UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

EDUARDO MUKAI

**Caracterização de um novo arcabouço de hidroxiapatita bifásica
com adsorção de fluoreto**

BAURU
2014

EDUARDO MUKAI

**Caracterização de um novo arcabouço de hidroxiapatita bifásica
com adsorção de fluoreto**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

BAURU
2014

M896c Mukai, Eduardo
Caracterização de um novo arcabouço de
hidroxiapatita bifásica com adsorção de fluoreto
Bauru, 2014.
93 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo
Buzalaf.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho inicialmente a Deus que graças a sua misericórdia me contemplou com a cura tanto da minha carne como da minha alma , a minha amada esposa que sem ela jamais conseguiria ter iniciado este mestrado , aos meu filhos pela ausência entendida no decorrer desta jornada, a minha mãe que tanto se esforçou pelos meus estudos iniciais e ao meu pai , que o senhor já recolheu, a realização de seu sonho .

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Professora Marília Afonso Rabelo Buzalaf, pela oportunidade me dada para realização deste mestrado.

Ao Dr. Eulázio Taga por sua indicação e apoio.

A Baumer representada por seu corpo, principalmente, pela Dra Zizi (assim chamada carinhosamente) ; Elizeu por ter acreditado desde o primeiro dia em que nos conhecemos e todos os outros.

Ao meu companheiro de viagem, Ricardo Machado, por passarmos horas em idas e vindas de Bauru.

Aos amigos Marcio Martins e Marcelo Grandi por estarem sempre administrando, na minha ausência, os dias em que não me encontrava presente.

A Dra Camila Peres Buzalaf por tanto me ajudar com seus conhecimentos, sem ela jamais teria condições de ter chego até aqui.

Aos funcionários da casa por serem sempre prestativos e atenciosos.

Aos colegas de mestrado e doutorado.

“...Entender o problema?

Eu não entendo.

Mas vi o meu Deus tão grande, incomparável!

Vi seu amor por mim, imensurável .

Seu é todo o poder :

Tudo pode fazer

Tudo pode entender

E é o meu Pai. ”

Renato Mazzonetto

RESUMO

As hidroxiapatitas (HA) são amplamente utilizadas como biomateriais osteocondutores, mas não possuem propriedades osteoindutoras e osteogênicas. O fluoreto, por sua vez, quando presente no meio em doses adequadas (da ordem de 10^{-5} M), é capaz de aumentar a proliferação de osteoblastos e a atividade da fosfatase alcalina. Assim, o objetivo do presente estudo foi modificar um biomaterial existente, constituído por HA bifásica (70% HA + 30% β -TCP) porosa, pela adsorção de fluoreto. A capacidade de liberação de fluoreto deste material para meio de cultura osteogênico foi também avaliada. Foi ainda feita caracterização físico-química do material com fluoreto adsorvido, em comparação ao material original (FTIR, DRX e MEV). Para os ensaios de adsorção de fluoreto, soluções com diferentes concentrações deste elemento, na forma de NaF, foram adicionadas à HA bifásica na proporção de 10 g de HA por 50 mL de solução contendo fluoreto. Os testes foram feitos em duas etapas. Na primeira etapa, as concentrações de fluoreto empregadas variaram entre 100 e 2000 ppm e foi feita incubação por 3, 6, 18 ou 24 h, em temperatura ambiente, sob agitação constante. Após estes intervalos de tempo, removeu-se o sobrenadante e colocou-se o restante na estufa a 40°C, até a completa secagem dos grânulos. Os mesmos foram armazenados para posterior quantificação de fluoreto adsorvido, que foi feita com o eletrodo, após difusão facilitada por hexametildisiloxano. Na segunda etapa, as concentrações de fluoreto empregadas variaram entre 0,625 e 80 ppm, sendo feita incubação por 24 ou 48 h. Para a avaliação da liberação de fluoreto da HA adsorvida, as amostras de HA com fluoreto adsorvido foram incubadas à temperatura ambiente com meio de cultura

α -MEM, na proporção de 10 g de HA por 50 mL de meio, sob agitação, por 3, 6, ou 24 h e o sobrenadante foi coletado para quantificação de fluoreto. Foi observada uma relação dose-resposta entre a concentração de fluoreto que se adsorveu à HA e concentração de fluoreto presente nas soluções em que a HA foi incubada. O tempo de incubação nas soluções fluoretadas não alterou a concentração de fluoreto adsorvido (exceto para uma diminuição da adsorção para o tempo de 48 h). A porcentagem de adsorção de fluoreto variou entre 15 e 35%. Houve uma redução na concentração de fluoreto liberada para o meio, em função da redução da concentração de fluoreto na solução de incubação da HA. Liberações da ordem de 10^{-5} M foram observadas para a HA incubada por 24 h em 80 ppm fluoreto. A avaliação físico-química da HA bifásica porosa com fluoreto adsorvido revelou características semelhantes ao material original, sem fluoreto adsorvido. Em conclusão, a incubação da HA bifásica porosa em solução contendo 80 ppm de fluoreto por 24 horas é capaz de levar a uma adsorção de fluoreto tal que permite a liberação deste elemento na ordem de 10^{-5} M em meio de cultura osteogênico. Esta adsorção de fluoreto não altera as propriedades físico-químicas do material.

Palavras-chave: Hidroxiapatita, Flúor, Incorporada

ABSTRACT

Hydroxyapatites (HA) are broadly employed as osteoconductive biomaterials, but they do not possess osteoinductive or osteogenic properties. Fluoride, when present in the environment in appropriate doses (around 10^{-5} M) is able to increase the proliferation of osteoblasts and the activity of alkaline phosphatase. Thus, the aim of the present study was to modify an existing biomaterial (biphasic HA, containing 70% HA and 30% β -TCP), through the adsorption of fluoride. The ability of this material to release fluoride for osteogenic culture medium was also evaluated. The biomaterial containing adsorbed fluoride was characterized physico-chemically (FTIR, DRX and SEM), in comparison to its counterpart without adsorbed fluoride. For the fluoride adsorption experiments, solutions with different fluoride concentrations (as NaF) were added to biphasic HA (10 g HA : 50 mL fluoride-containing solution). Tests were carried out in 2 stages. In the first stage, fluoride concentrations used ranged between 100 and 2000 ppm. Incubation was done for 3, 6, 18 or 24 h, at room temperature, under constant agitation. After incubation, supernatant was removed and the pellets were allowed to dry at 40°C. The resulting material was stored for subsequent fluoride analysis that was done with the electrode, after hexamethyldisiloxane-facilitated diffusion. In the second stage, the fluoride concentrations ranged between 0.625 and 80 ppm and incubation was carried out for 24 or 48 h. For the evaluation of the release of adsorbed fluoride, samples of HA containing adsorbed fluoride were incubated in α -MEM medium at room temperature (10 g HA : 50 mL medium), under agitation, for 3, 6 or 24 h. Supernatant was collected for fluoride quantification. A dose- response relationship

was observed between the concentration of fluoride that adsorbed to HA and the fluoride concentration in the incubation solutions. The time of incubation did not change the concentration of adsorbed fluoride (except for a reduction in adsorption for 48 h). The percentage of fluoride adsorption ranged between 15 and 35%. It was observed a reduction in the concentration of fluoride that was released to the medium, as a function of the reduction of the fluoride concentration in the incubation solution. Fluoride releases around 10^{-5} M were observed for HA incubated with 80 ppm fluoride for 24 h. Physico-chemical evaluation of the porous biphasic HA containing adsorbed fluoride revealed a pattern similar to the one observed for the original material (without adsorbed fluoride). In conclusion, the incubation of porous biphasic HA in a solution containing 80 ppm fluoride for 24 h allows adsorption of F to HA to an extent that allows the release of 10^{-5} M fluoride concentrations to the medium. In addition, fluoride adsorption to HA does not change the physico-chemical properties of the material.

