totalmente densos que interagem com o osso por qualquer alteração de força, podendo induzir uma remodelação junto a uma superfície rugosa (HENCH, 1999) Como cerâmica porosa inerte no qual o crescimento ósseo ocorre, chega a provocar a criação de uma ligação mecânica em sua superfície totalmente densa (HENCH, WILSON, 1991) transformando os poros cerâmicos em ativos o que permite atribuir ao osso através de uma ligação química, cerâmica reabsorvíveis que integram-se ao osso e eventualmente são substituídos por osso (KOHN, DUCHEYNE, 1998).

Braga et al. (2014) descreve as propriedades estruturais de um tipo desses materiais: o fosfato de cálcio, com pureza química e grau cristalino, possuindo estequiometria molecular que é fundamental para definir a resistência à ação da degradação e do metabolismo, bem como das suas dimensões e morfologias devido à área de superfície que está em contato para as células. O objetivo deste trabalho foi apresentar um novo biomaterial para enxerto ósseo, não inovador na sua composição química, mas na sua característica morfológica similar à de fibras de algodão, os quais demonstrou manter as suas propriedades biocompatíveis e osteocondutoras adicionado à capacidade hemostática e à maior gama de aplicações sendo que alguns casos, atualmente ainda estão ainda sem opção de enxertia. Suas propriedades químicas, mecânicas ou biológicas, mostram que este é um importante produto para a formação de hidroxiapatita in vivo ou in vitro (ZHAO et al., 2011).

Para se conseguir a biocompatibilidade Braga et al. (2014) avaliaram a relação entre o tipo de osso e o biomaterial usado no processo de reação, e se este condiz com a condição ideal para uma osteogênese total, se promove uma ação físico-química de união do osso à superfície do biomaterial, e onde o processo que se segue, citam alguns passos que definem o fenômeno osseointegração. Para tal, o biomaterial deve possuir energia superficial relacionada com a maleabilidade da superfície do coágulo onde será definido o tipo e quantidade de contato entre com que tecido ósseo formado com o biomaterial.

Kunert-Keil (2011) cita que vários tipos de biomateriais (materiais à base de minerais e não minerais, bem como naturais e polímeros artificiais) com características diferentes têm sido utilizados para estudar ossificação e a formação óssea. Por exemplo, cerâmicas de fosfato de cálcio incluem uma variedade de cerâmica, tais como hidroxiapatita, o fosfato tricálcico e outros. Esse tipo de cerâmicas apresentam excelente biocompatibilidade e uma união óssea com propriedades que induzem a regeneração. Entre todas, porém, a característica mais

importante seria a aquela que se aproxima dos materiais autógenos que é a osteogênese, ou seja, a de materiais orgânicos que são capazes de formar osso diretamente a partir de osteoblastos (MARX, 2007).

A utilização de materiais bioativos sintéticos de substituição óssea é de importância crescente na odontologia moderna como alternativa aos enxertos autógenos.

Há alguns anos aumentou-se o uso dos enxertos aloplásticos, que são materiais de implante sintéticos ou inorgânicos utilizados como substitutos aos enxertos ósseos. Esses materiais sintéticos, quando começaram a ser utilizados, eram inertes com nenhuma ou pouca atividade osteoindutora (PRECHEUR, 2007), mas tinham como vantagem a diminuição do tempo cirúrgico, além de múltiplos tamanhos e formatos disponíveis. Como desvantagens, esses tipos de materiais correm o risco de rejeição seguida de infecção, com necessidade de nova intervenção cirúrgica. Nesses casos, materiais reabsorvíveis são preferidos, pois estudos mostram que alguns materiais não reabsorvíveis podem causar reações a longo prazo (SHINDO, 1993).

Para tal, o biomaterial deve possuir energia superficial relacionada com a maleabilidade da superfície do coágulo onde vai-se definir o tipo e quantidade de contato entre com que tecido ósseo formado com o biomaterial. Em seguida, comparando o potencial eletroquímico da superfície onde ocorrerá o enxerto e a do biomaterial irá determinar o nível de capacidade de adesão do biomaterial em relação ao tecido ósseo formado. O tipo de troca iônica entre a superfície do biomaterial e o corpo onde o material foi enxertado irá definir o tipo orgânico mineral do tecido formado em torno do biomaterial superfície. Nesse mecanismo, a biocompatibilidade e são biofuncionalidade são propriedades que dão o conceito certo de biomateriais, e a capacidade de cumprir adequadamente a função pretendida com a necessária aceitação pelo corpo.

Reynolds et al. (2003) estudaram enxertos para preenchimento de defeitos periodontais e descreve que boa parte dos insucessos se deve ao mau uso dos biomateriais.

A hidroxiapatita tem sido muito pesquisada desde seu surgimento como biomaterial, sendo um fosfato de cálcio hidratado, principal componente (cerca de 95%) da fase mineral dos ossos e dentes humanos. Entre as indicações de uso está o reparo de defeitos ósseos em aplicações odontológicas como o aumento de rebordo alveolar, regeneração guiada de tecidos ósseos e reconstrução bucomaxilofacial (PINTO et al., 2007). Estas atividades têm recebido atenção especial pela sua semelhança estrutural química e física com a matriz mineral óssea. Além de não induzir qualquer reação imunológica ou tóxica indesejável, ao contrário de alguns materiais de origem orgânica (DALAPICULA et al., 2006).

A hidroxiapatita é o constituinte mineral natural encontrado no osso representando de 30 a 70% da massa dos ossos (COSTA et al., 2009) Os biomateriais empregados neste estudo foram obtidos pelo método de síntese via úmida, e foi demonstrado por Fulmer et al. (1992), que a hidroxiapatita obtida por este método possui características similares às do tecido ósseo e dentário, diferentemente da hidroxiapatita sintetizada à altas temperaturas. Aos 60 dias, a hidroxiapatita demonstrou moderado preenchimento de lacunas e neoformação de tecido ósseo, e leve presença de osteoclastos e formação de tecido ósseo, indicando boa osteoindução e boa capacidade osteorregenerativa. Não foi observada segundo Costa et al. (2015) deposição de fibras colágenas ou presença de infiltrado inflamatório, demonstrando claramente sua biocompatibilidade. Aos 90 dias estes resultados se mostraram mais evidentes, apresentando acentuada neoformação de tecido ósseo, com evidente preenchimento de lacunas osteocíticas, diferindo dos resultados observados por Cho et al. (2011). Estes autores relataram ter observado deposição de tecido fibroso sobre os grânulos do biomaterial, lenta reabsorção pelo organismo e baixa capacidade de formação óssea, o que não corresponde aos resultados obtidos no presente estudo, que demonstrou uma boa capacidade osteoindutiva e osteocondutiva, além de não ser notado nenhum sinal de rejeição tecidual com deposição de tecido fibroso. Esta divergência pode estar associada à diferença entre os tamanhos dos grânulos, que variavam entre 212 a 1000µm, e no atual se restringiam a uma faixa entre 200 e 500µm, com presença significativa de microporosidades. Compostos de hidroxiapatita e outras cerâmicas, tais como alumina e zircônia, podem combinar a biocompatibilidade da hidroxiapatita a vantagens mecânicas dos materiais complementares (BASAR et al., 2011). Embora a alumina seja bioinerte e conhecida por sua força química e mecânica, ela não forma ligações bioquímicas com o tecido onde os resultados não foram os esperados e não dignos de nota.

Em seu trabalho, Dall'antonia (2006) decreve que a inserção de Gen-Ox (um osso liofilizado) mostra que após 15 dias a presença de fosfato de cálcio neste material provoca em alvéolos de ratos enxertados um tecido conjuntivo subjacente bem desenvolvido. Junto ao terço cervical em alguns espécimes permanece o material de implante e tecido conjuntivo sem diferenciação óssea com elevado número de fibroblastos. Ao nível do terço médio o material de implante encontra-se ao lado de trabéculas ósseas bem desenvolvidas Nas demais espécimes o alvéolo dental achou-se ocupado por trabéculas ósseas delgadas permanecendo extensas áreas com tecido conjuntivo sem diferenciação óssea

Porém Truedsson (2010) descreve como característica mais importante da hidroxiapatita a osteocondutividade, a qual induz crescimento ósseo no interior do enxerto,

promovendo a estabilidade e manutenção o volume do enxerto. As preparações têm sido apresentadas em forma de cerâmicas, comercializadas como formas densas ou porosas, blocos e grânulos. Sua forma porosa promove osseointegração mais consistente, resultando na formação de união forte entre o enxerto e osso adjacente, no entanto, sua reabsorção é muito lenta, o que pode dificultar a remodelação óssea.

A hidroxiapatita pode ser obtida a partir de diversas fontes como sulfato de cálcio, corais, ostras, conchas, cascas de ovo e, principalmente osso bovino sendo que tanto fonte como método de obtenção são determinantes na sua citotoxicidade (MENDES, 2006).

Mahajan e Kedige (2015) sugeriram um papel substancial em uma forma diferente que se baseia em uma suspensão de hidróxido de cálcio oleosa que estimula regeneração óssea em defeitos ósseos e qualquer preenchimento ósseo. Tem sido considerado como tendo efeito sobre a regeneração óssea osteostimulativo em defeito ósseos. O efeito osteostimulativo é considerado biológico e parece basear-se em fatores tais como a ação de depósito de hidróxido de cálcio que tende a sustentar o metabolismo ósseo em um ambiente constante leve e pH alcalino. A estimulação do crescimento ósseo com formações angiogênicas e acrescentando os fatores de crescimento induzem formação óssea no lado da parede com defeito. Para execução do produto, o pó de cálcio é adicionado ao Osteora[®], a fase oleosa de onde podemos prever uma mistura gradual, no qual após longas horas de aumento da alcalinização provocada no tecido enxertado alcançando um pH de cerca de 10,5 e isto provoca, por um lado, a diferenciação e o crescimento de osteoblastos e fibroblastos, aumentando assim a regeneração óssea.

Ainda pelo mesmo estudo de Mahajan e Kedige (2015) para uma melhor avaliação em defeitos intra-ósseos foram criados cirurgicamente bilateralmente distalmente os primeiros pré-molares superiores e mesialmente dos terceiros pré-molares em dois cães sem raça definida e subsequentemente, estes defeitos foram tratados aleatoriamente. Após 8 semanas de cicatrização, os animais foram mortos e dissecadas blocos fixados em formalina, descalcificados em EDTA, e histologicamente observada a formação de novo osso e do cimento. Os defeitos tratados consistentemente revelaram regeneração óssea com neoformação de fibras de colágeno de inserção e de novo osso.

Outro material que pode ser utilizado de acordo com Guastaldi e Aparecida (2010) são à base de fosfatos de cálcio. Isso segue uma tendência natural, pois os ossos e dentes possuem compostos naturais formados por colágeno, arranjado em fibras, havendo na formação deste material pequenos compartimentos intersticiais regularmente espaçados, onde estão presentes nanocristais de um sólido inorgânico, que representa cerca de 65% da massa total do osso.

Vallet et al. (2004) constataram que esse componente inorgânico possui estrutura cristalina e razão Ca/P semelhante ao hidróxido de cálcio em seus diversos processos de dissolução e na formação óssea de diferentes formas de enxertos de preenchimento ósseo.

Posner e Betts (1975) lançando mão da difração de raios X estabeleceram relações entre o fosfato de cálcio amorfo e a estrutura mineral do osso e citam sua relevância.

Vallet-Regi (2004) descreve que a deposição do fosfato de cálcio nas moléculas de colágeno ocorre por um processo de biomineralização controlado envolvendo mais de 200 diferentes proteínas, que atuam como inibidores e nucleares para o crescimento epitaxial e ancoragem ao colágeno. Por outro lado, a cristalização do fosfato de cálcio presente no tecido ósseo envolve a formação cineticamente controlada de produtos intermediários metaestáveis. Dentro de condições *in vitro*, é observada a transformação de um fosfato de cálcio amorfo a fosfato octacálcico, o qual se converte ao fosfato de cálcio com composição semelhante a hidroxiapatita.

Paiva et al. (2014) realizaram análises histológicas de enxertos de seio maxilar utilizando hidroxiapatita associada a β -fosfato tricálcico e submetidos a instalação de implantes osteointegrados verificando formação de osso viável.

Braga et al. (2014) cita que para reconstruir de uma região óssea usando um material de enxerto, é necessário incitar em um local o processo inflamatório, este é caracterizado pelo excesso de sangue decorrente que conduz à formação do coágulo para os espaços livres entre o osso traumatizado de superfície e a superfície do enxerto. Células de macrófagos digerem o coágulo dando espaço para fibroblastos e os osteoblastos começam a nova formação de tecido. A característica do tecido formado depende de fatores intrínsecos como condição metabólica do corpo e do tipo de osso locais da matriz, e fatores extrínsecos como as características de condição de enxertia e cirúrgicos. Estes fatores definem o modelo de distribuição e a quantidade de tecido fibroso formado e a sua calcificação final.

Os fosfatos de cálcio são uma classe de biocerâmicas formados pela composição Ca/P, que podem ser sintetizados por diferentes métodos e técnicas, produzindo-se um pó, biomaterial cristalino ou amorfo. Segundo Julien (2007), o FCA tem sido encontrado em sistemas biológicos como composição de cálculos dentários e urinários. De acordo com Rey (2007) o FCA é um biomaterial, pois ocorre como uma fase intermediária durante a formação de fosfatos de cálcio no meio biológico e em sistema aquoso corresponde em composição à HA deficiente em cálcio. Análises por microscopia eletrônica de transmissão mostram que o FCA é formado por aglomerados de pequenas partículas esféricas amorfas com diâmetros de 20 a 120 nm. Há a possibilidade que o FCA apresente uma estrutura semelhante à da HA, mas

como os cristais são muito pequenos esta fase aparece como amorfa. Alguns autores descrevem a ocorrência de dois tipos de FCA, denominados de ACP1 e ACP2, os quais apresentam a mesma composição, diferindo apenas em morfologia. As morfologias características para estes compostos são, respectivamente, grãos esféricos e morfologia flocular. No trabalho de Silva et al. (2014) as fibras do FCA que mostravam os melhores resultados apresentavam como características a falta de ordem cristalina caracterizando a sua forma amorfa com presença de água no espaço intersticial entre as fibras formadoras deste material e com biocompatibilidade considerada como aceitável acima do nível de toxicidade tolerada, tendo a formação de trincas e fissuras compatíveis com o material estudado e considerando que este permite ligações com outros materiais como a hidroxiapatita, pois a composição coaxial de cada fibra de formação deste material possui morfologia trabecular adequada permitindo ancoramento celular e dissolução compatível para ligação com outros materiais e, assim, permitindo a formação de novos tecidos tendo trabeculação e preenchimento de espaços.

As características que o FCA apresenta, segundo Guastaldi e Aparecida (2010), é principalmente a habilidade de transformação a outros fosfatos de cálcio: reconhece-se que o FCA ocorra como uma fase metaestável nos estágios iniciais da formação de fosfatos de cálcio a partir de soluções aquosas supersaturadas, em pH neutro ou alcalino e, também, durante a mineralização dos tecidos vivos. Pode converter-se diretamente a HA ou tendo como fases intermediárias fosfato octacálcico e HA deficiente em cálcio. Ainda segundo estes autores, pela sua maior solubilidade do FCA em comparação à HA torna-se uma característica importante para a sua utilização como biomaterial, pois lhe confere maior velocidade de degradação no meio biológico. A velocidade de degradação de um material está fortemente relacionada à osteocondutividade e desempenha papel importante na fixação inicial de implantes com o tecido ósseo. Um material solúvel possibilita a troca de íons Ca^{++} e PO_4^{---} com o meio biológico, facilitando o crescimento ósseo e sua consequente velocidade de formação.

Outra característica do fosfato de Cálcio, segundo Dekker (2005), é a proliferação celular e osteocondutividade: a utilização de fosfato como biomaterial vem crescendo acentuadamente, pois estudos revelam que este composto apresenta estas duas características mais acentuadas que da HA devido à sua maior velocidade de reabsorção. A reabsorção do fosfato estimula a regeneração óssea logo nos estágios iniciais de aposição óssea, sendo seguida pela formação de novo tecido ósseo. Dessa forma, o fosfato é considerado um substituto ósseo mais adequado que a HA em aplicações onde se requer rápida formação

óssea. Imaizumi et al. (2006) afirma que o fosfato possui maior velocidade de reabsorção, que é seguida pela formação de novo tecido ósseo. Sendo este um substituto ósseo mais adequado que a HA em aplicações onde se requer rápida formação óssea.

Viswanath et al. (2006) destaca que dentre estas biocerâmicas, se destacam em particular a hidroxiapatita estequiométrica com razão cálcio/fósforo (Ca/P), o fosfato tricálcico- α (TCP- α) e fosfato tricálcico- β (TCP- β) por serem estes biomateriais naturalmente bioativos e por apresentarem boas características de dissolução, absorção e de biodegradação, o que favorecem a sua osseoindução, a osseointegração, a substituição óssea e o preenchimento com indicação de neoformação óssea, quando implantados em meio biológico.

No material proposto neste trabalho, segundo Silva et al. (2014), a apresentação em fibras do FCA provoca alcalinidade que leva a adesão celular. Tem formato semelhante a algodão natural com funções hemostáticas que permite que este material seja considerado, por possuir fibras emaranhadas, uma grande biocompatibilidade, osteointegrabilidade e importantíssimo no controle de remodelação óssea devido a sua osteoindução, preparando o material para neoformação óssea.

2.4 O uso dos enxertos

A boa estabilidade inicial do implante, o volume ósseo suficiente e de qualidade adequada influenciam o resultado cirúrgico de implantes osteointegráveis. Portanto rebordos alveolares demasiadamente reabsorvidos após a perda dental consistem em um possível fator limitante para instalação de implantes (WIDMARK, 1997² *apud* BARBOSA, 2013, p. 63-68).

De acordo com Giannoudis et al. (2005) são utilizados anualmente para reparação e reestruturação de defeitos ósseos cerca de 2,2 milhões de enxertos tanto na odontologia como na medicina. A utilização de enxertos ósseos representa uma alternativa viável na tentativa de regeneração do tecido ósseo perdido (BOYNE, 2001, LOGEART-AVRAMOULOU et al., 2005).

Kunert-Keil (2011) descrevem uma diminuição no número de procedimentos de enxertos ósseos autógenos devido às suas desvantagens como, por exemplo, a quantidade de

² inserir em nota rodapé a referência de WIDMARK, 1997

limitada de material de enxerto ósseo e o risco de transmissão de doenças entre outros, o que estimula a busca por métodos alógenos.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho objetiva avaliar o processo de reparação e neoformação tecidual óssea em alvéolos de ratos submetidos à enxertia pós-exodontica imediata com fosfato de cálcio amorfo.

3.1. Objetivos Gerais

- Avaliar a variação de massa corpórea dos animais como resposta a exodontia do incisivo superior,
- Avaliar a variação de massa corpórea dos animais frente à resposta pós operatória da exodontia do incisivo superior e desta exodontia acompanhada da inserção de biomateriais.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar in vivo a biocompatibilidade do fosfato de cálcio amorfo apresentado na forma de filamentos,
- Avaliar as propriedades osteoindutoras do fosfato de cálcio amorfo,
- Avaliar o processo de reparação alveolar na condição de enxertia com fosfato de cálcio amorfo comparado a hidroxiapatita,
- Analisar a neoformação óssea quando utilizado o FCA como material de enxertia alveolar imediata.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos realizados neste experimento foram conduzidos de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e tiveram sua aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUAVet) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) de acordo com o protocolo nº 2363/2011.

4.1 Animais

A metodologia aplicada está de acordo com a empregada em diversos estudos de avaliação do comportamento dos materiais de preenchimento ósseo, e, principalmente na escolha do modelo animal (GUIMARÃES et al., 2011). Este critério visou evitar interferências de fatores hormonais e trabalhar em condições metabólicas e fisiológicas ideais.

Foram utilizados 44 ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar, adultos, machos, com peso médio de 500 g, oriundos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Durante o período do experimento esses animais foram mantidos no biotério do Departamento de Anatomia do ICB-USP, abrigados em gaiolas com leito de maravalha, coletivamente em grupos de 4 animais no período pré-operatório e individualmente em pós-operatório até a eutanásia. Foram alimentados com uma dieta composta de ração seca balanceada (Guabi Nutrilabor - Ratos e Camundongos) e de água, *ad libitum*. Também foram observadas condições controladas de temperatura (21° C) e de fotoperíodos de claro/escuro (de 12 por 12 horas), com início do claro às 07:00 h.

Os animais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos, sendo 1 Grupo Controle e 3 Grupos Experimentais (receptores do material de enxertia). Individualmente foram nomeados por um binômio de letras e número, sendo o primeiro identificador do Grupo e o segundo o identificador do indivíduo dentro daquele grupo conforme Quadro 4.1.1.

Para todos os grupos a eutanásia se deu aos 28 dias de pós-operatório.

Quadro 4.1.1 – Grupos, identificação e número de animais utilizados no experimento

Grupo	1º Identificador	2º Identificador	Nº Animais
Controle – CT	CT	1, 2, 3, ... 8	8
Enxertados com FCA	FCA	1, 2, 3, ... 12	12
Enxertados com HA	HA	1, 2, 3, ... 12	12
Enxertados com FCAHA	FCAHA	1, 2, 3, ... 12	12

Foram realizadas as pesagens dos animais na sua condição pré-operatória imediata e também no momento imediatamente anterior à sua eutanásia. Esses dados foram registrados, tabulados e então calculadas as médias aritméticas das variações entre o peso inicial e o final para cada grupo.

4.2 Materiais de Enxertia

O composto alvo deste estudo foi o fosfato de cálcio amorfo (FCA) - amorphous calcium phosphate (ACP) - apresentado em forma de fibras (à semelhança de textura da lã de vidro). Essa apresentação é inovadora sendo que tal produto, até esta data, ainda não se encontra comercialmente disponível (Figura 4.2.1). Quando em meio aquoso seu pH se estabiliza em 6,0 após 30 minutos, em temperatura ambiente (entre 20-25° C).

Como material complementar comparativo elegeu-se a Hidroxiapatita (HA) de origem bovina, reabsorvível e com uma granulação entre 250 µm e 450 µm (Figura 4.2.2) e obtida por calcinação a 600°C. Esta tem um pH próximo a 7,0 quando em meio aquoso por 1 hora (produto comercial: LUMINA-BONE – grânulos finos, Critéria Ltda.).

Ambos biomateriais têm seu processo de esterilização realizado por raios Gama e foram utilizados de maneira a obter-se o total preenchimento do alvéolo alvo (exceto no grupo Controle - CT) seguindo-se como descrito no quadro 4.2.1.

Quadro 4.2.1 – Porcentagem de biomaterial utilizado no preenchimento da loja alveolar

Grupo	Biomaterial (% em volume)
Controle – CT	Nenhum
Enxertados com FCA	100% de FCA
Enxertados com HA	100% de HA
Enxertados com FCAHA	50% FCA + 50% HA

Figura 4.2.1 – Fosfato de Cálcio Amorfo.

Aspecto macroscópico do fosfato de cálcio amorfo em sua apresentação filamentar.

Fonte: Fotografia realizada pelo autor (Canon EOS 400D, objetiva grande angular 18-55 mm)

Figura 4.2.2 – Hidroxiapatita LUMINA-BONE.

Apresentação comercial de uma embalagem unitária de hidroxiapatita Lumina-Bone com granulação fina.

Fonte: <http://criteria.com.br/site/linha-de-produtos/lumina-bone/bone-fino>

4.2.1 Caracterização industrial e comercial do FCA

O material foi desenvolvido pelos Doutores Francisco José Correa Braga (pesquisador: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN) e Antonio Carlos da Silva (pesquisador: Consulmat Produtos técnicos, Indústria e Comércio Ltda.). Tem seu pátio industrial na cidade de São Carlos, SP (Critéria Indústria e Comércio de Produtos Medicinais e Odontológicos Ltda. – ME, CNPJ: 08444319/0001-18) e seu registro comercial sob o nome

de LUMINA-ACP. O pedido de sua patente está sob número BR 10 202012 011 632 4 e na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) encontra-se em avaliação sob o protocolo de número 25351.531513/2012-61.

O método de obtenção é baseado no processo de Hager-Rosengarth, patenteado em 1929 inicialmente para confecção de fibra de vidro.

A apresentação do FCA em fibras é feita industrialmente através da fusão de matérias-primas fornecedoras de fósforo (P_2O_5 – pentóxido de fósforo) e de cálcio (CaO – óxido de cálcio). Primeiramente sua reação é lenta e na presença de água, pois a mistura de ambos é explosiva. Depois a mistura é dessecada previamente à fusão onde forma-se o líquido precursor, sob uma temperatura de $1500^{\circ}C$. Esse líquido é submetido à trefilamento sob alta velocidade, onde o controle cinético e térmico favorece a obtenção de fios em tamanhos e diâmetros desejados. Existe a passagem forçada desse líquido através de orifícios em bocais de platina, sendo seguido de um super-resfriamento controlado até alcançar a temperatura ambiente.

4.2.2 Caracterização estrutural e química do FCA

O fosfato de cálcio amorfo ($Ca_3(PO_4)_2 \cdot nH_2O$) é um composto precursor da hidroxiapatita sua apresentação na forma cristalina ($Ca_3(PO_4)_6(OH)_2$).

O processo de trefilamento produz fibras que observadas sob microscopia eletrônica de varredura (microscópio Hitachi Table Top TM3000) apresentam-se como demonstrado na Figura 4.2.2.1 (A-C).

Figura 4.2.2.1. – Fibras de Fosfato de Cálcio Amorfo

Aspecto do feixe de fibras obtidas pelo processo de trefilamento e analisadas sob microscopia eletrônica de varredura.

Aumentos: A – 100x, B – 800x, e C – 2500x.

Fonte: Microfotografias cedidas pelo Prof. Dr. A.C. Silva realizadas no Laboratório de Materiais do IPEN

Materiais cristalinos sofrem fraturas em planos preferenciais, ao mesmo tempo que os amorfos (que neste caso se aproxima dos compostos vítreos) sofrem um tipo de fratura denominada em “conchilamento”, ou seja, sugerindo a forma de conchas (NAVARRO, 2003).

A observação em MEV também pôde caracterizar o material como amorfo uma vez que, nas áreas onde as fibras mostravam-se fraturadas, pode-se perceber que a sua região interna apresentava aspecto de fratura compatível com a ~~essa~~ condição (figura 4.2.2.2).

Figura 4.2.2.2 - Fibras de FCA fraturadas.

AG

A

D9.1

30 µm

A região da fratura mostra-se em conchilhamento. Aumento de 2500x

Fonte: Microfotografia cedida pelo Prof. Dr. A.C. Silva realizada no Laboratório de Materiais do IPEN

Ao ser submetido ao ensaio de dissolução em SBF durante um período de 7 dias e mantido aos 37°C pode-se observar a fragmentação de sua camada externa (figura 4.2.2.3: A-B) e a formação de um material de aspecto trabecular entre esta e o núcleo da fibra, como observado na figura 4.2.2.4 (A-D).

Figura 4.2.2.3. – Fibras de FCA após ensaio de imersão em SBF por 7 dias e mantido a 37°C

Figura 4.2.2.3 A

Figura 4.2.2.3 B

Observa-se a fragmentação das camadas mais externas. A – Aumento de 500x e B – Aumento de 1500x.
Fonte: Microfotografias cedidas pelo Prof. Dr. A.C. Silva realizada no Laboratório de Materiais do IPEN

Figura 4.2.2.4. – Fibras de FCA após ensaio de imersão em SBF

Figura 4.2.2.4 A

Figura 4.2.2.4 B

Figura 4.2.2.4 C

Figura 4.2.2.4 D

Observa-se um aspecto trabecular numa camada formada entre o núcleo a parte mais externa.

Aumentos: A –1500x, B –1500x, C –2000x e D –8000x.

Fonte: Microfotografias cedidas pelo Prof. Dr. A.C. Silva realizadas no Laboratório de Materiais do IPEN

Quando as fibras foram submetidas à imersão em água destilada durante um período de 7 dias e mantido aos 37°C observou-se a formação de depósitos da fase cristalina do material na camada externa da fibra. Isso é um indicativo de biotividade. Ainda pode-se observar a dissolução do núcleo da fibra (figura 4.2.2.5 A-B).