Key words: Hidroxyapatite, Fluorine, Incorporation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Concentração de fluoreto adsorvido à HA bifásica em função da incubação em soluções contendo diferentes concentrações de fluoreto (na forma de NaF) por 3, 6, 12 ou 24h	62
Figura 2	- Porcentagem de adsorção de fluoreto à HA bifásica em função da incubação em soluções contendo diferentes concentrações de fluoreto (na forma de NaF) por 3, 6, 12 ou 24 h	63
Figura 3	- Concentração de fluoreto adsorvido à HA bifásica em função da incubação em soluções contendo diferentes concentrações de fluoreto (na forma de NaF) por 24 ou 48	64
Figura 4	- Porcentagem de adsorção de fluoreto à HA bifásica em função da incubação em soluções contendo diferentes concentrações de fluoreto (na forma de NaF) por 24 ou 48h	65
Figura 5	- Concentração de fluoreto liberada em meio de cultura a partir de HA previamente incubada com soluções contendo diferentes concentrações de fluoreto. A liberação foi avaliada nos tempos de 3, 6 e 24 h	67
Figura 6	- Difratoograma DRX obtido para a amostra de HA bifásica com fluoreto adsorvido	69
Figura 7	- Difratoograma DRX obtido para a amostra de HA bifásica com fluoreto adsorvido	69
Figura 8	- Eletromicrografia da cerâmica bifásica HA/TCP porosa com adsorção de fluoreto com aumentos de 1000x e 1500x	71
Figura 9	- Eletromicrografia da cerâmica bifásica HA/TCP porosa sem adsorção de fluoreto com aumentos de 1000x e 1500x	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise qualitativa de fases de hidroxiapatita bifásica com fluoreto adsorvido	68
Tabela 2 - Valores obtidos das quantificações de fases (%) para a HA com fluoreto adsorvido	68
Tabela 3 - Análise comparativa dos testes de DRX para as amostras de HA bifásica com e sem fluoreto adsorvido.....	69
Tabela 4 - Descrição das principais bandas apresentadas no espectro da amostra.....	70

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

BDM	Densidade mineral óssea
BPMs	Proteínas morfogenéticas
Ca	Cálcio
Ca ⁺²	Íon cálcio
CaF ₂	Fluorita
Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ F ₂ .	Fluorapatita
DFDBA	Osso congelado desmineralizado e liofilizado
DRX	Difração de raio x
F ⁻	Íon fluoreto
FAL	Fosfatase alcalina □
FAP	Fluorapatita
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
FITR	Espectroscopia no infra-vermelho por transformada de Fourier
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
HA	Hidroxiapatita
HAB	Hidroxiapatita Bifásica
HMDS	Hexotetildisoloxano
IGF	Fator de crescimento insulínico □
IGFs	Fator de crescimento similar à insulina □
MAPK	Proteínas quinase ativadas por mitógenos
M-CSF	Fator estimulador de colônia dos macrófagos
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Mg	Magnésio
MMP	Metaloproteinase da Matriz
MMP-2	Gelatinase A - 2 kda □
MMP-9	Gelatinase B - 92kda □
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MsC	Células tronco mesenquimais □ □
NaF	Fluoreto de sódio □
Na ₃ AlF ₆	Fluorita

OC	Osteocalcina
OH	Hidroxila
OPG	Osteoprotegerina
P	Fósforo
PCL	Poliprolactona
PEC	Polietilenoglicol
PDGF	Fatores de crescimento derivados de plaquetas
PGA	Ácido poliglicólico
PLA	Ácido polilático
PTFE	Politetrafluoretileno
PTP	Phosphotyrosine phosphatase
RANK	Ativador do receptor do fator kappa B nuclear
RANKL	Ligante da RANK
Si	Silício
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato

LISTA DE SÍMBOLOS

β -TCP	Beta fosfato tricalcio
μm	Micrometro
Mm	Micromolar
μL	Mililitro
ppm	Parte por milhão
g	gramas
mg	Miligramas
M	Molar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	SINTESE DA LITERATURA	23
2.1	ENXERTOS.....	24
2.1.1	Enxerto Autógeno.....	24
2.1.2	Enxerto Homogeno.....	25
2.1.3	Enxerto Xenógeno.....	25
2.1.4	Enxerto Sintético	26
2.2	ENGENHARIA TECIDUAL	27
2.2.1	Magnésio.....	30
2.2.2	Fluoreto	31
2.2.2.1	Fluorose esquelética	32
2.2.2.2	Fluoreto e o tecido mineralizado.....	35
3	PROPOSIÇÃO	47
4	MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1	HA-TCP	51
4.2	Adsorção de fluoreto à HA bifásica	51
4.3	Quantificação de fluoreto adsorvido à HA bifásica	52
4.4	Liberação de fluoreto em meio de cultura	53
4.5	Quantificação de fluoreto liberado em meio de cultura a partir da HA bisafasica com Fluoreto adsorvido	54
4.6	Caracterização físico-química da HA bifásica com fluoreto adorvido.....	54
4.6.1	Difração de RX	54
4.6.2	Espectroscopia no infra-vermelho por transformada de Fourier.....	55
4.6.3	Relação cálcio-fósforo	56
4.7	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
	REFERÊNCIAS.....	79

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo altamente especializado e com capacidade de reparo. A capacidade de reparo tecidual pode variar de acordo com alguns fatores como: tipo de tecido lesionado, extensão da agressão, contaminação da área lesionada e outros. Sabe-se que a reparação óssea segue caminhos e etapas semelhantes à formação embriogênica dos ossos, sugerindo que mecanismos moleculares e celulares sejam semelhantes nos dois processos (ROSEN, THIES, 1992; HING, 2004; BAHAR et al., 2007). O reparo é um processo de múltiplo estágio envolvendo migração, proliferação, diferenciação e ativação de inúmeros tipos celulares (MANDRACCHIA, NELSON, BARP, 2001).

A atividade de síntese do tecido ósseo é mediada pelos osteoblastos (ROODMAN, 2007), células que derivam das células-tronco do tecido conjuntivo. Estas são responsáveis pela síntese dos constituintes orgânicos e também pela mineralização da matriz osteoide. Estas células, *in vivo*, encontram-se emparelhadas nas superfícies ósseas, em um arranjo que lembra um epitélio simples. Quando em intensa atividade sintética, apresentam-se cuboides e, em baixa atividade, tornam-se achatadas (HARADA, RODAN, 2003; NANJI, 2008; JUKES et al., 2008).

O processo de reabsorção óssea é realizado pelos osteoclastos em intensa comunicação com os osteoblastos (TEITELBAUM, 2000; HADJIKAKIS, ANDROULAKIS, 2006). O sistema de sinalização, que permite a interação de osteoclastos e osteoblastos, é formado por uma tríade de proteínas: OPG (osteoprotegerina), ativador do receptor do fator kappa B nuclear (RANK) e seu ligante RANKL (SOLTANOFF et al., 2009; KOBAYASHI, UDAGAWA, TAKAHASHI, 2009).

A formação e a reabsorção óssea são eventos dinâmicos e dependentes da ação de alguns moduladores, como hormônios (paratormônio, calcitonina e vitamina D3) (ALLORI, SAILON, WARREN, 2008; SOLTANOFF et al., 2009), fatores de crescimento (como as proteínas morfogenéticas ósseas, BMPs) (MARTIN, GOOI, SIMS, 2009), citocinas (RANK, e seu ligante RANKL, OPG) (KOBAYASHI, UDAGAWA, TAKAHASHI, 2009), MMPs (metaloproteinases de matriz) (ALLORI, SAILON, WARREN, 2008), fosfatase alcalina e TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato) (SOLTANOFF et al., 2009), entre outros. Essas proteínas têm sido estudadas principalmente com a finalidade de se analisar a dinâmica da neoformação/reabsorção que ocorre dentro da homeostasia óssea.