Figura 4.2.2.5 – Fibras de ACP após ensaio de imersão em água destilada por 7 dias a 37°C

Figura 4.2.2.5 A

Figura 4.2.2.5 B

Observa-se a deposição de material na sua camada mais externa e a corrosão do núcleo das fibras.

A – Aumento de 400x e B – Aumento de 800x.

Fonte: Microfotografias cedidas pelo Prof. Dr. A.C. Silva realizada no Laboratório de Materiais do IPEN

De acordo com Silva et al (2014) quando o FCA, na forma aqui estudada, é submetido a análise por difração de RX tem um difratograma onde não se verificam

[...] picos que indiquem fases cristalinas correspondentes a compostos se fosfato de cálcio, pelo contrário, seu padrão de difração de raios-X é largo e difuso, próprio dos materiais amorfos. Contudo, neste padrão difuso, observa-se um máximo à 25 graus (2θ), característico de estruturas vítreas. Um segundo máximo, de menor intensidade observado à 42 graus (2θ), pode ser indicativo que o material seja composto de pelo menos duas fases vítreas.

O difratograma obtido neste estudo é reproduzido na figura 4.2.2.6.

Figura 4.2.2.6 – Difratograma do Lumina-ACP®

Observam-se dois picos: um máximo aos 25°C e outro mais discreto aos 42°C.

Fonte: Silva et al. (2014).

Ainda segundo Silva et al. (2014)

[...] o ensaio de citotoxicidade para o ACP realizou-se utilizando o método de incorporação do vermelho neutro, em células da linhagem NCTC 929 do banco de tecidos da ATCC. Foram preparados extratos dos materiais e colocados em contato com a cultura celular e determinado o índice de citotoxicidade IC50%.

Sobre a figura 4.2.2.7 Silva et al. (2014) continua

[...] mostra as curvas obtidas no ensaio de citotoxicidade. Nesta figura podemos observar que as fibras de ACP apresentam clara biocompatibilidade, pois a curva de viabilidade está acima de 50% (IC50%). De fato, esta curva aproxima-se do controle negativo. Desta maneira este material é indicado como não citotóxico. Este resultado é importante para materiais destinados à enxertia óssea e demonstra que o processamento do ACP para fibras não prejudica as propriedades de interesse deste biomaterial.

Figura 4.2.2.7 – Citotoxicidade do Lumina-ACP®

Curva apontando viabilidade acima de 50% o que indica o FCA (aqui nomeado Lumina-ACP) como material como não citotóxico.

Fonte: Silva et al (2014).

4.3 Anestesia

Os animais foram submetidos à anestesia geral, utilizando-se o Cloridrato de Ketamina (Ketamin – Cristália Ltda.), com dosagem de 80 mg/Kg e como sedativo, analgésico e

relaxante muscular, a Xilazina [(Cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4-H-1,3-tiazina) (Rompum - Bayer S.A.)] com dosagem de 10 mg/Kg de peso, administrados em dose única por via intraperitoneal. Com esse protocolo obteve-se uma narcose profunda, variando de 1 hora a 1 hora e trinta minutos, tempo suficiente para a realização do procedimento cirúrgico.

4.4 Instrumental Cirúrgico

Foram utilizados instrumentais da prática cirúrgica de rotina, porém, como na atuação veterinária não existem instrumentais específicos para a abordagem exodôntica de roedores de pequeno porte seguiu-se o observado nos protocolos de diversos outros autores, ou seja, a utilização de aparato oriundo de outras especialidades (odontológicos com design para utilização em humanos). A sua aplicabilidade técnica foi observada durante um prévio treinamento do operador acompanhando pesquisadores que já haviam utilizado o protocolo (BARBOSA, 2013).

Desse uso adaptado teve-se para a sindesmotomia e a luxação do incisivo superior direito à utilização de um esculpidor Hollembach 3S (Kota Imports) mostrado na figura 4.4.1. Uma vez luxado, a avulsão do elemento dental foi realizada com um fórceps odontopediátrico de número de referência 44 (Quinelato - Schobell Industrial Ltda.) representado na Figura 4.4.2.

Figura 4.4.1 – Esculpidor Hollembach

Fonte: Fotografia realizada pelo autor (Canon EOS 400D, objetiva grande angular 18-55 mm)

Figura 4.4.2 – Fôrceps de número 44

Fonte: Fotografia realizada pelo autor (Canon EOS 400D, objetiva grande angular 18-55 mm)

Na busca de uma melhor inserção dos biomateriais optou-se pela confecção de uma ferramenta adaptada. Para tal foi utilizado como base um Condensador de Paiva nº4 (utilizado em procedimentos de endodontia). Este possui originalmente uma ponta ativa cilíndrica e retificada (Figura 4.4.3). Sua ponta ativa é achatada.

Figura 4.4.3 – Condensador modelo Paiva nº4

Fonte: Fotografia realizada pelo autor (Canon EOS 400D, objetiva grande angular 18-55 mm)

Foi promovido um encurvamento da ponta ativa para que a mesma acompanhasse a morfologia da loja alvo da enxertia.

A preparação e a modificação do instrumento foram realizadas pelo autor amparadas em duas referências.

Fisicamente referenciada pela anatomia externa de um incisivo superior (Figura 4.4.4) obtido a partir de um animal adulto descartado de outros experimentos.

Figura 4.4.4 – Incisivo superior Direito de um Rato Wistar adulto

Fonte: Fotografia realizada pelo autor (Canon EOS 400D, objetiva grande angular 18-55 mm)

E também lançou-se mão de imagens radiográficas de uma amostra oriunda do grupo controle após sua eutanásia e dissecação (Figura 4.4.5 – A e B). Foram realizadas duas tomadas em duas diferentes incidências: uma latero-lateral e outra dorso-ventral.

Utilizaram-se películas radiográficas periapicais de uso odontológico (3,0x4,0 cm - Dental Intraoral E-Speed Film – Kodak) e como gerador de radiação X um equipamento de odontológico (Funk RX-10) operando a 60KV, 10mA, com cilindro orientador aberto. A distância foco-receptor foi de 25 cm e o tempo de exposição de 0,5s. A revelação foi realizada manualmente em câmara escura portátil (tempo de revelação: 25s, tempo de fixação: 5 minutos).

Figura 4.4.5 – Tomadas radiográficas do crânio de um animal do grupo Controle após sua eutanásia e dissecação

Figura 4.4.5 A

Figura 4.4.5 B

A- Incidência radiográfica latero-lateral. Pode-se evidenciar o incisivo superior e a posição que ele ocupa no crânio.

B – Incidência radiográfica dorso-ventral. Pode-se observar a presença do incisivo superior Esquerdo e a ausência do correspondente elemento do lado Direito.

Fonte: Fotografias realizadas pelo autor (Canon EOS 400D, objetiva grande angular 18-55 mm)

Após o encurvamento fez-se uma dobradura de compensação para melhorar o ângulo de trabalho adequando-se ergonomicamente o instrumento à postura do operador destro (Figura 4.4.6 – A e B).

Figura 4.4.6 – Condensador de Paiva nº 4 modificado pelo autor.

Figura 4.4.6 A

Figura 4.4.6 B

A- Evidenciando-se a curvatura realizada para acompanhar a anatomia alveolar,

B - Evidenciando-se a dobradura para compensação do ângulo de trabalho

Fonte: Fotografias realizadas pelo autor (Canon EOS 400D, objetiva grande angular 18-55 mm)

4.5 Técnica Cirúrgica

As intervenções deram-se nas dependências do Laboratório de Biologia Celular e Anatomia Funcional (LBCAF) do ICB-USP e foram observados ao máximo os princípios de biossegurança dentro dos limites possíveis daquele espaço. Assim zelou-se pela cadeia asséptica procurando-se evitar quaisquer riscos de processos infecciosos nas áreas cirúrgicas e adjacentes. Esses levariam tanto ao comprometimento dos resultados do experimento como também do desenrolar adequado, tranquilo e digno do pós-operatório dos espécimes operados.

Depois de submetidos à anestesia geral foi conduzida a exodontia do incisivo superior direito. Nos animais destinados ao Grupo Controle procedeu-se a sutura oclusiva do bordo gengival após a devida averiguação se o mesmo apresentava-se preenchido por coágulo sanguíneo. Em caso negativo procedia-se uma leve curetagem das paredes alveolares do elemento avulsionado para que houvesse sangramento e o devido preenchimento. Nos animais dos outros grupos buscou-se o total preenchimento alveolar com o(s) biomaterial(is) sendo, somente depois disso, realizada a sutura para a oclusão dos bordos gengivais.

Antes da inserção no alvéolo os biomateriais (quer individualmente, quer na forma de mistura) foram previamente hidratados com soro fisiológico 0,9% (ADV Farma) a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Estes foram inseridos em pequenas porções pela abertura do alvéolo e, com auxílio do condensador modificado, conduzidos em direção apical. Ao encontrar-se resistência era feita compactação dos mesmos. O procedimento foi repetido quantas vezes necessário até o completo preenchimento da loja alveolar.

4.5.1 Protocolo Cirúrgico

As etapas executadas como protocolo foram os abaixo relacionados:

- a) Submissão à anestesia geral,
- b) Posicionamento do animal em decúbito dorsal sobre um campo cirúrgico estéril,
- c) Antissepsia intraoral com gaze embebida em Clorexidina 0,2% (Riohex - Rioquímica),
- d) Antissepsia extraoral com gaze embebida em Iodopovidona (PVPI - polivinilpirrolidona-iodo – Povidine Tópico - Johnson Diversey),

- e) Recobrimento do animal com um campo cirúrgico fenestrado estéril,
- f) Sindesmotomia do incisivo superior direito,
- g) Luxação do elemento dental,
- h) Exodontia,
- i) Preenchimento da loja alveolar
 - 1) Para o Grupo Controle:

Averiguação da formação de coágulo para preenchimento do alvéolo (curetagem alveolar se necessária),
 - 2) Para os Grupos restantes:

Completo preenchimento do alvéolo dental com o respectivo material de enxertia designado para aquele grupo,
- j) Sutura oclusiva do bordo gengival realizada com ponto em “X” (ou cruzado) e utilizando-se fio de seda preta trançada 4-0 agulhado X-17 (agulha de 17 mm, com corte reverso e em meio-círculo, marca Ethicon® – Johnson & Johnson),
- k) Averiguação da hemostasia do loco cirúrgico,
- l) Limpeza pós-operatória dos tecidos intra e extraorais com gaze embebida em soro fisiológico 0,9%. Visou-se a remoção de eventuais resíduos hemorrágicos oriundos do procedimento e também dos antissépticos utilizados,
- m) Administração da medicação pós-operatória composta por cobertura antibiótica, anti-inflamatória e analgésica,
- n) Repouso do animal no leito em gaiola e seu acompanhamento até o retorno da anestesia.
- o) Reencaminhamento do animal ao biotério.

4.6 Medicação Pós-operatória

Imediatamente após o procedimento cirúrgico e ainda sob indução anestésica foi ministrada por via intramuscular em dose única uma combinação de antibiótico, anti-inflamatório e analgésico.

Essa administração foi composta pela associação do antibiótico benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina procaína, benzilpenicilina potássica, diidroestreptomicina base (sulfato) e estreptomicina base (sulfato) (Pentabiótico veterinário pequeno porte – Fort

Dodge) na dosagem de 1 ml/Kg e do anti-inflamatório e analgésico Flunixinina (Banamine injetável 10mg – Schering Plough Veterinária) na dosagem de 0,1 ml/Kg.

4.7 Cuidados Pós-operatórios

Após o período de observação do retorno de pós-operatório os animais foram reconduzidos ao biotério onde tinham água e ração balanceada *ad libitum*, sendo que esta, nas primeiras 48 horas, foi oferecida triturada e umedecida.

Como suporte medicamentoso analgésico foi oferecido Acetaminofeno (Paracetamol) na quantidade de 2 mg/100 ml dissolvidos na água de consumo por um período de 3 dias.

Os animais foram monitorados diariamente quanto a sinais de complicações tais como infecção ou dor. Esta última baseada em sinais físicos e comportamentais, principalmente: respiração abdominal, cromodacriorreia (porfirina), agressividade e postura anormal (Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Instituto de Química da USP, 2013) Caso fosse observada alguma delas, oferecer-se-ia conduta medicamentosa complementar adequada. Durante todo o período pós-operatório os animais foram mantidos isolados em suas gaiolas, permanecendo nessa condição até o momento da eutanásia.

4.8 Eutanásia

No 28º dia de pós-operatório os animais foram, sob prévia indução de anestesia geral e durante seu ciclo claro de manutenção, sacrificados por overdose de agente anestésico para depressão do sistema nervoso central e dos centros respiratório e vasomotor. O protocolo de anestesia foi idêntico ao aplicado no procedimento cirúrgico. Após a observação da indução anestésica foi administrada uma segunda dose intraperitoneal de Cloridrato de Ketamina (Ketamin – Cristália Ltda.), porém numa sobredose de 300 mg/Kg.

4.9 Obtenção das amostras

O alvo de coleta foi a maxila direita dos animais. Para tal o espécime era repousado sobre um campo cirúrgico descartável e procederam-se dois cortes, realizados com tesoura reta e de ponta romba, nas comissuras labiais direita e esquerda com objetivo de melhorar o acesso e a visibilidade do campo operatório. Esse corte estendeu-se até o ponto onde conseguia-se o rebatimento da mandíbula e a plena exposição do palato. Nesse momento também procedeu-se o corte transversal dos arcos zigomáticos ao longo do seu trajeto em direção ao osso temporal. As amostras foram dissecadas com lâmina de bisturi nº 11 montada em cabo de bisturi nº 3 para remoção do máximo possível de tecidos moles (Figura 4.9.1 – A-D).

Figura 4.9.1 – Coleta e redução das amostras

Figura 4.9.1.A

Figura 4.9.1.B

Figura 4.9.1.C

Figura 4.9.1.D

Sequencia de dissecação, coleta e redução das amostras.

A – posicionamento e exposição da área. B – Corte com tesoura nas comissuras labiais.

C – Vista inferior do bloco reduzido. D – Vista lateral direita do bloco reduzido

Fonte: Fotografias realizadas pelo autor (Canon EOS 400D, objetiva grande angular 18-55 mm)

Em seguida, utilizando-se de uma navalha para micrótomo foram realizadas 2 outras secções. Um corte sagital mediano, obtendo-se a disjunção das maxilas, e um corte frontal passando imediata e posteriormente ao molar superior direito. Assim isolava-se a maxila contendo o alvéolo alvo do estudo.

Essas peças, devidamente identificadas, foram mantidas imersas em frascos individuais contendo solução fixadora de formol 10% com tampão de PBS (phosphate buffer solution – fosfato de sódio mono PA marca SAL-R).

4.10 Processamento do Material

4.10.1 Preparo do Laminário

O material coletado foi preparado para ser observado sob microscopia de luz convencional. Uma vez colhidas as amostras permaneceram na solução fixadora por um período de 7 dias. Depois de fixadas foram cuidadosamente lavadas em água corrente por 12 horas (figura 4.10.1 – A e B) e em seguida mergulhadas em solução de ácido fórmico a 20%. Esta solução era trocada a cada período de 48 horas para garantia de sua eficiência.

Figura 4.10.1 – Lavagem das amostras

Figura 4.10.1.A

Figura 4.10.1.B

Durante a lavagem das amostras estas foram mantidas individualmente em seus recipientes.

A – Processo de lavagem em água corrente por 12h. B – Aspecto das amostras já lavadas.

Fonte: Fotografias realizadas pelo autor (Canon EOS 400D, objetiva grande angular 18-55 mm)

Antes de cada troca de solução ser descartada, separava-se 5 ml da mesma e a este acrescentava-se uma solução de oxalato de sódio a 5% para acompanhamento da presença de precipitado de cálcio. A amostra só era considerada apta para corte depois que o descarte da solução descalcificadora não mais apresentava sinais de precipitado, mostrando-se com aspecto cristalino assemelhando-se à água destilada (JUNQUEIRA, JUNQUEIRA, 1983). Esse processo levava cerca de 15 dias.

Uma vez apta ao andamento do processamento as amostras foram submetidas a uma nova lavagem em água corrente por mais 12 horas. Sendo, após isso, imersas em álcool 70% e aí permaneceram por pelo menos 24 horas.

A desidratação das amostras seguiu uma série crescente de álcoois conforme o quadro 4.10.1. Onde se teve a imersão em soluções de mesma concentração foi providenciada a troca das mesmas.

Quadro 4.10.1 - Série de álcoois para desidratação

Ordem	Concentração	Tempo de submissão
1º	70%	24 horas
2º	95%	1 hora
3º	100%	1 hora
4º	100%	2 horas

Concluído o processo de desidratação iniciou-se a diafanização. Foram feitos 2 banhos sucessivos em xilol, por 30 minutos cada um e sendo a solução trocada a cada passagem. Uma vez diafanizadas as peças puderam então ser incluídas em parafina para confecção de blocos. Buscou-se o melhor posicionamento possível para que o eixo rostro-caudal da maxila ficasse perpendicular à superfície de corte da navalha do micrótomo. Isso justificou-se para que os cortes seguissem o mais fielmente possível o plano frontal e, dessa forma os alvéolos pudessem ser observados em cortes transversais em relação ao seu longo eixo.

Depois de 24 horas os blocos puderam ser submetidos a cortes de forma semi-seriada e com 5 µm de espessura (micrótomo Micron Heidelberg HM-320. Processo FAPESP 1989/3506-1) e montados em lâminas de vidro lapidadas e previamente gelatinizadas (Precision Glass Line – de 26,0 x 76,0 mm de tamanho e espessura entre 1,0 e 1,2 mm) e.

As secções montadas foram desparafinizadas primeiramente em estufa de calor seco a 60 °C (Fanem 002 CB - Brasil) por um período de 24 horas (estendido quando percebia-se que a

parafina, eventualmente, não havia escorrido por completo) e depois por 3 banhos sucessivos em xilol, sendo de 30 minutos cada um e com a troca da solução a cada passagem. A reidratação do material foi realizada por imersão sequencial em álcoois na ordem mostrada no quadro 4.10.2. Quando a série indicava a imersão em soluções de mesma concentração se providenciava a troca das mesmas.

Quadro 4.10.2 - Série de álcoois para reidratação

Ordem	Concentração	Tempo de submissão
1º	100%	2 minutos
2º	100%	2 minutos
3º	95%	2 minutos
4º	95%	2 minutos
5º	85%	2 minutos
6º	70%	2 minutos

4.10.2 Coloração por Hematoxilina-Eosina (HE)

As lâminas selecionadas para análise sob esta coloração foram processadas dentro dos parâmetros usuais. Uma vez desparafinizadas fez-se a lavagem em água corrente por 5 minutos. Em seguida foram imersas em solução filtrada de hematoxilina de Harris (5 g de hematoxilina cristalizada, dissolvida em 100 ml álcool 95%, 20 g de alúmen de amônio ou potássio, 3 g de óxido de mercúrio (vermelho), 2 a 4 ml de ácido acético e água destilada 1000 ml – BEHMER, 1976) por um período de 10 minutos e novamente submetidas à lavagem em água corrente por 10 minutos. Seguiu-se com a imersão em solução de eosina por 5 minutos e a lavagem em água corrente por mais 10 minutos. Após a secagem espontânea procedeu-se a montagem final com a colagem das lamínulas com Entellan[®] (Merck Millipore Brasil).

4.11 Análise histológica e fotomicrografias

O laminário obtido foi analisado sob microscopia de luz convencional. Essa documentação foi registrada digitalmente utilizando-se um fotomicroscópio Eclipse E600 (Nikon - Japão. Processo FAPESP 98/11738-9) acoplado a um computador com a instalação do software NIS Elements - Advanced Research (Versão 2.22, Nikon Instruments Inc – Japão. Processo FAPESP 2007/50015-3). Esse conjunto pertencente ao LBCAF do ICB USP.

O material foi avaliado de maneira a observar os tipos celulares característicos do tecido ósseo e do seu processo de reparação e também a distribuição e a diferenciação entre o osso primário, o osso neoformado e a presença de tecidos ainda não mineralizados consequentes do processo inicial de reparação (tecido osteóide e coágulo sanguíneo).

Entende-se por:

- Osso Primário: o tecido ósseo já existente no momento da cirurgia. Esse osso alveolar (OA) é aquele constituído pelo processo alveolar, com suas paredes corticais e porções trabeculares,
- Osso Neoformado: é aquele que aparece depois do momento cirúrgico. A deposição dos cristais de apatita revela-se diferenciada porém ainda não totalmente organizada,
- Tecido Osteóide: a matriz orgânica depositada pelo processo de reparação e que servirá de arcabouço para a deposição mineral.

As fotomicrografias foram tratadas digitalmente em software de edição de imagens (ThumbsPlus Pro versão 8.0 – Cerious Software Inc.) para melhor caracterização das observações celulares e teciduais. As alterações se limitaram a ajustes nos padrões de contraste, luminosidade e gama.

4.12 Análise Histomorfométrica

Inicialmente, para proceder-se esta análise, cada uma das fotomicrografias obtidas teve digitalmente aplicada sobre si a imagem de um gradil regular na dimensão de seus quadros (30 horizontais x 22 verticais – Figura 4.12.1) e que a cobria por completo (Figura 4.12.2).

Desta feita procedeu-se a contagem daqueles quadros que qualitativamente se encontravam preenchidos pela estrutura alvo por ao menos 50% da sua área.

Figura 4.12.1 – Reprodução do Gradil utilizado na histomorfometria

Imagem representativa do gradil composto por 30 quadrados horizontais e 22 verticais.

Figura 4.12.2 – Fotomicrografia com a sobreposição do gradil

Exemplo da composição da montagem das imagens para contagem das estruturas de interesse utilizando a sobreposição do gradil sobre a fotomicrografia analisada.

Para cada imagem foram avaliadas as relações que seguem abaixo, sendo que por “Área” entende-se o número absoluto de quadros contados para aquela observação.

- Porcentagem de Coágulo (Coa)

Avaliação da área ocupada pelo coágulo oriundo do preenchimento alveolar imediato à exodontia na superfície delimitada pela cortical alveolar. Obtida a partir da fórmula:

$$Coa (em \%) = \frac{\text{Área de Coágulo} \times 100}{\text{Área Total do Alvéolo}}$$

- Porcentagem de Osso Neoformado (ONf)

Avaliação da neoformação óssea em toda a área delimitada pela cortical alveolar. Obtida a partir da fórmula:

$$ONf (em \%) = \frac{\text{Área de Osso Neoformado} \times 100}{\text{Área Total do Alvéolo}}$$

- Porcentagem de Tecido Osteóide (Ost)

Avaliação da deposição da matriz orgânica em toda a área delimitada pela cortical alveolar. Obtida a partir da fórmula:

$$Ost (em \%) = \frac{\text{Área de Tecido Osteóide} \times 100}{\text{Área Total do Alvéolo}}$$

- Porcentagem de Vasos (Vas)

Avaliação da área ocupada por vasos sanguíneos formados durante a cicatrização do leito cirúrgico. Obtida a partir da fórmula:

$$Vas (em \%) = \frac{\text{Área dos Vasos} \times 100}{\text{Área Total do Alvéolo}}$$

Os biomateriais não foram mensurados porque não poderiam ser efetivamente comparados entre grupos em que não foram utilizados. Ainda: o FCA sofre reabsorção completa dentro do período estudado, não permitindo a sua contabilização.

4.13 Análise Estatística

Para o estudo estatístico os dados obtidos foram avaliadas na forma de suas médias para cada grupo estudado. Assim foram realizadas análises de variância por teste T não-pareado (para comparação entre dois grupos de dados) e por ANOVA (quando examinados três ou mais grupos simultaneamente).

Para ambos os testes o valor de $P < 0,05$ foi o parâmetro de significância utilizado.

Todo o estudo estatístico foi realizado submetendo-se os valores obtidos à análise em computador por um software para esse uso específico (GraphPad InStat – Version 3.00, GraphPad Software Inc.).

Primeiramente foi realizada uma análise de variância (ANOVA) entre todos os dados obtidos para uma visão geral do quadro de significância. Em seguida realizou-se sequencias de teste T não-pareado para a comparação combinando-os dois a dois entre as diversas relações propostas e viáveis.

5 RESULTADOS

5.1 Observações Experimentais

O procedimento cirúrgico foi, de maneira geral, bem suportado pelos animais. À inspeção visual as áreas operadas evoluíram de maneira positiva demonstrando mucosas de cor e textura usuais e apontando para a integridade tecidual. Os animais estudados mostraram um desvio para mesial do incisivo superior esquerdo e um desgaste incisal irregular dos dentes antagonistas. A figura 5.1.1 mostra um caso que reflete a condição geral observada.

Figura 5.1.1 – Aparência do loco cirúrgico aos 28 dias de pós-operatório

Aspecto visual do leito cirúrgico (➔) de um dos animais aos 28 dias de pós-operatório, momento coincidente com a eutanásia. Percebe-se a normalidade das mucosas, a mesialização do incisivo superior esquerdo e o desgaste irregular dos antagonistas.

Fonte: Fotografia realizada pelo autor (Canon EOS 400D, objetiva grande angular 18-55 mm)

5.2 Evolução da massa corpórea

Em todos os grupos os registros da média de variação da massa mostraram uma curva descendente para o período observado (Gráfico 5.2.1).

As médias (por grupo) assim como as alterações em percentual retornaram o que segue, juntamente com a análise de variância por teste T não-pareado:

- Grupo CT

Uma variação média de massa -30,67 g.

Alteração percentual média de $-5,73 \pm 5,21$ e um valor de $P = 0,0726$.

- Grupo FCA

Uma variação média de massa -44,00 g.

Alteração percentual média de $-7,98 \pm 2,81$ e um valor de $P = 0,1697$.

- Grupo HA

Uma variação média de massa -31,20 g.

Alteração percentual média de $-6,84 \pm 3,58$ e um valor de $P = 0,2298$.

- Grupo FCAHA

Uma variação média de massa -25,83 g.

Alteração percentual média de $-5,90 \pm 2,16$ e um valor de $P = 0,2402$.

Dentro de cada grupo o valor de P sugere que as alterações não foram significativas.

A variação percentual média de massa corpórea foi de $-6,61 \pm 1,04$. O resumo desses dados aparece descrito na tabela 5.2.1.

A análise de variância entre as médias dos grupos retornou um $P = 0,4780$, interpretado como que as alterações entre estes não têm significância.

Gráfico 5.2.1 – Variação de massa corpórea por grupo de animais.

Médias (em gramas) dos pesos iniciais e dos pesos finais por grupo estudado.
 Inicial: peso pré-operatório imediato. Final: peso imediatamente anterior à eutanásia.

Tabela 5.2.1 – Variação de massa corpórea por grupo de animais.

Grupo	Peso Médio Inicial (g)	Peso Médio Final (g)	Variação	
			G	%
CT	519,67	489,00	-30,67	-5,73
FCA	551,67	507,67	-44,00	-7,98
HA	461,80	430,60	-31,20	-6,84
FCA/HA	443,17	417,33	-25,83	-5,90
Média			-32,93	-6,61
DP			±7,77	±1,04

Dados apresentados na forma das médias dos pesos iniciais e dos pesos finais por grupo estudado.

A variação (em g e em %) indica a diferença entre essas médias.

Peso inicial: pré-operatório imediato. Peso final: imediatamente anterior à eutanásia.

DP: desvio padrão.

A análise de variância obtida por ANOVA realizada entre todas as médias obtidas retornou um valor de $P = 0,4780$. Também apontando para uma diferença não significativa.

5.3. Aspectos macroscópicos das amostras

Ao exame visual do palato dos animais verificou-se uma boa resposta cicatricial no que dizia respeito à mucosa alveolar, que promoveu a oclusão da entrada da loja alveolar.

Macroscopicamente as amostras não apresentavam quaisquer sinais que as desabonassem para o seu processamento histológico. Foram observados, por exemplo, sinais de infecções (ativas ou sequeladas), úlceras e fraturas (eventualmente oriundas do protocolo de redução) – figura 5.3.1 – A e B.