Esses eventos, de formação e reabsorção óssea, podem ser influenciados ou modulados por diversos agentes. O fluoreto se destaca como um íon que parece alterar sobremaneira a atividade de osteoblastos (LAU, BAYLINK, 1993), seja por influência sistêmica (OHMI et al., 2005) ou pela sua presença em cristais de apatita (fluorapatita) (QU, WEI, 2006; COOPER et al., 2006; KÜRKÇÜ et al., 2008). O fluoreto é usado em protocolos de tratamentos de osteoporose, mostrando diminuir a incidência de fraturas ósseas e aumentar a densidade de massa óssea em humanos (HAGUENAUER et al., 2000). Entretanto, outros dados da literatura mostram que o fluoreto, em altas concentrações na água de abastecimento, pode promover algumas alterações de ordem patológica nos tecidos ósseos como osteopetrose adquirida (alteração caracterizada pelo aumento de densidade óssea em virtude de defeito na atividade de osteoclastos) (HALLANGER-JOHNSON et al., 2007; TAMER et al., 2007) e fluorose esquelética (ORUC, 2008). É sabido que o fluoreto interage com os tecidos mineralizados e, em concentrações elevadas, pode prejudicar o processo de mineralização (AOBA, FEJERSKOV, 2002). É, portanto, necessário

utilizar uma dose adequada quando se pensa em avaliar o potencial osteoindutor do fluoreto.

As hidroxiapatitas (HA), com fórmula estrutural geral $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, são amplamente utilizadas como biomateriais osteocondutores para aplicações odontológicas e ortopédicas (LeGEROS, 1994; HONG et al., 2010; ZHOU et al., 2011). A fim de se aprimorar algumas características dos substitutos ósseos à base de HA, como o potencial osteoindutor, capacidade de osteointegração e propriedades mecânicas, as cerâmicas à base de HA podem ser dopadas com pequenas quantidades de íons que são naturalmente encontrados no mineral ósseo, especialmente cátions divalentes (de LIMA et al. 2011; ERGUN et al., 2002; LIM et al., 2012). Alguns estudos têm avaliado a possibilidade de se substituir a hidroxila da apatita pelo fluoreto, constituindo a fluorapatita (FAP) (CHISTOPHER et al., 2014). Entretanto, a incorporação de fluoreto à estrutura da HA, constituindo a FAP, torna a estrutura mais hexagonal, estável e menos solúvel que a HA estequiométrica (BUZALAF et al., 2011). Desta maneira, não se trata de estratégia apropriada quando se pensa na capacidade de o biomaterial liberar fluoreto para o meio.

Em virtude disto, pensou-se na estratégia de se utilizar um biomaterial osteocondutor (hidrodiapatita bifásica), ao qual fosse adsorvido fluoreto, que poderia ser liberado para o meio, onde pudesse exercer suas propriedades osteoindutoras. Uma vez que a dose de fluoreto presente no ambiente é fundamental para uma adequada resposta dos osteoblastos, torna-se necessário inicialmente caracterizar este biomaterial, assim como avaliar o seu potencial de liberação de fluoreto para o meio.

2 SINTESI DA LITERATURA

2 SINTESE DA LITERATURA

O reparo de defeitos ósseos nos maxilares causados por traumas, neoplasias e doenças neonatais ainda é um grande desafio para a cirurgia bucomaxilofacial. Tanto para a estética como para um resultado funcional bem-sucedido, a quantidade de osso vital é fundamental para a colocação de implante endo-ósseo em maxilares (BUSSRE, 2009; PERROT et al, 1992; NARY et al, 2004). Nesse sentido, a velocidade e a qualidade do processo de remodelação óssea são de vital importância para a redução de tempo na reabilitação dos pacientes e para a promoção da ancoragem que viabilize os implantes dentários (LEONETTI, 2003).

A literatura sobre enxerto ósseo tem seu início em 1682, com Van Meeken transplantando o osso do crânio de um cão para um defeito cranial humano. Com o passar do tempo, os enxertos ósseos começaram ser mais usados fornecendo uma maior previsibilidade e assim aumentando o sucesso clínico nos procedimentos, muito embora houvesse muita discussão e opiniões contrárias quanto ao aspecto biológico e reparacional dos enxertos, eles se consolidaram e são uma realidade viável nos dias de hoje (CHASE, S. & HERNDON, 1955). No ano de 2013 foram realizados mais de 500.000 enxertos homólogos no Brasil, sendo a odontologia responsável por mais de 90% dos casos (RBT).

Mais recentemente, outra possibilidade altamente promissora e inovadora é dada pela engenharia tecidual. Utilizando células ou através de incorporações de elementos químicos, em meios adequados, consegue-se formar tecido ósseo em locais desejados, possibilitando desta forma o reparo de defeitos antes impossíveis de se regenerar (SCHLIEPHAKE et al., 2001).

2.1 ENXERTOS

Há muito tempo os enxertos vêm sendo utilizados em cirurgia bucais e são alvo de diversos estudos, desde 1923, onde Herdeus propôs o uso do osso da tíbia na reconstrução óssea gerada pela doença periodontal (TAKEI et al, 2011).

Os enxertos podem ser divididos em: a) Autógenos ou autólogos quando o tecido doador é do mesmo indivíduo; há uma zona dadora, onde se faz a captação do osso necessária e uma zona receptora onde será depositado; b) Alógenos ou homogenos, quando o tecido é transplantado de outro indivíduo da mesma espécie; c) Xenógenos ou heterólogos quando o tecido transplantado é de espécie diferente do receptor (LANE,1995) ou d) Sintéticos, que são totalmente ou quase que totalmente de origem sintética (OLIVEIRA et al., 1999; CARVALHO et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2004; SICCA et al., 2005; FROUM et al., 2006; SCARANO et al., 2006; HOLN et al., 2008; TRUBIANI et al., 2010; MELO et al., 2012).

2.1.1 ENXERTOS AUTÓGENOS

A utilização da técnica de reconstrução óssea baseada em osso autógeno na odontologia teve início no final dos anos 80 com Boyne e James. Através da utilização de osso ilíaco no seio maxilar, esses pesquisadores obtiveram resultados promissores com relação à formação óssea na maxila. Sabe-se que o osso autógeno é o padrão ouro da enxertia devido às suas características osteoindutoras, osteocondutoras e osteogênicas (BLOCK, KENT,1997). No entanto, o auto-enxerto é revestido de morbidade e em alguns casos a quantidade de osso se torna insuficiente (RAGHOEBAR et al., 2001; FROUM et al., 2006).

Sua principal vantagem é a transferência de células osteoprogenitoras juntamente com a matriz orgânica e inorgânica, além de ser considerado o enxerto ideal em relação à biocompatibilidade imunogênica e potencial osteogênico (HUNT, JOVANOVIC, 1999).

2.1.2 ENXERTOS HOMÓGENOS

São produzidos com ossos de indivíduos da mesma espécie, procedentes de bancos de ossos e processados de modo a conservar suas propriedades osteoindutora e osteocondutora. O mais amplamente utilizado, pela liberação facilitada de fatores de crescimento, é o DFDBA (osso congelado desmineralizado e liofilizado). A desmineralização é feita através de produtos químicos altamente alcalinos, mantendo-se o poder osteocondutivo e osteoindutor, por conter as proteínas morfogenéticas osseas (BMPs). Os DFDBAs diferem muito na sua capacidade de osteoindução, pois as quantidades de BMPs presentes também são distintas entre os bancos de osso e entre as amostras do mesmo banco (PRUSS et al, 2003) e podem provocar ainda interação antigênica) e risco de infecção.

2.1.3 ENXERTOS XENOGENOS

Os xenoenxertos vêm sendo estudados como biomateriais desde os anos 60, incluindo ensaios clínicos para preenchimento de defeitos ósseos (MELCHER; DENT, 1962).

Os enxertos de origem bovina como materiais de preenchimento, quando adequadamente preparados e implantados no tecido subcutâneo possuem uma

resposta tecidual semelhante à dos enxertos alógenos (OLIVEIRA et al., 1999; SICCA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2003; ROSA et al., 2003). Dentre os materiais xenógenos, a matriz óssea desmineralizada é a mais utilizada, devido à sua biocompatibilidade (TAGA et al., 1997; TAGA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2000)

2.1.4 ENXERTOS SINTÉTICOS

Em geral, estes materiais exibem boa resistência à compressão e pouca resistência à tensão, similares ao osso humano. São exemplos de materiais aloplásticos as HAs, componentes inorgânicos do tecido calcificado do corpo humano, que podem ser reabsorvíveis ou não reabsorvíveis e possuem uma proporção de cálcio:fósforo de 10:6. Esta semelhança estrutural com a apatita óssea mineral permite crescimento por contato quando implantado no tecido ósseo. O fosfato tricálcico apresenta estrutura semelhante à HA sua proporção de cálcio:fósforo de 10:5 (ELLIOT, C., 1994), sendo bioativo e com propriedades osteocondutoras, além de possuir capacidade de ser reabsorvido por dissolução química (De acordo com MISCH & DIETSH, 1993; GARG et al., 1999).