Figura 5.3.1 – Aspecto macroscópico de uma das amostras

Figura 5.3.1 A

A – Vista ventro-lateral Direita. Mucosa palatina (P) e leito cirúrgico (→) de um dos animais aos 28 dias de pós-operatório.

Figura 5.3.1 B

B – Vista ventro-lateral Esquerda.

Fonte: Fotografias realizadas pelo autor (Canon EOS 400D, objetiva grande angular 18-55 mm)

5.4 Análise histológica sob microscopia de luz convencional

5.4.1 Análise do grupo Controle

O grupo Controle apresentou trabéculas de tecido mineralizado que acompanharam o processo clássico descrito para a formação óssea alveolar. Sob uma ótica generalista observou-se uma deposição centrípeta, com trabéculas ósseas em diferentes estágios de maturação sendo observado tecido mais maduro na periferia do alvéolo (junto às suas corticais) e de aspecto mais osteóide nas regiões mais internas. Os tipos ósseos primário e neoformado além do tecido osteóide puderam ser nitidamente diferenciados (Figuras 5.4.1.1 – A e B).

Na superfície das trabéculas encontrou-se a ocorrência de osteoblastos e de osteoclastos. Foram também observados osteócitos no interior do tecido ósseo e fibroblastos ocupando os espaços intertrabeculares. Estes últimos também foram observados nas áreas de osso imaturo e no entorno do coágulo remanescente (Figuras 5.4.1.2 – A e B).

Em todas as amostras foi verificada a presença difusa de vasos sanguíneos e um evidente remanescente de coágulo em situação central ou paracentral em relação à loja alveolar.

Figura 5.4.1.1 – Aspecto geral os alvéolos do grupo Controle

Figura 5.4.1.1 A – Caracterizações teciduais do grupo Controle

Corte transversal de alvéolo de um animal do grupo Controle. HE. 20x.
Coágulo (**Coa**), osso alveolar (**OA**), osso neoformado (**ONf**) e osteóide (**Ost**).

Figura 5.4.1.1 B – Caracterizações teciduais do grupo Controle

Corte transversal de alvéolo de um animal do grupo Controle. HE. 20x.
Coágulo (**Coa**), osso alveolar (**OA**), osso neoformado (**ONf**) e osteóide (**Ost**).

Figura 5.4.1.2 – Aspecto geral os alvéolos do grupo CT

Figura 5.4.1.2 A – Caracterizações teciduais do grupo CT

Corte transversal de alvéolo de um animal do grupo Controle. HE. 200x. Osteoblastos (**Ob**), osteoclastos (**Oc**), fibroblastos (**Fb**) e vasos sanguíneos (**Vas**).

Figura 5.4.1.2 B – Caracterizações teciduais do grupo Controle

Corte transversal de alvéolo de um animal do grupo Controle. HE. 200x. Osteoblastos (**Ob**), em característico arranjo de “colar” ou rima”, osteoclastos (**Oc**), fibroblastos (**Fb**) e vasos sanguíneos (**Vas**)

5.4.2 Análise do grupo FCA

No grupo de animais enxertados com FCA verificou-se a presença de trabéculas de tecido mineralizado em diferentes estágios de maturação. Vasos sanguíneos foram encontrados em dispersão por toda a área alvo, porém a figura do coágulo central ou paracentral desapareceu. Isso por conta de que, a respeito da deposição do tecido ósseo neoformado, este abrangeu amplamente o espaço alveolar. Foram observadas algumas pequenas massas de coágulo dispersas pela loja alveolar.

À semelhança do grupo Controle os tipos ósseos também puderam ser bem diferenciados, porém sem a característica centrípeta daquele. Tecido neoformado e osteóide apareceram entremeando-se e ocupando toda a extensão da loja alveolar (Figura 5.4.2.1).

A distribuição de osteoblastos, osteoclastos e fibroblastos ocorreu de maneira semelhante ao do grupo Controle.

Figura 5.4.2.1 – Aspecto geral da distribuição tecidual nos alvéolos do grupo FCA

Corte transversal de alvéolo de um animal do grupo FCA. HE. 20x.
Coágulo (Coa) disperso, osso alveolar (OA), osso neoformado (ONf) e osteóide (Ost).

5.4.3 Análise do grupo HA

Como primeira observação percebeu-se a presença dos cristais de hidroxiapatita ainda não reabsorvidos nitidamente ocupando a loja alveolar e também a deposição de tecido cicatricial ao seu redor evidenciando uma interface entre material e tecido ósseo.

Foi observada a presença de vasos sanguíneos por todo o alvéolo assim como pequenas massas de coágulo, porém sem que estes se concentrassem em quaisquer áreas em especial.

Os cristais apareceram concorrendo no espaço alveolar com outras estruturas, o que mostrou uma alteração em relação à distribuição espacial dos tecidos quando comparado aos grupos CT e FCA.

Os tipos ósseos (Figura 5.4.3.1) e a distribuição celular mantiveram-se característicos.

Figura 5.4.3.1 – Aspecto geral da distribuição tecidual nos alvéolos do grupo HA

Corte transversal de alvéolo de um animal do grupo FCA. HE. 40x.
Coágulo (**Coa**), osso alveolar (**OA**), osso neoformado (**ONf**),
ostéide (**Ost**) e cristal de hidroxiapatita (**OH**).

5.4.4 Análise do grupo FCAHA

A primeira observação ficou por conta da falta de homogeneidade na distribuição dos tecidos e do biomaterial longitudinalmente na loja alveolar. O preenchimento desta se mostrou irregular com espaços de alternância entre áreas com a presença bem evidente dos cristais de hidroxiapatita em contraste com outras onde estes não eram observados (Figuras 5.4.4.1 - A e B).

Junto à hidroxiapatita observou-se o mesmo tipo de interface vista no grupo HA. Nas regiões onde os cristais não estavam presentes o tecido ósseo se distribuía por toda a área analisada (independente do seu estado de maturação).

A tipificação e a distribuição celular se mantiveram idênticas aos outros grupos estudados.

Figura 5.4.4.1 – Aspecto geral da distribuição tecidual nos alvéolos do grupo FCAHA

Figura 5.4.4.1 A – Corte de área com prevalente presença de cristais de hidroxiapatita

Corte transversal de alvéolo de um animal do grupo FCAHA com aparição dos cristais de hidroxiapatita . HE. 40x.

Coágulo (**Coa**), osso alveolar (**OA**), osso neoformado (**ONf**), osteóide (**Ost**) e cristal de hidroxiapatita (**OH**).

Figura 5.4.4.1 B – Corte de área sem a presença de cristais de hidroxiapatita

Corte transversal de alvéolo de um animal do grupo FCAHA sem aparição dos cristais de hidroxiapatita . HE. 40x.

Coágulo (**Coa**), osso alveolar (**OA**), osso neoformado (**ONf**) e osteóide (**Ost**).

5.4.5 Análise qualitativa entre os grupos

A nítida presença de coágulo sanguíneo, principalmente em situação central ou paracentral, foi observada somente no grupo controle. Nos outros grupos estudados observaram-se pequenas massas de coágulo distribuídas de maneira dispersa no espaço alveolar.

O processo cicatricial pode ser percebido como tendo seu princípio nas regiões mais periféricas da loja alveolar em sentido centrípeto. Porém, essa característica somente mostrou-se marcante no grupo CT. Nos grupos onde foram utilizados os biomateriais para enxertia a capacidade osteoindutora e osteocondutora dos mesmos prevaleceu.

Em relação aos estágios de maturação e de distribuição do tecido ósseo percebeu-se algumas diferenças. No grupo FCA a quantidade de tecido ósseo neoformado era mais evidente do que nos outros. Já no grupo HA a presença dos cristais concorreu espacialmente com a formação tecidual. No grupo FCAHA a deposição tecidual mostrou-se nitidamente irregular.

As células típicas do tecido ósseo, assim como uma angiogênese dispersa foram percebidas em todos os grupos.

5.5 Análise Histomorfométrica

As médias aqui relacionadas estão expressas em percentuais (%).

Os resultados individualmente abaixo descritos encontram-se compilados ao final do tópico (Tabela 5.5.1).

5.5.1 Dados obtidos para prevalência de Coágulo (Coa)

Nos grupos avaliados a contagem das áreas validadas como contendo coágulo sanguíneo dentro do limite alveolar resultou nas seguintes médias (com desvio-padrão):

- Grupo CT: Uma média de $15,838 \pm 3,980$.
- Grupo FCA: Uma média de $2,133 \pm 0,8998$.
- Grupo HA: Uma média de $5,183 \pm 3,235$.
- Grupo FCAHA: Uma média de $4,150 \pm 0,8501$.

5.5.2 Dados obtidos para prevalência de Osso Neoformado (ONf)

A contagem das áreas onde observou-se a deposição de tecido ósseo neoformado dentro do limite alveolar resultou nas seguintes médias (com desvio-padrão):

- Grupo CT: Uma média de $39,200 \pm 13,536$.
- Grupo FCA: Uma média de $63,267 \pm 8,947$.
- Grupo HA: Uma média de $46,000 \pm 8,092$.
- Grupo FCAHA: Uma média de $47,533 \pm 3,349$.

5.5.3 Dados obtidos para prevalência de Tecido Osteóide (Ost)

A contagem das áreas caracterizadas como de formação de tecido osteóide dentro do limite alveolar resultou nas seguintes médias (com desvio-padrão):

- Grupo CT: Uma média de $44,988 \pm 12,984$.
- Grupo FCA: Uma média de $34,600 \pm 8,975$.
- Grupo HA: Uma média de $44,192 \pm 8,954$.
- Grupo FCAHA: Uma média de $44,967 \pm 3,387$.

5.5.4 Dados obtidos da observação de Vasos (Vas)

A contagem das áreas ocupadas por formação vascular e dentro do limite alveolar resultou nas seguintes médias (com desvio-padrão):

- Grupo CT: Uma média de $19,875 \pm 8,132$.

- Grupo FCA: Uma média de $6,667 \pm 2,103$.
- Grupo HA: Uma média de $15,583 \pm 11,373$.
- Grupo FCAHA: Uma média de $13,083 \pm 3,965$.

Tabela 5.5.1 – Médias por grupo dos resultados de cada estrutura estudada

Grupo	Estruturas (média $\pm$ DP)			
	Coa	ONf	Ost	Vas
CT	$15,838 \pm 3,980$	$39,200 \pm 13,536$	$44,988 \pm 12,984$	$19,875 \pm 8,132$
FCA	$2,133 \pm 0,8998$	$63,267 \pm 8,947$	$34,600 \pm 8,975$	$6,667 \pm 2,103$
HA	$5,183 \pm 3,2350$	$46,000 \pm 8,092$	$44,192 \pm 8,954$	$15,583 \pm 11,373$
FCAHA	$4,150 \pm 0,8501$	$47,533 \pm 3,349$	$44,967 \pm 3,387$	$13,083 \pm 3,965$

Médias (em %) e desvio padrão obtidas a partir da contagem da ocupação de cada estrutura na loja alveolar

5.6 Análise estatística das aparições

Lançando-se mão dos resultados obtidos com as médias de ocorrência de cada alvo, pode-se fazer uma série de observações sobre as estruturas alvo comparadas como um todo ou por grupo a grupo.

5.6.1 Comparação entre as áreas com apresentação de Coágulo (Coa)

A análise de variância entre todas as médias obtidas pela contagem de presença de coágulo sanguíneo remanescente do processo regenerativo alveolar retornou um valor de $P < 0,0001$, considerado extremamente significativo (Tabela 5.6.1.1 e Gráfico 5.6.1.1).

Tabela 5.6.1.1 – Distribuição do coágulo sanguíneo (Coa) em cada grupo

Grupo	Média ± DP	Valor de P
CT	15,838 ± 3,980	< 0,0001 ***
FCA	2,133 ± 0,8998	
HA	5,183 ± 3,2350	
FCAHA	4,150 ± 0,8501	

Médias (em %) obtidas a partir da contagem da aparição de coágulo sanguíneo no leito alveolar e a sua análise de variância quando observados com um todo (ANOVA).

*** - Análise de variância com expressão extremamente significativa.

Gráfico 5.6.1.1 – Área ocupada por coágulo (Coa) em relação à área total do alvéolo.

Médias (em %) e desvio padrão apontadas por grupo estudado.

Este valor de P (< 0,0001) sugere que a presença ou não do remanescente de coágulo é uma variável a ser considerada e observada quando se fala no uso destes biomateriais para preenchimento da loja alveolar dentro do período estudado.

Quando comparadas duas a duas as menores significâncias acompanharam os grupos enxertados, sendo mais evidente quando das comparações entre estes com o grupo CT.

O resumo dessa análise pode ser verificado na tabela 5.6.1.2.

Tabela 5.6.1.2 – Comparação duas a duas das médias obtidas na aparição de coágulo sanguíneo (Coa)

Grupos comparados	Valor de P
CT x HA	< 0,001 ***
CT x FCA	< 0,001 ***
CT x FCAHA	< 0,001 ***
HA x FCA	< 0,05 *
HA x FCAHA	> 0,05
FCA x FCAHA	> 0,05

Médias (em %) obtidas a partir da contagem da aparição de coágulo sanguíneo no leito alveolar e a sua análise de variância quando comparadas na combinação de duas a duas (Teste T não pareado).

* - Análise de variância com expressão significativa.

*** - Análise de variância com expressão extremamente significativa.

Os valores de P sugerem que a presença ou não do remanescente de coágulo é uma variável principalmente observada no grupo CT. O preenchimento da loja alveolar com os biomateriais propostos demonstra interferência na manutenção volumétrica desse coágulo para o período estudado.

5.6.2 Comparação entre as áreas com apresentação de Osso Neoformado (ONf)

A análise das médias obtidas pela contagem da neoformação óssea retornou um valor de $P < 0,0001$, considerado extremamente significativo (Tabela 5.6.2.1 e Gráfico 5.6.2.1).