A velocidade da reabsorção (degradação) pode aumentar de acordo com o aumento da área superficial (pó > sólido poroso > sólido denso) e com o decréscimo da cristalinidade (RATNER, B.D., et al., 1995, KAWASHI, E.Y., 1997), induzindo o crescimento ósseo no interior do biomaterial aloplástico poroso (SCHLIEPHAKE et al., 2001). Desta forma, que a remodelação na HA é mais lenta em comparação ao β -TCP. Estudos mostraram que, após um período de 12 meses, o β -TCP foi totalmente absorvido sendo que a HA permanece por mais de 5 anos (HENCH, L. L.; WILSON, J., 1993)

Tratamentos alterando a temperatura e pressão levaram à formação das HA bifásicas em diferentes proporções entre HA e β -TCP (BIGI, A., et al., 1993). Trabalhos comparativos demonstraram que a HA bifásica possui uma reabsorção maior em relação à HA pura, favorecendo a deposição óssea (GOSAIN et al, em 2005).

As apatitas possuem a fórmula química $M_{10}(Y_6)Z_2$ e formam soluções sólidas. Trabalhos recentes vêm realizando a troca destes dos elementos M^{+2} , Y^{-3} ou Z^{-} . Os elementos M^{+2} são tipicamente cátions divalentes como Ca^{+2} , Sr^{+2} , Ba^{+2} , Pb^{+2} , Mg^{+2} . Os elementos Y^{-3} são os ânions trivalentes: PO_4^{-3} , AsO_4^{-3} e CrO_4^{-3} . Os ânions monovalentes Z^{-} são geralmente F^{-} , OH^{-} , B^{-} e Cl^{-} . Os diferentes grupos das apatitas são referenciados com base nos seus ânions predominantes, ou seja, fluorapatita (F), hidroxiapatita (OH), cloroapatita (Cl). entre outros. Este desarranjo altera a cristalinidade e a porosidade, interferindo diretamente na remodelação do biomaterial (HENCH & WILSON, 1993).

2.2 ENGENHARIA TECIDUAL

A engenharia tecidual é definida como o campo da ciência que estuda a restauração funcional e fisiológica de estruturas teciduais deterioradas ou perdas teciduais decorrentes de doenças. Na odontologia, a engenharia tecidual tem interesse especial, por se apresentar como uma nova alternativa para a promoção da regeneração de diferentes tecidos como, por exemplo, o dentinopulpar, o periodontal, a cartilagem da articulação temporomandibular e o ósseo (CASAGRANDE, SILAVALAUXE, FERNANDES, 2009). Ela é baseada em três

princípios básicos da biologia tecidual: 1- as células-tronco osteoprogenitoras, 2- o arcabouço, constituído pela matriz extracelular, que mantém o contorno do tecido e 3- as substâncias indutoras do crescimento e diferenciação celular (Partridge et al., 2002).

Com relação à reconstrução de um defeito ósseo, a eficácia de várias técnicas de engenharia tecidual utilizando diferentes tipos de arcabouços, de substâncias bioativas e/ou células foi amplamente demonstrada (STEVENS, 2008). De fato, um material para ser empregado na engenharia de tecidos deve ter como características principais: baixa toxicidade, boas propriedades mecânicas nas condições fisiológicas, porosidade que permita um ancoramento das células, baixa imunogenicidade, bioatividade e/ou biodegradabilidade (BERTONI et al, 1998). Os materiais poliméricos sintéticos possuem um amplo potencial devido às suas boas características de processamento. Podem ser produzidos em variadas formas, como retículos fibrosos, esponjas ou espumas e hidrogéis. O ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA), polietilenoglicol (PEG) e a poliprolactona (PCL) estão entre os materiais poliméricos mais utilizados (BONASSAR, 1998). Além desses, existem os materiais cerâmicos, compostos, entre outros, pelo fosfato de cálcio. O desenvolvimento de arcabouços compostos de HA sintética ou natural, sozinha ou em associações, é bastante estudado devido à semelhança química com os componentes presentes na matriz óssea natural (BERTONI et al, 1998). Embora esses materiais inorgânicos não exibam capacidade osteoindutora, eles certamente possuem capacidade osteocondutora, assim como uma extraordinária capacidade de se ligar diretamente ao osso (BURG et al. 2000).

Embora células em diferentes estágios da diferenciação tenham sido introduzidas para a aplicação na engenharia do tecido ósseo, é imprescindível que

essas células passem por processos osteoindutores durante a cultura celular, antes do transplante das mesmas. Dentre esses fatores, as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) e sinvastatinas constituem as principais indutoras da diferenciação osteogênica através da ativação de diferentes vias de sinalização intracelular (NAKASE et al., 2006; WADAGAKI et al., 2011, XIAO et al., 2002; KIM et al., 2013, MIRAOUI et al., 2009). O programa de diferenciação osteogênica a partir das células tronco mesenquimais (MsC) é caracterizado inicialmente por recrutamento celular, seguido da diminuição da sua capacidade proliferativa e da consequente expressão organizada e temporal dos genes Runx-2, fosfatase alcalina, colágeno tipo I e osteocalcina, sendo este último associado com a mineralização da matriz extracelular (KARSENTY, 2000; AUBIN, 2001). Dessa forma, os marcadores bioquímicos da remodelação óssea podem ser divididos em marcadores da formação e de absorção óssea. Os marcadores de formação óssea incluem a fosfatase alcalina óssea específica (FAL), uma enzima essencial para a mineralização óssea. Além disso, várias proteínas da matriz extracelular incluindo a osteocalcina (OC), osteopontina, colágeno tipo 1, sialoproteína e proteoglicanas são secretadas e depositadas por osteoblastos maduros, os quais são alinhados sobre a superfície do osso (YOUNG et al., 1992; BIANCO et al., 1993; MUNDLOS & OLSEN, 1997). Embora o papel de diferentes substâncias osteocondutoras seja bastante conhecido, sua aplicação ainda é restrita devido ao custo para a produção de grandes quantidades de proteínas recombinantes. Portanto, a utilização de substâncias economicamente mais acessíveis poderia ter grande impacto na engenharia do tecido ósseo. Nesse sentido, o fluoreto, na forma de NaF, aumenta, de maneira dose-dependente, a proliferação de CTM murinas indiferenciadas, além de promover a diferenciação

osteogênica, com aumento da síntese de colágeno tipo I e da mineralização óssea (PERES-BUZALAF et al., 2010)

2.2.1 MAGNÉSIO

O magnésio (Mg) é um elemento fundamental na prevenção da osteoporose e tem atraído a atenção por interferir no processo de calcificação, influenciando na formação e crescimento dos cristais de HA (AINA, V et al., 2012). O Mg é, sem dúvida, um dos mais importantes íons bivalentes associados às apatitas biológicas. Observou que em tecidos calcificados, a associação do Mg à apatita é maior no início do processo de remodelação óssea, diminuindo à medida em que a calcificação aumenta (GOUVEIA, D. S., 1998)

O aumento da concentração de Mg na HA tem os seguintes efeitos sobre suas propriedades: diminuição da cristalinidade, aumento da proteína HPO-24 incorporada, e aumento da área de dissolução (SUCHANEK, W. L., et al., 2003; KALITA, S. J., BHATT, H. A., 2006).

Quando existe simultaneamente a introdução do Mg e do fluoreto, existirá uma desestabilização da estrutura, inibindo a cristalização da HA, pela presença do Mg, o que, combinado à ação do fluoreto, irá resultar numa apatita com composição estrutural e estabilidade muito próximas das características das apatitas naturais (BERTONI, E. et al., 1998).