Tabela 5.6.2.1 – Distribuição de osso neoformado (ONf) em cada grupo

Grupo	Média $\pm$ DP	Valor de P
CT	39,200 $\pm$ 13,536	< 0,0001 ***
FCA	63,267 $\pm$ 8,947	
HA	46,000 $\pm$ 8,092	
FCAHA	47,533 $\pm$ 3,349	

Médias (em %) obtidas a partir da contagem da observação de osso neoformado no leito alveolar e a sua análise de variância quando observados com um todo (ANOVA).

*** - Análise de variância com expressão extremamente significativa.

Gráfico 5.6.2.1 – Área ocupada por osso neoformado (ONf) em relação à área total do alvéolo.

Médias (em %) e desvio padrão apontadas por grupo estudado.

Este valor de P ($< 0,0001$) sugere influência do uso destes biomateriais para neoformação óssea dentro dos limites da loja alveolar para o período estudado.

Na comparação das médias duas a duas as maiores análises de significâncias acompanharam os grupos onde foi utilizado o FCA.

O resumo dessa análise pode ser verificado na tabela 5.6.2.2.

Tabela 5.6.2.2 – Comparação duas a duas das médias obtidas para Osso Neoformado (ONf)

Grupos comparados	Valor de P
CT x HA	> 0,05
CT x FCA	< 0,001 ***
CT x FCAHA	> 0,05
HA x FCA	< 0,001 ***
HA x FCAHA	> 0,05
FCA x FCAHA	< 0,001 ***

Médias (em %) obtidas a partir da contagem da neoformação óssea no leito alveolar e a sua análise de variância quando comparadas na combinação de duas a duas (Teste T não pareado).

*** - Análise de variância com expressão extremamente significativa.

Os valores de P sugerem que a utilização de FCA favoreceu a neoformação óssea alveolar para o período estudado.

5.6.3 Comparação entre as áreas com apresentação tecido osteóide (Ost)

A análise das médias obtidas pela contagem das aparições de tecido osteóide retornou um valor de $P < 0,0161$, considerado significativo (Tabela 5.6.3.1 e Gráfico 5.6.3.1).

Tabela 5.6.3.1 – Distribuição de tecido osteóide (Ost) em cada grupo

Grupo	Média ± DP	Valor de P
CT	44,988 ± 12,984	< 0,0161 *
FCA	34,600 ± 8,975	
HA	44,192 ± 8,954	
FCAHA	44,967 ± 3,387	

Médias (em %) obtidas a partir da contagem da observação de tecido osteóide no leito alveolar e a sua análise de variância quando observados com um todo (ANOVA).

* - Análise de variância com expressão significativa.

Gráfico 5.6.3.1 – Área ocupada por tecido osteóide (Ost) em relação à área total do alvéolo.

Este valor de P ($< 0,0161$) sugere pouca influência na formação de tecido osteóide dentro dos limites da loja alveolar para o período estudado.

Na comparação das médias duas a duas as diferenças mostraram-se não significativas exceto em uma única comparação: entre o FCA e o FCAHA.

O resumo dessa análise pode ser verificado na Tabela 5.6.3.2.

Tabela 5.6.3.2 – Comparação duas a duas das médias obtidas para tecido Osteóide (Ost)

Grupos comparados	Valor de P
CT x HA	$> 0,05$
CT x FCA	$> 0,05$
CT x FCAHA	$> 0,05$
HA x FCA	$> 0,05$
HA x FCAHA	$> 0,05$
FCA x FCAHA	$< 0,05$ *

Médias (em %) obtidas a partir da contagem da tecido osteóide no leito alveolar e a sua análise de variância quando comparadas na combinação de duas a duas (Teste T não pareado).

* - Análise de variância com expressão significativa.

Os valores de P sugerem que a formação de tecido osteóide não sofre alterações significativas dentre as combinações avaliadas dentro do período estudado, salvo a comparação entre FCA e FCAHA.

5.6.4 Comparação entre as áreas com aparição de Vasos (Vas)

A análise das médias obtidas pela contagem de vasos nos limites alveolares retornou um valor de $P < 0,0019$, considerado muito significativo (Tabela 5.6.4.1 e Gráfico 5.6.4.1).

Tabela 5.6.4.1 – Distribuição de vasos (Vas) em cada grupo

Grupo	Média ± DP	Valor de P
CT	19,875 ± 8,132	< 0,0019 **
FCA	6,667 ± 2,103	
HA	15,583 ± 11,373	
FCAHA	13,083 ± 3,965	

Médias (em %) obtidas a partir da contagem da observação de vãos no leito alveolar e a sua análise de variância quando observados com um todo (ANOVA).

** - Análise de variância com expressão muito significativa.

Gráfico 5.6.4.1 – Área ocupada por vasos (Vas) em relação à área total do alvéolo.

Médias (em %) e desvio padrão apontadas por grupo estudado.

Este valor de P (< 0,0019) sugere diferença na aparição de vasos no interior dos limites da loja alveolar para o período estudado.

Na comparação das médias duas a duas as significâncias acompanharam os grupos onde foi utilizado o FCA em contrapartida àqueles que ele não foi usado.

O resumo dessa análise pode ser verificado na tabela 5.6.4.2.

Tabela 5.6.4.2 – Comparação duas a duas das médias obtidas aparição de Vasos (Vas)

Grupos comparados	Valor de P
CT x HA	> 0,05
CT x FCA	< 0,01 **
CT x FCAHA	> 0,05
HA x FCA	< 0,05 *
HA x FCAHA	> 0,05
FCA x FCAHA	> 0,05

Médias (em %) obtidas a partir da contagem da neoformação óssea no leito alveolar e a sua análise de variância quando comparadas na combinação de duas a duas (Teste T não pareado).

* - Análise de variância com expressão significativa.

** - Análise de variância com expressão muito significativa.

Os valores de P sugerem que a interferência do FCA em relação a formação de vasos nos leitos alveolares dentro do período estudado.

6 DISCUSSÃO

Este estudo propôs-se a avaliar o processo de reparação e neoformação de tecido ósseo em alvéolos de ratos que foram submetidos à instalação pós-exodôntica imediata de fosfato de cálcio amorfo e de hidroxiapatita como materiais de enxertia.

A escolha do modelo animal foi de acordo com a empregada por diversos estudos que visavam à avaliação do comportamento dos materiais de preenchimento ósseo, tais como os realizados por Victor et al (1975), Garcia (2007), Guimarães et al (2011), Barbosa (2013) e Maeda (2013).

O protocolo cirúrgico pode ser realizado a consenso da proposta. Os biomateriais tiveram sua inserção verificada coincidindo com as observações Schmitz e Hollinger (1986).

A observação pós-operatória indicou boa reação dos animais em relação ao procedimento cirúrgico como também relatado por Garcia (2007) e Barbosa (2013).

A evolução da massa corpórea dos animais também foi utilizada como parâmetro para essa observação. A ferida cirúrgica causada pela exodontia e a sutura oclusiva do alvéolo (com ou sem material de enxertia) não impediu a alimentação dos animais. A variação das massas corpóreas indicou um decréscimo percentual médio cuja análise de variância sugeriu como não tendo significância. Esse parâmetro discorda parcialmente das observações de Barbosa (2013) que percebeu aumento de massa a partir do 15º dia de pós-operatório para animais adultos (60 dias de vida), somente relatando decréscimo para animais idosos (acima de 2 anos de vida) e entre o 21º e o 28º dia de pós operatório. Numa avaliação comparada entre os grupos estudados essa análise de variância não retornou parâmetros significativos, sendo interpretada como que a diferença entre o trauma cirúrgico somente da exodontia ou da exodontia acompanhada do procedimento de enxertia não mostrou-se relevante.

Dentro do período pós operatório estudado e independente da maturação óssea verificou-se o preenchimento das lojas alveolares em concordância com relatos de Okamoto e Fialho (1990) e Carvalho et al (2004). Os biomateriais utilizados promoveram um processo de osteogênese também descrito por Galia (2000).

Em todas as amostras foram observados os componentes celulares típicos do tecido ósseo. Fibroblastos na formação do tecido osteóide, osteoblastos na periferia das trabéculas ósseas, osteócitos imersos na matriz mineralizada e osteoclastos em depressões escavadas pela sua atividade. Essas observações coincidem com as descrições de Junqueira e Carneira (2004), Lindhe (2005) e Arana-Chavez e Bradasschia-Correa (2012).

A presença de coágulo sanguíneo no preenchimento da loja alveolar seguiu os relatos de Euler (1923), Simpson (1969), Carvalho e Okamoto (1978), Kuboki et al. (1988) e Cardaropoli (2003). Porém este só foi nitidamente observado nos animais do grupo controle, onde assumia uma condição central ou paracentral coincidente com o descrito por Barbosa (2013). Nos outros grupos estudados observaram-se pequenas massas de coágulo distribuídas de maneira dispersa no espaço alveolar.

O processo cicatricial acompanhou as observações de Burkitt et al. (1994) e Ellis III (1996) sendo percebido como tendo seu princípio nas regiões mais periféricas da loja alveolar seguindo em sentido centrípeto. Porém, essa característica somente mostrou-se marcante no grupo CT. A análise de variância deste dado sugere que esta é uma variável significativa.

A deposição de tecido osteóide e de tecido ósseo neoformado apresentou-se em todos os grupos (como em LUDWIG et al., 2000), porém com diferenças em relação à sua distribuição. No grupo FCA a quantidade de tecido ósseo neoformado era mais evidente do que nos outros. Já no grupo HA a presença dos cristais sugeriu uma concorrência espacial com a formação tecidual. No grupo FCAHA a deposição tecidual mostrou-se nitidamente irregular.

Nos grupos onde foram utilizados os biomateriais para enxertia a capacidade osteoindutora e osteocondutora dos mesmos prevaleceu tal como visto por Triplett et al. (1996), Tadjoedin et al. (2003) e Dall'Antonia (2006).

Nos grupos onde foi utilizado o FCA a deposição de tecido ósseo neoformado foi superior àqueles onde esse biomaterial não estava presente.

Nosso estudo sugere que o FCA tem uma característica osteoindutora mais evidente do que a HA. Justifica-se por, dentro do período estudado, verificar-se o maior depósito de tecido neoformado e a menor quantidade de tecido osteóide quando os comparamos com os outros grupos. Característica em concordância com Lean et al. (1996), Viswanath et al. (2006) e Silva et al. (2014). Essa velocidade de absorção acompanhada de neoformação também partilha dos relatos de Imaizumi et al. (2006).

Enquanto, em acordo com Shindo (1993), o processo de reabsorção dos cristais de hidroxiapatita é mais lento.

Nos grupos onde utilizou-se a HA esta mostrou comportamento compatíveis com outros estudos. A formação de uma interface entre sua superfície e o tecido neoformado e a osteocondução. Coincidente com observações de Costa (2009) e Costa (2015) apesar de ir contra o relato de Cho et al. (2011) que utilizou uma HA de características diferentes no tamanho das granulações e na microporosidade de superfície.

Em relação à distribuição irregular da formação tecidual do grupo FCAHA fica uma observação experimental: a dificuldade de homogeneização da mistura dos biomateriais. A diferença de apresentação das duas formas (a HA em grânulos e o FCA em filamentos) não permitiu uma manipulação manual plenamente satisfatória. Isso evidenciou-se na avaliação histológica.

Os resultados nos conduzem ao que diversos autores citam em seus trabalhos. Tanto a hidroxiapatita como o fosfato de cálcio interagem diretamente com o leito ósseo concordando com Peltoniemi (2002) quando este cita que a condição de um material para repor áreas com defeitos ósseos seria àquele que possui, como principal vantagem, o seu potencial de integração ao sítio receptor.

A neoformação óssea observada coincide com esta condição.

Apesar de Jensen e Sindet-Petersen (1991) e Taga (1996) descreverem as vantagens do uso do material autógeno pelas suas propriedades biológicas, nossas observações conduzem para a viabilidade e importância do fosfato de cálcio amorfo e como também descrito por Decker (2005), Dall'Antonia (2006), Imaizumi et al. (2006) e Guastaldi e Aparecida (2010). Ainda segundo Taga (1996) deve-se considerar todos os fatores dificultadores envolvidos na enxertia autógena e que não estão presentes quando da opção do uso de biomateriais.

Tanto o fosfato de cálcio como a hidroxiapatita mostraram biocompatibilidade, pois sua aplicação não veio acompanhada de danos biológicos ou efeitos tóxicos ao receptor concordando com Oliveira (1995), Çiftçioglu (2000), Guimarães et al. (2011) e Maeda (2013).

A biocompatibilidade, a osteoindução e a osteocondução observadas na reparação tecidual utilizando-se o fosfato de cálcio e a hidroxiapatita vão de acordo com a opinião de Paiva et al (2014) na busca de um biomaterial dito “padrão ouro”, ou seja, que apresente todos os critérios de um substituto ósseo ideal.

Nagahara et al. (1992) dizia que desafio principal da enxertia alógena é a neoformação óssea conseguida através do enxerto autógeno e não conseguida através de outros materiais substitutos. Neste trabalho percebemos a ocorrência de neoformação óssea que nos permite entender que os biomateriais tem se dirigido a essa pretensão.

Concordando com Braga et al. (2014) quando neste é afirmado que para reconstruir de uma região óssea usando um material de enxerto, é necessário incitar em um local o processo inflamatório, este processo inflamatório é caracterizado pelo excesso de sangue decorrente que conduz à formação do coágulo para os espaços livres entre o osso traumatizado de

superfície e a superfície do enxerto, , na ausência deste espaço, percebemos a dispersão deste mesmo coágulo por todo o alvéolo causado pela presença dos cristais de HA ainda não reabsorvidos. Condição compatível com a observação. O grupo FCAHA seguiu esta mesma observação.

Os resultados neste trabalho ressaltam a proposição de requisitos de Braga et al. (2014) quanto ao fosfato de cálcio. Já suas propriedades quer químicas, mecânicas ou biológicas, mostram que este é um importante precursor de hidroxiapatita conforme Zhao et al. (2011). Outra propriedade diz respeito confirma a formação de sítios de biomineralização descritos por Gartner (2003) ao notarmos a presença de células osteoprogenitoras como os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos.

Tanto a neoformação como a formação de tecido osteóide concordam com Langstaff (1999) quando este afirma que um biomaterial para ser aplicado como matriz de substituição óssea, ele deve ser biocompatível e favorecer a proliferação e desenvolvimento das células em sua superfície e para seu interior, assim permitindo a sua dissolução e absorção dos íons de Ca e P dentro do processo de formação óssea.

Nossos resultados apontam que a essa nova proposta de apresentação do fosfato de cálcio amorfo, apesar de carecer de mais dados, pode ser utilizado como biomaterial para enxertia e se mostra viável e com boas perspectivas de aplicação clínica.

7 CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos neste experimento e nos argumentos da nossa discussão tem-se às seguintes conclusões:

7.1 Conclusões Gerais

- Frente à intervenção de exodontia do incisivo superior os animais apresentaram um decréscimo de massa corpórea, porém a média dessa variação não se mostrou significativa,
- A evolução de massa corpórea no período pós-operatório de 28 dias, quer para animais submetidos exclusivamente à exodontia do incisivo superior, quer para os que se submeteram à exodontia com imediata enxertia do alvéolo dental com biomateriais, não apontou diferenças na variação de massa corpórea dos animais estudados,

7.2 Conclusões Específicas

- O fosfato de cálcio amorfo apresentado na forma de filamentos comportou-se *in vivo* com características comparáveis a de outros materiais biocompatíveis.
- O fosfato de cálcio amorfo mostrou respostas osteoindutoras,
- O processo de reparação alveolar do fosfato de cálcio amorfo evoluiu, sob observação histológica, de maneira adequada e de forma mais rápida do que a observada no uso da hidroxiapatita,
- Frente à utilização do fosfato de cálcio amorfo como material de preenchimento alveolar imediatamente à exodontia, este mostrou uma neoformação óssea mais intensa do que a observada no uso da hidroxiapatita.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, G. A., CUADRADO, T. R.. In: SASTRE, R., AZA, S., ROMÁN, J. S. (Ed.). **Biomateriales**. Faenza: Faenza Editrice Iberica, 2004. p. 173.
- AMARAL, I. F., SAMPAIO, P., BARBOSA, M. A three-dimensional culture of human osteoblastic cells in chitosan sponges: the effect of the degree of acetylation **J Biomed Mater Res A**, v. 76A, n. 2, p. 335–346, 2006.
- AMLER, M. H., JOHNSON, P. L., SALMAN, I. Histological and histochemical investigation of human alveolar socket healing in undisturbed extraction wounds. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 61, n. 1, p. 32-44, July 1960.
- ARANA-CHAVEZ, V. E., BRADASCCHIA-CORREA, V. Clastic cells: mineralized tissue resorption in health and disease. **Int. J. Biochem, Cell. Bioll.**, v. 41, 2012
- ASTRAND, P., CARLSSON, G. E. Changes in the alveolar process after extractions in the white rat. A histologic and fluorescent microscopic study. **Acta Odont Scand.**, v. 27, p. 113-127, 1969.
- BARBOSA, A. C. S. **Estudo das proteínas ósseas não colágenas no processo de reparação óssea alveolar em ratos idosos**. 2013. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10132/tde-21112013-103224/>>. Acesso em: 10 maio 2014.
- BASAR, B., TEZCANER, A., KESKIN, D., EVIS, Z. Synthesis, phase transitions and cellular biocompatibility of nanophase alumina-hydroxyapatite composites. **Adv. Appl. Ceram.**, v. 110, p. 238-243, 2011.
- BOYNE, P. I., KRUGER, G. O. Fluorescence microscopy of alveolar bone repair. **J Oral Surg.**, v. 15, p.265-281,1962.
- BOYNE, P. J. Application of bone morphogenetic proteins in the treatment of clinical oral and maxillofacial osseous defects. **J. Bone. Joint. Surg. Am.**, California, v. 83-A, pt. 2, p. 146-151, 2001. Supplement 1,
- BRAGA, F., SILVA, A. C., ALLEGRINI JR, S., OTTONI, C. E. C. Calcium phosphate graft substitute: when the impact of innovation is in the form rather than content. In: EUROPEAN CONFERENCE ON BIOMATERIALS, 26., 2014, Liverpool, UK, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Pesquisa Nacional de Saúde Bucal. Brasília ,DF. 2012.
- BUCHAIM, R. L., ROQUE, D. D., ROQUE, J. S., TOLEDO FILHO, J.L., ANDREO, J. C., OKAMOTO, T. Gen-phos® em cavidades cirúrgicas realizadas em tíbia de ratos submetidos ao alcoolismo crônico experimental. Estudo microscópico. **Rev FOB**, v. 10, n. 1, p. 17-22, 2002.

BUCK, B. E., MALININ, T. I. Human bone and tissue allografts. **Clin Orthop.**, v. 303, p. 8-17, 1994.

BURG, K. J. L., PORTER, S., KELLAM, J. F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 21, p. 2347-2359, 2000.

BURKIT, H. G. **Wheater histologiafuncional**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p. 994.409.

BUSO, A. M. **Avaliação clínica do uso de membrana xenógena absorvível impregnada com tetraciclina em pacientes com doença periodontal crônica avançada**. Uberlândia: UFU, 2005.

CARDAROPOLI, G., ARAÚJO, M., LINDHE, J. Dynamics of bone tissue in tooth extraction sites: an experimental study in dogs. **J Clin Peridontol**, v. 30, p. 809-18, 2003.

CAMARGO, N. H. A., SOARES, C. E., GEMELLI, E. "Síntese e caracterização de biocimentos nanoestruturados para aplicações cirúrgicas ortopédicas-odontológicas". In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CERÂMICA, 50., 2006, Blumenau, 2006.

CARVALHO, A. C. P., OKAMOTO, T. Cuidados pós-exodônticos. Considerações clínicas e experimentais. **Ars Cvrandi Odont.**, v. 5, p. 19-27, 1978.

CARVALHO, V. A., TOSELLO, D. O., SALGADO, M. A., GOMES, M. F. Histomorphometric analysis of homogenous demineralized dentin matrix as osteopromotive material in rabbit mandibles. **Int J Oral Maxillofac Implants.**, v. 19, p. 679-86. 2004

CHO, J. S., CHUNG, C., RHEE, S. Bioactivity and Osteoconductivity of biphasic calcium phosphates. bioceram. **Dev. Appl.**, v. 1, p. 1-3, 2011

ÇİFTÇIOĞLU, R. **The preparation and characterization of hydroxyapatite bioce-ramic implant material**. 2000. Dissertation (Master of Science) - Izmir Institute of Technology Izmir ,Turkey, 2000.

CLAFLIN, R. S. Healing of disturbed and undisturbed extraction wounds and **J Am Dent Assoc.**, v. 23, n. 6, p. 945-959, 1936.

CONSOLARO, A., REBELLATO JÚNIOR, V., CONSOLARO, M. F., Avaliação de implantes de osso bovino liofilizado "Osseobond" e membrana reabsorvível de osso bovino liofilizado- Estudo microscópico em tibia de ratos. **Revista Brasileira de Implantodontia**, v. 4, n. 1, p. 8-14, 1997.

CONZ, M. B., GRANJEIRO, J. M., SOARES, G. A. Hydroxyapatite crystallinity does not affect the repair of critical size bone defects, **Appl. Oral Ci.**, v. 19, n. 4, p.35-42 , 2011.

COSTA, A. C. F. M., LIMA, M. G., LIMA, L. H. M. A., CORDEIRO, V. V., VIANA, K. M. S., SOUZA, C.V., LIRA, H. L. Hidroxiapatita: obtenção, caracterização e aplicações. **Rev. Eletrônica Mater.**, Processos, v. 4, p.29-38, 2009.

COSTA, B. D.; CAMARGO, N. H.; OLESKOVICZ, N.; GAVA, A.; DALLABRIDA, A. L.; REGALIN, D.; LIMA, M. P. A.; MORAES, A. N. Neoformação óssea e osteointegração de biomateriais micro e nanoestruturado em ovino. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 35. n. 2, p. 177-187, 2015.

DALL'ANTONIA, R.C., OKAMOTO, T., MILANEZI, L.A., VANCETTO, J. R., SANT'ANNA, A.J., OKAMOTO, R. Implante de osso cortical bovino inorgânico Liofilizado (gen-ox®) em alvéolos dentais: Estudo microscópico em ratos. **Revista Odontológica de Araçatuba**, v.27, n.2, Julho/Dezembro, p. 129-135, 2006.

DAVIES, A., BRAKELEY, A. G. H., KIKK, C.. **Fisiologia Humana**. Ed. Artmed: Porto Alegre, 2002.

DALAPÍCULA, S., VIDIGAL Jr, G.M., CONZ, M.B., CARDOSO, E.S.. Características físico-químicas dos biomateriais utilizados em enxertias ósseas: uma revisão crítica. **Implant News**, v. 03, n.05, p. 487- 491, 2006.

DEKKER, R. J., DE BRUIJN, J. D., STIGTER, M., BARRERE, F., LAYROLLE, P., VAN BLITTERSWIJK, C. A., Bone tissue engineering on amorphous carbonated apatite and crystalline octacalcium phosphate-coated titanium discs. **Biomaterials**, v.26, 2005.

DEVLIN, H, SLOAN, P. Early bone healing events in the human extraction socket. **International Journal of Oral and Maxillofacil Surgery**. v.31, p.641-645, 2002.

DUCHEYNE, P., PANJIAN, L. Quasi-biological apatite film induced by titanium in a simulated body fluid. **J Biomed Mater Res A**, Volume 41, September, Issue 3, p. 341–348, 1998.

ELLIS III, E. **Cirurgia oral e maxilofacial contemporâneas**. Rio de Janeiro: Guanabara. P. 583-605, 1996.

EULLER, H. Die Heilung Von Extraktionswunden **Deutsche Monat Zahnheil** v. 41, Dez, 1923.

EVES, S., M. P., MANCINI FILHO, J., DE MENEZES, E. W. **Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**, FCF-IQ/USP, São Paulo, 2013

FREIRE, W. P., BARBOSA, E. F., ARAUJO, R. B., ARAÚJO, C. S., BARBOSA, R.C., FOOK, M.V. L. Biocompatibilidade dos Materiais Restauradores Odontológicos - Revisão da Literatura **7º. COLAOB**, NATAL, RN, 2012.

FULMER, M.T., MARTIN, R.I., BROWN, P.W. Formation of calcium deficient hidroxyapatite at near-physiological temperature. **J. Mater. Sci. Mater. Med** v..3, p.299-305, 1992.

GALIA, C.R. **Enxertos ósseos liofilizados impactados humanos e bovinos em revisão de artroplastia total de quadril**. [Tese]. Porto Alegre/RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

GARTNER, L., HIATT, J. **Tegumento. In: Tratado de histologia em cores.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., cap. 14, p. 265-279, 2003.

GATTI, A.M., RIVASI, F. Biocompatibility of micro- and nanoparticles. Part I: in liver and kidney **Biomaterials** .Volume 23, Issue 11, June, p. 2381–2387, 2002.

GIANNOUDIS, P. V., DINOPOULOS, H., TSIRIDIS, E. Bone substitutes: An update. **Injury**, v.36(S3), p.20-7, 2005.

GUIMARÃES, K.B, VASCONCELOS, B.C.E., LIMEIRA JÚNIOR, F.A., DE SOUSA, F. B., ANDRADE, E.S.S., VASCONCELLOS HOLANDA, R.J. Histomorphometric evaluation of calcium phosphate bone grafts on bone repair. **Braz. j. otorhinolaryngol.** v.77, n.4, July/Aug., 2011.

GUASTALDI, A.C., APARECIDA, A.H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos, **Quim Nova**, v.33, Ed. 6, p. 1352-8, 2010.

GUTIERRES, M., LOPES, M.A., HUSSAIN, N..S., CABRAL, A.T., ALMEIDA, L., SANTOS, J.D. Substitutos ósseos: Conceitos gerais e estado atual. **Arquivos de Medicina**, v.19, p.153-162, 2006.

HANAWA, T., OTA, M. Calcium phosphate naturally formed on titanium in electrolyte solution **Biomaterials** .v.12(8), October, Pages 767–774, 1991.

HELMUS, M.N, "Overview of biomedical materials", , **MRS Bulletin**, September, p.33-38, 1991.

HENCH, L. L. Biomaterials: a forecast for the future, **Biomaterials**, v.19(16), August, p.1419–1423, 1998.

HENCH, L. L., WILSON, J. Introduction to biocerâmicas. Singapoure **Word Scintific Publishing Co.Pte**, Ltd. p.1-15, 1993.

HILL, P.A. Bone remodelling. **Br J Orthod**, v.25,(2), p. 101-107, 1998.

HERNANDEZ-GIL, I. F.T., GRACIA, M. A. A., PINGARRÓN, M. del C., JEREZ, L. B. Physiological bases of bone regeneration. histology and physiology of bone tissue. **Med. Oral Patol Oral Cir Bucal**, v.11, p.47-51, 2006.

HENCH, L., WILSON, J. Biology applications of bioactive glasses.. **Life Chem Repair**. v.13, 1991.

HILL, P. A., ORTH, M. Bone Remodelling. **British Journal of Orthodontics**, v.25, p. 101-107, 1998.

IMAIZUMI, H., SAKURAI, M., KASHIMOTO, O., KIKAWA, T., SUZUKI, O., Comparative study on osteoconductivity by synthetic octacalcium phosphate and sintered hydroxyapatite in rabbit bone marrow. **Calcif. Tissue Int.** v. 78, p.45, 2006.

JENSEN,J., SINDET-PETERSEN,S. Autogenous mandibular bone grafts and osseointegrated implants for reconstruction of the severely atrophied maxilla: A preliminary report. **J Oral Maxillofac Surg.** v.49, p.1277–1287,1991.

JOHANSEN,. K., HANSEN, A.A. P Diurnal patterns of blood glucose, serum free fatty acids, insulin, glucagon and growth hormone in normals and juvenile diabetics Diabetologia, v. 6,(1) February, p.27-33, 1970.

JULIEN,M.,KHAIROUN,I., LEGEROS, R.Z., DELPLACE, S., PILET, P., WEISS, P., DACULSI, G., BOULER, J. M., GUICHEUX, J. . Physico-chemical–mechanical and in vitro biological properties of calcium phosphate cements with doped amorphous calcium phosphates **Biomaterials**,.v.28, p.956, 2007.