2.2.2 FLUORETO

O flúor tem seu nome originado do latim *fluere*, que significa fluir. Em temperatura ambiente é um elemento gasoso e não metálico, extremamente reativo, de cor amarelo-pálido, odor característico e propriedades tóxicas. Pertence ao grupo VII A ou 17 da tabela periódica, também chamado de halogênios. Seu símbolo é F, número atômico 9 e peso atômico 19. Por ser muito pequeno, as eletrosferas dos dois átomos na molécula de F₂ (F - F) ficam muito perto, enfraquecendo sua ligação, o que torna esta molécula muito instável. O pequeno raio do átomo de flúor faz ainda com que seu núcleo seja menos blindado, o que o torna o elemento mais eletronegativo e reativo da tabela periódica. Estas características fazem com que o íon se ligue facilmente a qualquer outro elemento, e estas ligações são mais estáveis que a de uma molécula de F₂. Reage prontamente com seu ambiente, comportando-se como íon flúor ou fluoreto, sendo a fluorita (CaF₂), a criolita (Na₃AlF₆) e a fluorapatita [Ca₅(F)(PO₄)₃] os minerais mais importantes no qual está presente (SERRA, SARTINI, CURY, 1989).

O fluoreto, uma vez ingerido, distribui-se rapidamente pelo organismo. Do ponto de vista farmacocinético, o plasma é considerado o compartimento central de distribuição do fluoreto, pois ele é o fluido no qual e pelo qual o fluoreto deve passar para sua subsequente redistribuição e eliminação (WHITFORD, 1996). A ingestão persistente e exagerada de fluoreto pode causar a fluorose, que pode ser tanto dentária quanto esquelética, que será descrita a seguir .

2.2.2.1 FLUOROSE ESQUELÉTICA

Um sólido conceito já estabelecido em saúde ambiental é que os efeitos dos agentes tóxicos seguem um processo contínuo de mudança biológica, transitando de sintomas praticamente indetectáveis quando em baixos níveis de exposição, até os severos danos à saúde em altas doses (HILEMAN, 1988). A deficiência de fluoreto resulta em retardo no crescimento e desenvolvimento, enquanto que a ingestão excessiva pode levar à esclerose do esqueleto (RINGE, 2002). Com o aumento da exposição ao agente, o primeiro efeito detectável pode ocorrer como uma leve alteração bioquímica, como por exemplo, a redução da atividade de alguma enzima. Essa elevação da dose causa as eventuais alterações nas funções fisiológicas, mas ainda são raramente detectadas como sintomas ou efeitos adversos desse agente e, neste caso, podem ser considerados como “precursores” dos efeitos mais sérios. À medida em que essa dosagem aumenta, os efeitos adversos começam a aparecer como sintomas moderados, que finalmente progridem para os casos mais severos (HILEMAN, 1988).

A fluorose esquelética é causada pela exposição crônica e excessiva ao fluoreto (ingestão de mais de 10 mg por dia, por pelo menos 10 anos), uma condição caracterizada pelo surgimento da osteoesclerose, calcificação dos ligamentos, e frequentemente acompanhada pela osteoporose, osteomalácia ou osteopenia (JOHNSON et al., 2007; EVERETT, 2010). Essa exposição pode ocorrer através da ingestão ou inalação, sendo mais comumente causada por altos níveis de fluor na água ou exposição a chaminés ou pó industrial. Outras fontes potenciais de exposição significativa incluem alguns tipos de chás e vinhos, suplementos fluoretados, dentifrícios e enxaguantes bucais (KRISHNAMACHARI, 1986). É

endêmica em algumas partes do mundo, mais precisamente na Índia, África e China, que apesar de milhões de pessoas serem afetadas em todo mundo, é fato raro em áreas como a Europa e América do Norte. Nesses casos, o que acontece é o consumo excessivo de chás, vinhos, água ou dentifrício fluoretados (KURLAND et al., 2007; CUNDY, 2007; WHYTE et al., 2005; JOSHI et al., 2010).

O fluoreto é rapidamente absorvido pelo trato intestinal, sendo que aproximadamente 50% é incorporado nos ossos, principalmente como hidroxifluoroapatita e o restante é excretado através da urina (WHITFORD, 1994). Apesar de estimular a proliferação de osteoblastos e aumentar a formação óssea, este osso formado pode ser anormal e de qualidade inferior (GRUBER, BAYLINK, 1991; RIGGS et al., 1994; BALENA et al., 1998). Uma vez incorporado no esqueleto, possui meia vida de cerca de sete anos (JOSHI et al., 2010).

A fluorose esquelética possui inúmeros estágios, sendo os dois primeiros pré-clínicos, ou seja, o paciente não é capaz de sentir os sintomas, apesar dessas alterações já serem uma realidade para esse paciente. No primeiro estágio pré-clínico, anormalidades bioquímicas ocorrem no sangue e na composição dos ossos, e, no segundo, há alterações histológicas nas biópsias dos ossos (HILEMAN, 1988).

No início do primeiro estágio clínico da fluorose esquelética, os sintomas incluem dores nos ossos e nas juntas, sensações de queimação e formigamento nos membros, fraqueza muscular, fadiga crônica, desordens gastrintestinais e redução do apetite. Durante essa fase, as alterações na pélvis e na coluna podem ser detectadas em raio X, e o osso exibe uma estrutura mais proeminente e mal definida (HILEMAN, 1988). As características radiológicas desta doença incluem: aumento da densidade óssea, ofuscamento da trabécula, compactação da espessura do osso, formação de osso no periósteo e ossificação de tendões, ligamentos e

músculos, (WANG et al., 2007), ocorrendo principalmente na coluna espinhal, pélvis e quadris (STEVENSON, WATSON, 1957).

No segundo estágio clínico, as dores nos ossos são uma constante e há a calcificação de alguns ligamentos. A osteoporose pode ocorrer em ossos longos, além de sintomas iniciais de osteoesclerose (a condição em que os ossos se tornam mais densos e com estrutura dos cristais anormais) e osteomalácia. Esporões ossificados podem aparecer nos membros, principalmente ao redor do joelho, cotovelo e na superfície da tíbia e ulna. Nos estágios mais avançados, chamados de fluorose esquelética deformante, há o enfraquecimento das extremidades e dificuldade na movimentação de juntas. As vértebras podem se fundir parcialmente, paralisando o paciente (KRISHNAMACHARI, 1986).

A análise de biopsias de osso da crista ilíaca descalcificada de quatro crianças (6 a 11 anos) com fluorose esquelética, na qual apresentavam deformidades severas na coluna espinhal, quadril e joelhos, mostrou que houve um espessamento, e formação de osso trabecular hipercalcificado com desorganização na orientação lamelar (TEOTIA et al., 1971). Segundo Lian e Wu (1986), a osteopenia na fluorose ocorre em ossos longos, tal como a parte distal do rádio, e são os primeiros sinais do desenvolvimento da fluorose esquelética. Porém, os mesmos autores também relatam a ocorrência de osteoesclerose na coluna espinhal e pélvis, concluindo que os esqueletos axial e apendicular exibem respostas distintas durante o processo patológico. Krishnamachari (1986) relatou severa osteoporose na região distal do fêmur, região proximal da tíbia e região proximal da fíbula juntamente com a redução da densidade dos ossos do metacarpo.

Neste ponto, é importante destacar que são diversos os fatores que podem influenciar o tipo de alteração provocado pela intoxicação com o flúor nos ossos,

dentre eles a natureza, dose e duração da exposição, status nutricional, respostas hormonais, idade, sexo, tipo de osso afetado (compacto ou trabecular), herança genética e hábitos nutricionais (WANG et al., 2007).

2.2.2.2 FLUORETO E O TECIDO MINERALIZADO

Aproximadamente 99% do fluoreto retido no organismo está associado aos tecidos mineralizados, principalmente ao osso, mas também ao esmalte e à dentina. A concentração de fluoreto presente no osso é geralmente proporcional à ingestão ao longo do tempo (WHITFORD, 1994; 1999). Portanto, ávido por tecidos calcificados, o fluoreto tem grande habilidade em estimular a formação de novo osso, assim como reverter a formação de lesões iniciais de cárie (WHITFORD, 1996).