JUNQUEIRA, L.C.,CARNEIRO, J. **Histoquímica e Citoquímica**, In: Junqueira L.C., Carneiro, J. *Histologia Básica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 20-29,1979.

JUNQUEIRA,L.C.U, CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, editora: Guanabara, 10ª Ed, 2004.

KANYAMA,M, KUBOKI,T. ,AKIYAMA,K. NAWACHI,K., MIYAUCHI, F.M., YATANI,H., KUBOTA S, NAKANISHI T, TAKIGAWA M. Connective tissue growth factor expressed in rat alveolar bone regeneration sites after tooth extraction. **Arch Oral Biol**, v.48, p.723–30,2003.

KASAJ,A.,ZAFIROPOULOS,G.G.,TEKYATAN,H.,PISTORIUS,A., WILLERSHAUSEN, B. Periodontal disease status of pregnant women with diabetes mellitus. **Coll Antropol** v.32, p.115–118, 2008.

KIRKPATRICK, C. J, MITTERMAYER, C. Theoretical and practical aspects of testing potential biomaterials *in vitro* Journal of Materials Science: Materials in Medicine June V.1(1), p. 9-13,1990.

KOHN:D.H.,DUCHEYNE,P. Materials for Bone and Joint Replacement **Published Online:** v.15 (SEP), Wiley-VCH Verlag GmbH, 2006.

KUBOKI, Y., HASHIMOTO. F., ISHIBASHI, K. Time-dependent Changes of Collagen Crosslinks in the Socket after Tooth Extraction in Rabbits. **Journal of Dental Research**,v.67(6),Jun,p.944-8,1988.

KOHN,D.H, DUCHEYNE,P.,AWERBUCH,J. Acoustic emission during fatigue of porous-coated Ti-6Al-4V implant alloy. **Journal Of Biomedical Materials Research.** v. 26(1), January, p, 19-38,1992,

KOHN,D.H.,DUCHEYNE,P.. Materials for Bone and Joint Replacement **Materials Science and Technology**, 2006.

KUNERT-KEIL, C, GREDES,T. AND. GEDRANGE, T. Biomaterials Applicable for Alveolar Sockets Preservation: In Vivo and In Vitro Studies, www.intechopen.com,2011.

LEGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clin Orthop Relat Res** Feb,V.395,P.81-98. 2002.

LYNCH,S.E, GENCO,R.J, MARX, R.E. Tissue engineering: Applications in maxillofacial surgery and periodontics. Carol Stream: **Quintessence Books**, 1999.

LINDHE, J.,KARRING, T., LANG, N.P. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**, 4a ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2005.

LINDHE, J., ARAÚJO, M. G., SUKEKAVA, F.A, WENNSTRÖM,J. L. Ridge alterations following implant placement in fresh extraction sockets: an experimental study in the dog, Journal of Clinical Periodontology,v.32(6),June,p.645–652,2005.

KUNERT-KEIL, C., GREDRANGE, T., MAI, R., SPASSOV, A., LUCKE, S., KLINKE, T., KALUKIN, J., LOSTER,B.W. AND GREDES, T. Morphological evaluation of bone defect regeneration after treatment with two different forms of bone substitution materials on the basis of BONIT matrix. **J. Physiol. Pharmacol.**, v..60, Suppl 8, p. 57-60,2009.

LANGSTAFF,S, SAYER,M.,SMITH T.J.N., PUGH S.M., HESP S.A.M, THOMPSON W.T. Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates. Part I: rational design, sample preparation and material characterization, Biomaterials, v.20(18), September,p.1727–1741,1999.

LEAN, I.J., WADE, L., BECKETT, S.D.. Bovine somatotropin and monensin: emerging technologies. **Advances in dairy technology**, v. 8, p.237-253. 1996.

LEGEROS, R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clinical orthopaedics and related research** , v.395,February 2002.

LEÓN,M.E.A. **Uso do cimento de fosfato de cálcio (Bonesource®) associado ou não a células tronco adultas de medula óssea no processo de reparação óssea.** [Tese]. Camaragibe (PE): Faculdade de Odontologia de Pernambuco - Universidade de Pernambuco, 2008.

LIN, W.L, MCCULLOCH, C.A, CHO MI. Differentiation of periodontal ligament fibroblasts into osteoblasts during socket healing after tooth extraction in the rat. **Anatatomical Records**,v.1240,p.492–506,1994.

LYNCH,S.E.,DE CASTILLA , G.R.,WILLIANS,R.C.,KIRITSI,C.P.,HOWEL,T.H., REDDYM, ANTONIADES, H.N. .The effects of short term application of a combination of platelet-derive dand insulin-like growth factors on periodontal wound healing. **J Periodontol**, Jul, 67(2): 458-67, 1991.

LOGEART-AVRAMOGLU,D, ANAGNOSTOU, F., BIZIOS,R, PETITE, H.. Engineering bone: challengesand obstacles. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 9,(1), p. 72-84, 2005.

LUDWIG, S. C., KOWALSKI, J. M., BODEN, S. D. Osteoinductive bone graft substitutes. **Eur. Spine J.**, v.9, suppl.1, p.119-25, 2000.

MAEDA ,N. T. **Avaliação da neoformação óssea em tíbia de coelhos utilizando cúpula de hidroxiapatita associada a diferentes biomateriais**, Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) - Universidade de São Paulo,, 2013.

MAHAJAN,A.,KEDIGE, S Periodontal bone regeneration in intrabony defects using osteoconductive bone graft versus combination of osteoconductive and osteostimulative bone graft: A comparative study **Dent Res J (Isfahan)**. Jan-Feb, 12(1): 25–30,2015.

MARX, R.E., SAUNDERS, T.R. **Reconstruction and rehabilitation of cancer patients.** **Apud FONSECA,R.J.,DAVIS,W.H. Reconstructive Preprosthetic Oral and Maxillofacial Surgery.**, p.347-428, 1986.

MARX, R.E., Bone and bone graft healing **Oral Maxillofac Surg North Am**, v.19, n.4,p. 455-66. Nov. 2007.

MENDES, FILHO, A. A. Síntese e caracterização de hidroxiapatita e compósitos a partir de matéria-prima reciclada. 2006. 204p. **Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto**, 2006.

MISCH,C.E. Biomateriais utilizados em implantes dentários. In : Misch CE, editor.**Implantes dentários contemporâneos**. 2ª Ed., São Paulo, Ed. Santos,p. 271-302. 2000.

MONTEIRO, F.J., FERRAZ, M.P., MANUEL, C.M. Hydroxyapatite nanoparticles: a review of preparation methodologies- **Journal of Applied Biomaterials** 2004.

MURUGAN,R.,RAMAKRISHNA, S. Development of Nanocomposites for Bone Grafting. **Compos Sci Technol**, v. 65, p.2385-2406, 2005.

MURUGAN, R. AND RAMAKRISHNA, S. Design Strategies of Tissue Engineering Scaffolds with Controlled Fiber Orientation. **Tissue Engineering**. August 2007, 13(8): 1845-1866.

NAGAHARA, K., ISOGAI, M., SHIBATA, K. Osteogenesis of hydroxyapatite and tricalcium phosphate used as a bone substitute. **Int. J. OralMaxillofac Implants**, v.7, p.72-79, 1992.

OKAMOTO, T., TÚRCIO K. H. L. ,YOSHINO, T. Y. ,GARCIA JÚNIOR, I. R.,SAITO, C.T. M.H.,TANAKA, F. Y.. Implante de osso anorgânico em cavidade óssea. Estudo histológico em ratos. **Rev. Odontol. Unesp**, São Paulo, v.23, n.2, p.213-19, 1994.

OKAMOTO, T., FIALHO, A. C. V. Estudo histológico comparativo entre dois métodos de obtenção de cortes de alvéolos de ratos. **Rev Odont UNESP**, v.19,(1), p. 63-74, 1990.

OKAMOTO, T., RUSSO,,M. C. Wound healingfollowing tooth extraction: histochemical study in rats. **Rev. Fac. Odontol. Araçatuba**, v.. 2, p. 153-69, 1973.

OKAMOTO,S.,HISHIKAW.,Y., TSUGE, S.,, SASAKI, M.,NINOMIYA, K.,, NISHIKUNI, M.,TSUDA, S. High-Quality Wide-Gap Hydrogenated Amorphous Silicon Fabricated Using Hydrogen Plasma Post-Treatment **Jpn. J. Appl. Phys.**v.33,p.1773,1994.

ORÉFICE,R.L.,PEREIRA,M.M.,MANSUR,H.S. **Biomaterias Fundamentos & Aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. 537 p.

PAIVA,L.G,J., BATISTA,A.C., CARVALHO, L.C., GARCIA,R.R., Avaliação histológica de hidroxiapatita sintética associada a fosfato de cálcio (β -TCP) utilizados em levantamento de assoalho de seio maxilar **Rev. odontol. UNESP**, v..43(2), Araraquara, Mar./Apr., 2014.

PELTONIEMI,H,ASHAMMAKHI,N., KONTIO, R., WARIS,T., SALO, A., LINDQVIST, C., GRÄTZ, K., SUURONEN, R., The use of bioabsorbable osteofixation device in craniomaxillofacial surgery. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2002 Jul;94(1):5-14. Review

PINTO J.R. H.S. **Utilização de enxerto ósseo cortical homólogo preservado em tintura de iodo a 2% na reparação de fraturas cominutivas de ossos longos de cães.** 1997. 75 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo.

POSNER,A.S, BETTS,F. Synthetic amorphous calcium phosphate and its relation to bone mineral structure **Acc. Chem. Res.** , 8 (8), pp 273–281,1975.

PRECHEUR, H.V. Bone Graft Materials. **Dent. Clin. N. Am.**, v.51, p.729-746, 2007.

PROUBASTA,I.,H.,C.,LACROIX,D.PLANELL,J.A.Intramedullary nails Vs osteosynthesis plates for Femoral fracture stabilization: A finite element Analysis”, **Biomaterial.** p.1089-1095, 2007.

RAWLINGS,,R.D. Bioactive glasses and glass-ceramics. **Clinical Materials.** v.14(2),p. 155–179,1993.

REYNOLDS,M.A,AICHELMANN-REIDY,M.E.,BRANCH-MAYS ,G. L , GUNSOLLEY ,J. C The efficacy of bone replacement grafts in the treatment of periodontal osseous defects. A systematic review. **Ann Periodontol.** 2003, 8(1): 227.

ROSEMBERG, A. E. Sistema esquelético e tumores de partes moles: ossos. In: COTRAN, R. S., KUMAR, V., ROBBINS, S. L. **Robbins Patologia estrutural e funcional.** 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 1094-112,1996,.

SCHALLHORN,R.G.,McCLAIN,P.K. Combined osseous composite grafting, root conditioning and guided tissue regeneration. **Int. J. Periodont. & Rest. Dent.** v. 8, p. 9-32, 1988.

SCHENK,R.K. Regeneração óssea guiada na implantodontia. São Paulo: **Quintessence**,. p.49-100,1996.

SCHMITZ, J.,HOLLINGER, J.,O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulo facial nonunions. **Clinical orthopaedics**, 205:299-308,1986.

SHINDO,M. L., MD, COSTANTINO P.D FRIEDMAN, C. D., , CHOW ,L. C. Facial Skeletal Augmentation Using Hydroxyapatite Cement. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg.** 1993,119(2):185-190

SILVA, A.C., MELLO-CASTANHO,S.R.H, LIMA,N.B., BRAGA, F.J.C. Fibras de Fosfato de Cálcio Amorfo: Fases Amorfas Coaxiais Orientando a Bioatividade. **58º. Congresso Brasileiro de Cerâmica.** Bento Gonçalves, BR, 2014.

SIMPSON, H. E. The healing of extraction wounds. **Br.Dent. J.**, v. 126, p. 550-7, 1969.

TAGA, E.M. Biomateriais para uso de clínica médico odontológica. **BCI. CURITIBA** V.3, N.1, P.59-69,1996

TADJOEDIN, E.S., DE LANGE, G.L, BRONCKERS, A.L.J.J, LYARUU, D.M,I. Deproteinized cancellous bovinebone (Bio-Oss) as bone substitute for sinus floor elevation: a retrospective, histomorphometrical study of five cases. **J. Clin. Periodontol.**, Frederiksberg, v.30, p. 261-270, 2003.

TRIPLETT, R.G., SCHOW, S.R., FIELDS, R.T. Bone augmentation with and without biodegradable and non biodegradable microporous membranes. **Oral Maxillofac. Surg. Clin. Noth Am.**, vol. 13, no. 3, p.411-22, 2001.

TRUEDSSON, A, WANG, J.S., LINDBERG, P, Bone substitute as an on lay graft on rat tibia - Clinical oral implants Wiley Online Library, 2010

VALLET-REGÍ, M., GONZÁLEZ-CALBET, J.M. Calcium phosphate as substitution of bone tissues. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 32, p. 1-31, 2004.

VALLET-REGÍ, M., PEÑA, J., IZQUIERDO-BARBA, I. Synthesis of β -tricalcium phosphate in layered or powdered forms for biomedical applications. **Solid State Ionics**, v. 172, p. 445-449, 2004.

VICTOR, J. O, PINTO, R. S., OKAMOTO, T., CASTRO, A. L. Implante de gesso paris em alvéolos dentais: estudos histológicos em ratos. *Rev Fac Odont Araçatuba. Araçatuba.* v. 4, n. 1, p. 1-79, 1975.

VISWANATH, B., RAGHAVAN, R., RAMAMURTY, U., RAVISHANKAR, N. "Mechanical properties and anisotropy in hydroxyapatite single crystals." **Scr. Mater.**, 57, 361–364. 2007.

WIDMARK, G., ANDERSSON, N. B., IVANOFF, G. J. Mandibular bone graft in the anterior maxilla for single tooth implants. **J Oral Maxillofac Surg.** Philadelphia. Elsevier: v. 26(2), p. 106-09, 1997.

WILLIAMS, D.F. **Dictionary of biomaterials.**: Liverpool University Press,. p.42. ,1987.

ZHAO, S, PINHOLT, E.M. Effects of magnesium-substituted nanohydroxyapatite coating on implant osseointegration. **Clinical Oral Implants Research**, v. 6, p. 1-8, 2011.