A utilização do fluoreto no tratamento de doenças ósseas vem sendo sugerida há muito tempo, como no caso da osteoporose, que começou a ser tratada com fluoreto em 1964 (REID et al., 2007). Entretanto, após muitos anos de pesquisa, esse tratamento continua controverso, já que o fluoreto possui um efeito duplo nos osteoblastos. Por um lado, ele aumenta o número de osteoblastos no tecido, devido a seu efeito mitogênico nos precursores dos osteoblastos; por outro, possui um efeito tóxico considerando-se a célula individualmente, prejudicando a mineralização e reduzindo a taxa de aposição mineral (DEQUEKER, DECLERCK, 1993). Em adição, o fluoreto se acumula no tecido ósseo, que pode ser considerado um biomarcador para exposição crônica (DUNIPACE et al., 1995) e aguda ao fluoreto (BEZERRA DE MENEZES et al., 2003; BUZALAF et al., 2004; BUZALAF et al., 2005).

O fluoreto é utilizado como inibidor clássico de diferentes enzimas e, segundo Lau e Baylink (1998), possui diversas propriedades relevantes no seu mecanismo molecular de ação:

- 1) em células ósseas, tem ação mitogênica em concentrações micromolares;
- 2) *in vivo*, o efeito anabólico do fluoreto é específico de tecidos mineralizados, e a atividade mitogênica *in vitro* também é específica das células ósseas;
- 3) parece necessitar de um fator de crescimento como o fator de crescimento de transformação β (TGF- β) para a atividade mitogênica;
- 4) a atividade mitogênica é sensível às alterações da concentração de fosfato no meio;
- 5) age preferencialmente em células progenitoras que sintetizam fatores de crescimento de forma abundante, ao invés de estimular a proliferação de osteoblastos maduros e, finalmente,
- 6) a atividade mitogênica envolve o aumento da fosforilação da tirosina de diversas proteínas de sinalização celular, inclusive as MAPK (proteínas quinase ativadas por mitógenos). □O fluoreto é um agente anabólico capaz de substituir a hidroxila dos cristais de hidroxiapatita e assim modificar a estrutura cristalina do tecido ósseo (Posner, 1996), estimula a formação óssea (CHARLES et al., 1985; ERIKSEN et al., 1985; KHOKHER, DANDONA, 1990; KASSEM et al., 1994) promovendo um balanço positivo a cada ciclo de remodelamento (ERIKSEN et al., 1985), aumento no volume de osso trabecular (BRIANCON, MEUNIER, 1981; ERIKSEN et al., 1985) e a conectividade trabecular (VESTERBY et al.,

1991), aumento da densidade do osso espinhal (RIGGS et al., 1980), além do balanço positivo de cálcio em pacientes com osteoporose (CHARLES et al., 1985). Desta forma, o fluoreto é capaz de estimular a atividade de osteoblastos pela indução do desacoplamento entre reabsorção e formação óssea para o favorecimento da formação e, conseqüentemente, a um aumento no volume ósseo (MERZ, 1981; LAU, BAYLINK, 1998; CAVERZASIO et al., 1998).

Farley e col. (1983) forneceram as primeiras evidências da ação direta e dupla do fluoreto em cultura de células ósseas, demonstrando que, nas culturas de calvária de pintos, o fluoreto foi capaz de aumentar a proliferação e a atividade da FAL quando em concentrações micromolares (cerca de 10 μ M, similar aos níveis encontrados no soro de pacientes submetidos ao tratamento com fluoreto, cujos limites encontram-se entre 5-30 μ M), além de aumentar a mineralização dessas células.

Resultados semelhantes foram observados em outras espécies, confirmando o efeito mitogênico do fluoreto em linhagem de osteosarcoma (REED et al., 1993), humanos (WERGEDAL et al., 1988; KHOKHER, DANDONA, 1990; KASSEM et al., 1993) e ratos (MODROWISK et al., 1992; BELLOWS et al., 1993; QU et al., 2008).

Existem evidências substanciais associando as MMPs e o tratamento com fluoreto. Os osteoblastos de rato tratados com fluoreto *in vitro* apresentaram uma redução na expressão proteica de MMP-1, com aumento em MMP-3 e 9 (WADDINGTON, LANGLEY, 2003) e aumento na expressão gênica de MMP-2 e 14 (MANDUCA et al., 2005). A ampla presença de substratos de MMP e sua presença ubíqua durante a remodelação do tecido enfatizam o impacto dessas

endopeptidases durante a mineralização. Recentemente foi demonstrado que o fluoreto de sódio em concentrações de 200 e 275 ppm foi capaz de inibir totalmente a atividade de MMPs 2 e -9, sendo que na concentração de 5000 ppm esta inibição foi irreversível (KATO et al., 2014). Estes achados podem ter implicação no processo de formação/reabsorção óssea.

Em relação à diferenciação celular, o tratamento com o fluoreto foi capaz de alterar a mineralização óssea, aumentando a atividade da FAL em osteoblastos de humanos (KASSEM et al., 1994; KHOKHER, DANDONA, 1990) e ratos (PALERMO et al., 1999; MANDUCA et al., 2005). Possui efeito estimulatório na produção de osteocalcina em células humanas derivadas do estroma (KASSEM et al., 1994), em osteoblastos obtidos a partir de fragmentos da tíbia de rato (MANDUCA et al., 2005), provocando alteração pós-traducional do agrupamento de cadeias glicosaminoglicanas em células da medula de ratos (WADDINGTON, LANGLEY, 1998), alterando as características das proteoglicanas de osteoblastos em embriões de galinha (RODRIGUEZ, ROSSELOT, 2001), assim como a expressão gênica de biglicana e integrinas (MANDUCA et al., 2005).

Entretanto, é relevante destacar também que há controvérsias a respeito da eficiência do fluoreto na redução de risco de fraturas (RIGGS et al., 1994; KLEEROKOPER et al., 1991), podendo causar outros efeitos colaterais como desordens gastrintestinais e dores nas extremidades (HAGUENAUER et al., 2000; SCHNITZLER, SOLOMON, 1985).

Em um estudo conduzido por RAFFI e colaboradores (1997), foi verificado aumento da espessura do osso cortical, assim como também de sua porosidade, na presença do fluoreto. Dados histomorfométricos mostraram que o fluoreto aumenta o volume de osso trabecular através do aumento do número de osteoblastos (FARLEY

et al., 1983; LAU, BAYLINK, 1998; DURE-SMITH, 1991; CHAE et al., 1999).

A espessura das trabéculas do osso medular também aumentou com o tratamento com fluoreto. Porém, em doses altas ou muito prolongadas, foi verificada uma redução da espessura trabecular, decorrente da ação tóxica do fluoreto nos osteoblastos (BOIVIN et al., 1987; DAIJEI, 1984; KRISHNAMACHARI, 1986), em humanos, e em bovinos (COUTELIER et al., 1978), encontrando-se lesões de osteomalácia e osteoporose em consequência da ingestão de altas doses de fluoreto durante um longo período de tempo. Essa osteoporose seria consequência de intoxicações graves que causariam osteonecrose e lesões nos osteoblastos (KROOK, MAYLIN, 1979). Um estudo descrito por Hallanger Johnson et al. (2007), em humanos, obteve resultados parecidos em pacientes que apresentavam osteomalácia e outras desordens ósseas (esclerose óssea) associadas à ingestão crônica de fluoreto em bebidas como chá. No entanto, outros autores evidenciaram osteoporose sem osteonecrose, provavelmente em consequência de uma lesão sobre os osteoblastos, mais grave que a lesão sobre os osteócitos (RIET-CORREA et al., 1983).

Em 2007, Vestergaard e colaboradores, em um estudo de meta-análise, concluíram que os protocolos de uso do fluoreto na forma de monofluorofosfato têm aumentado substancialmente a densidade mineral óssea. No entanto, a dose a ser utilizada deveria ser mais estudada para evitar efeitos tóxicos e inibitórios ao processo de mineralização.

Segundo QU e colaboradores (2008), doses de 10^{-8} a 10^{-5} M de NaF podem estimular os processos de proliferação e atividade da fosfatase alcalina de osteoblastos caprinos. Entretanto, doses de 10^{-4} a 10^{-3} M de NaF promovem diminuição da atividade de fosfatase alcalina, proliferação celular e habilidade de

mineralização, ao passo que aumenta a taxa de apoptose celular.

Oruc (2008) descreveu vários trabalhos relacionando a alta concentração de fluoreto na água local (rios e fontes de água da região) com problemas de crescimento e desenvolvimento ósseo de humanos e animais de criação como cabras e vacas, além da fluorose dentária.

Segundo Kragstrup e colaboradores (1984), as alterações ósseas induzidas pelo fluoreto não são decorrentes da ação deste em apenas um tipo celular ósseo. Os autores sugerem que o fluoreto afeta todas as células envolvidas, direta ou indiretamente, no mecanismo de remodelação óssea. Lagier (1978) e Boivin et al. (1987) consideram que a fluorose esquelética está associada com um aumento das superfícies de remodelação; porém, ocorre um desequilíbrio em favor da formação óssea, com frequentes defeitos de mineralização, devidos provavelmente ao duplo efeito sobre os osteoblastos, que causa um aumento no número de osteoblastos, mas também ocasiona um efeito tóxico sobre essa célula.

Fica evidente que o fluoreto, além de sua interação com a hidroxiapatita, também possui um efeito sobre as células do tecido ósseo, causando estímulos e alterações na morfologia e no metabolismo das células (MOHR, 1990; CHENG et al., 2005; QU, WEI, 2006; COOPER et al., 2006; WANG et al., 2007). No entanto, o mecanismo de efeito do fluoreto no tecido ósseo e seus principais alvos não foram esclarecidos (KEBSCH et al., 2007; WANG et al., 2007). Recentemente, Sharma e colaboradores (2008) demonstraram o estresse no retículo endoplasmático de ameloblastos e nos processos de síntese e secreção de proteínas provocada pelo fluoreto. Esses autores mostraram que camundongos com ingestão crônica de fluoreto (água de beber) em doses acima de 50 ppm têm uma proteína, fator-2 de eIF2 (iniciação eucariótica subunidade alfa) fosforilada, alterada em seus

ameloblastos. Essa fosforilação, aumentada nos ameloblastos dos animais tratados com altas doses de fluoreto, tem como última consequência a diminuição de produção de proteínas pelo retículo endoplasmático.

Mousny e colaboradores (2008) relacionaram os efeitos do fluoreto nos processos de formação óssea e mineralização, com fatores genéticos. Os pesquisadores submeteram diferentes espécies de camundongos A/J, SWR/J e 129P3/J a doses de 0 ppm, 25 ppm, 50 ppm, e 100 ppm de fluoreto. Esses animais foram inicialmente classificados em diferentes grupos de suscetibilidade ao fluoreto devido a um trabalho pioneiro de Everett e colaboradores (2002) sobre suscetibilidade a fluorose dental. Ao final do trabalho, Mousny e colaboradores (2008) demonstraram que essas espécies também apresentavam diferentes respostas nos tecidos ósseos aos efeitos do flúor. Yan et al. (2007) demonstraram que o fluoreto pode interferir diretamente no processo de osteoclastogênese, aumentando o número de unidades formadoras de colônias (monócitos / macrófagos).

A literatura sobre a influência do fluoreto na homeostasia óssea é incisiva em concluir que esse elemento interfere diretamente na modulação da atividade de células ósseas (HARINARAYAN et al., 2006). No entanto, esses resultados ainda são controversos e poucos são aqueles capazes de dar detalhes mais sólidos sobre os mecanismos moleculares modificados ou atingidos pelo fluoreto. Outro detalhe que ainda merece destaque é a faixa de concentração adequada e segura para conseguir os efeitos positivos desse elemento. Desse modo, a descoberta de quais proteínas e fenômenos são alterados no reparo ósseo, após a ingestão crônica de fluoreto, poderia contribuir sobremaneira para o entendimento do reparo ósseo modulado pelo fluoreto.

Em síntese, o F age como um elemento cumulativo envolvido na formação e absorção do tecido ósseo, bem como na homeostasia do metabolismo ósseo mineral (BOIVIN et al., 1989; BOIVIN et al., 1990; FRATZL et al., 1994; TURNER et al., 1997; MIAO et al., 2002). Em baixas doses, o F aumenta a massa óssea através das interações físicoquímicas (CHACHRA et al., 1999; GRYNPSAS, 1990) e da estimulação da proliferação de osteoblastos *in vitro* (FARLEY et al., 1983) e *in vivo* (TUMER et al., 1997; MARIE et al., 1992; MODROWSKI et al., 1992). Um aumento na BMD (densidade mineral óssea) tem sido relatado em populações consumindo água fluoretada a 1 ppm (LI et al., 2001), com uma redução no risco de fratura (LEHMANN et al., 1998). Entretanto, uma concentração na água de beber maior que 4,32 ppm F aumenta o risco de fratura (LI et al., 2001). Estudos utilizando altos níveis de sais fluoretados (> 50 mgF/dia) têm encontrado resultados não conclusivos na prevenção de fraturas (RIGGS et al., 1990; MEUNIER et al., 1998). Entretanto, baixas doses (11-20 mgF/dia) parecem diminuir o risco de fratura nas vértebras e aumentar a BMD na espinha dorsal, lombar e fêmur (REGINSTER et al., 1998; RINGE et al., 1999). O excesso de F promoveria um aumento dos cristais e o osso poderia se tornar mais frágil, enquanto que baixas doses de F na água e suplementos poderiam ser benéficos para o osso.

Em baixas doses, o F pode levar ao aumento na massa óssea e tem sido investigado como um agente terapêutico em mulheres para o tratamento de osteoporose pós-menopausa (BRINCON & MEUNIER, 1981; De LA SOTA et al., 1997). Um tratamento apropriado de F (baixas doses de 50 mg por dia durante 1 ano, seguidas por um período de 2 meses sem o F) parece reduzir fratura no osso espinhal em mulheres que apresentaram pelo menos uma fratura prévia (RUBIN et al., 2001). O tratamento também tem sido utilizado como uma forma de explorar o

efeito de alterações ultraestruturais nas propriedades mecânicas do osso. O F pode não somente estimular a formação óssea, mas também prolongar o período de mineralização. Turner et al. (TURNER et al., 1996) relataram que quando altas doses de F foram administradas a ratos na água de beber, os animais desenvolveram osteomalácia (aumento de 20 vezes no volume de osteóide na vértebra). Evidências também indicam que o F produz mineral ósseo com propriedades materiais mais frágeis do que o mineral normal. Por exemplo, o tratamento tanto de ratos quanto de coelhos com F (com uma dose que não afeta a mineralização) demonstrou diminuição na resistência óssea, apesar do aumento na massa óssea e na fração do volume de osso (SOGAARD et al., 1995).

Embora esses trabalhos e outros conduzidos pelo nosso laboratório, demonstrem o potencial promissor do F na diferenciação osteogênica das CTM, pouco se conhece sobre o seu papel como estimuladores e/ou catalisadores da osteogênese, quando em associação com a HA, na forma de arcabouço. Assim, sabendo da interação da apatita biológica com outros íons, como o Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Cl^- , F^- , HPO_4^{2-} (TADIC et al., 2002), iremos inicialmente caracterizar e depois avaliar a liberação de fluoreto de uma hidroxiapatita bifásica (70% HA + 30% β -TCP), com adsorção de F. A razão de escolha deste material se deve ao conhecido papel osteocondutor da HA, aliado à disponibilidade de F para o meio, o que se espera aumentar a formação e a mineralização óssea, o que será avaliado em estudos futuros.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho é realizar a caracterização físico-química, bem como avaliar a capacidade de adsorção e liberação de fluoreto de uma HA bifásica (70% HA + 30% β -TCP) porosa.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E METODOS

4.1 HA-TCP

Foi utilizado a cerâmica de fosfato de cálcio composta por Hidroxiapatita e β -Trifosfato de Cálcio na proporção aproximada de 70:30%, com porosidade de 20-30% (material em desenvolvimento a ser denominado Enxerto Ósseo Cerâmico Bifásico, modelo: GenPhos XP - Baumer SA, Mogi Mirim, São Paulo, Brasil). A este material, foi adsorvido fluoreto, como descrito a seguir.

4.2 ADSORÇÃO DE FLUORETO À HA BIFÁSICA

À HA bifásica foi feita adsorção de fluoreto. Para tanto, soluções com diferentes concentrações de fluoreto (1,25 a 2000 ppm), na forma de NaF (Merck, Darmstadt, Alemanha) preparadas em água ultrapura (Purelab Option-Q, Lane End, Reino Unido), foram adicionadas à HA bifásica na proporção de 10 g de HA por 50 mL de solução contendo fluoreto.

No primeiro teste de adsorção, soluções de NaF (100, 250, 500, 1000 e 2000 ppm fluoreto) foram adicionadas à HA bifásica por 3, 6, 18 ou 24 h e mantido em temperatura ambiente, sob agitação constante. Após estes intervalos de tempo, removeu-se o sobrenadante e colocou-se o restante na estufa a 40°C, até a completa secagem dos grânulos de HA com fluoreto adsorvido. Os mesmos foram armazenados para posterior quantificação de fluoreto adsorvido.

No segundo teste de adsorção, as soluções contendo fluoreto (0,625, 1,25, 2,5, 5,0, 10,0 20,0, 40,0 e 80 ppm fluoreto) foram adicionadas à HA bifásica por 24 e

48 h e mantidas em temperatura ambiente, sob agitação constante. Após estes intervalos de tempo, procedeu-se como anteriormente descrito para obtenção dos grânulos de HA com fluoreto adsorvido, para posterior quantificação do fluoreto.

4.3 QUANTIFICAÇÃO DE FLUORETO ADSORVIDO À HA BIFÁSICA

A quantificação do fluoreto adsorvido à hidroxiapatita bifásica foi feita com o eletrodo íon específico, após difusão por hexatetildisoloxano (HMDS), utilizando o método de TAVES (1968), modificado por WHITFORD (1996). Para tanto, 0,3 g de pó de hidroxiapatita com fluoreto adsorvido foram colocados na base da placa de Petri, juntamente com 2,0 mL de água deionizada. Para a difusão, 50 μ L de NaOH 0,05 M foram distribuídos em 3 gotas na tampa destas placas. As placas foram fechadas, seladas com vaselina, e por um orifício, previamente feito na tampa, foi colocado HMDS (Aldrich, 2,0 mL em ácido sulfúrico 3M). Este orifício foi imediatamente selado com vaselina e parafilme. As placas foram colocadas numa mesa agitadora orbital plana (Nova Técnica, modelo NT 145) em velocidade 2-3, durante a noite. No dia seguinte as tampas foram removidas, invertidas e as gotas de NaOH combinadas numa única gota. O NaOH foi tamponado pela adição de 25 μ L de ácido acético 0,2 M, e o volume total foi ajustado para 75 μ L com água deionizada, usando uma pipeta automática Gilson (10-100 μ L). A gota, contendo todo o fluoreto, foi então analisada com eletrodo Orion 9409 e um micro eletrodo de referência calomelano (Accumet, número de catalogo #13-620-79), ambos acoplados ao potenciômetro Orion EA 940, sendo estes mantidos unidos através de bandas de borracha durante a leitura, e colocados em contato com a gota na parte interna da tampa da placa. Foram utilizados padrões com quantidade conhecida de

fluoreto (0,095 a 15,2 µg), difundidos em triplicata concomitantemente às amostras. Apenas curvas padrão com coeficiente de correlação $> 0,99$ foram aceitas. Todas as leituras foram feitas em duplicata. A repetibilidade das leituras em duplicata foi sempre superior a 95%.

Após a quantificação, foi feito o cálculo da porcentagem de F presente nas soluções de incubação que foi adsorvido à HA. Para tal, considerou-se a quantidade total de fluoreto presente em cada solução como 100%. Por exemplo, para a solução contendo 2000 ppm de fluoreto, a quantidade total deste íon presente em 50 mL de solução foi de 100 mg, que foi considerada como 100%. A quantidade total de fluoreto adsorvida em 10 mg de HA foi calculada com base nas concentrações obtidas em ppm, após a análise de fluoreto.

4.4 LIBERAÇÃO DE FLUORETO EM MEIO DE CULTURA

Para a avaliação da liberação de F da HA adsorvida, as diferentes amostras de HA com fluoreto adsorvido foram incubadas à temperatura ambiente com meio de cultura α -MEM (*minimum essential medium*), ausente de F, utilizado na cultura de células osteoblásticas (Cat. n° 12000-014, Invitrogen Co, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA). O meio é constituído por aminoácidos, vitaminas, sais inorgânicos e outros componentes, como dextrose, ácido lipoico, vermelho fenol e piruvato de sódio (SIMONSEN & LEVISON, 1993). Foi utilizada a proporção de 10 g de HA por 50 mL de meio, sob agitação. Após 3, 6, e 24 h, as amostras foram removidas da agitação, e mantidas sem manipulação por alguns instantes para permitir a decantação dos grânulos de HA. A seguir, os sobrenadantes foram coletados e mantidos a -20°C para a posterior quantificação de fluoreto.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE FLUORETO LIBERADO EM MEIO DE CULTURA A PARTIR DA HA BIFÁSICA COM FLUORETO ADSORVIDO

Foi realizada conforme descrito anteriormente (item 4.3), empregando-se 0,5 mL de meio de cultura. As quantidades de fluoreto empregadas na realização da curva-padrão variaram entre 0,00475 e 0,95 µg.

4.6. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA HA BIFÁSICA COM FLUORETO ADSORVIDO

Os ensaios a serem relatados foram realizados no Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais (CCDM) e Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (UNICAMP) e no Laboratório da Universidade de Bauru (FOB).

Para a caracterização das amostras de HA bifásica e HA bifásica com fluoreto adsorvido foram utilizadas as técnicas de difração de Raios-x (DRX), análise por infravermelho (FT-IR) e conteúdo de cálcio e fósforo.

4.6.1 DIFRAÇÃO DE RX

Essa técnica é constituída pelo processo de interferência construtiva causada pela incidência de um feixe de raios-X em direção a um material com estrutura atômica periodicamente arranjada. Essa interferência construtiva ocorre apenas nas direções de empalhamento dos feixes que satisfazem a Lei de Bragg, quando o espalhamento e a radiação incidente possuem o mesmo comprimento de onda.

A técnica utilizada foi o método de pó da Difractometria de Raios-X Utilizando

um Difratômetro de Raios-X de marca Philips - modelo X'Pert. A amostra foi macerada em almofariz e separada em peneira de 100 mesh. A porção retida na peneira foi desprezada e foi utilizada para análise a porção passante na referida peneira. A amostra então foi seca durante 24h em estufa a 110°C. Após esse período, foi mantida em dessecador durante aproximadamente 1 h e acondicionada em porta-amostra específico do equipamento analítico.

A identificação da fase (estrutura cristalina) presente na amostra em questão foi realizada por comparação entre a lista de picos obtida para a amostra X.150509 e a ficha PDF n° 09-0432 obtida no software X'Pert HighScore, a qual indica a fase correspondente à HA.

O método empregado foi do padrão externo, no qual uma curva analítica foi traçada a partir de misturas com concentrações conhecidas (% em peso) de HA em alumina. Foram utilizadas para a análise de difração 40 kV de tensão, 40 mA de corrente e radiação de $\text{CuK}\alpha_1=1,54056 \text{ \AA}$. A faixa de varredura empregada foi de 2 theta variando de 20° até 70°, tamanho de passo de 0,02° e tempo de passo de 3 s. As condições ambientais do laboratório eram $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

4.6.2 ESPECTROSCOPIA NO INFRA-VERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURRIER

Esta técnica consiste em incidir radiação eletromagnética correspondente à faixa do infravermelho ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$) na amostra polimérica. A energia associada a estes comprimentos de onda, uma vez absorvida pela molécula, converte-se em energia de rotação-vibração molecular. Este fenômeno de absorção é extremamente quantizado e altamente dependente dos grupamentos químicos que

estão presentes na amostra. Portanto, análise e interpretação de um espectro no infravermelho obtido para um polímero mostram os grupamentos químicos presentes em sua estrutura e conseqüentemente sua estrutura.

Neste trabalho foi utilizado um espectrofotômetro Nexus 4700 FTIR da Thermo Nicolet. Os espectros foram obtidos com 32 repetições, leitura de 4000 a 400 cm^{-1} , e resolução igual a 4 cm^{-1} . A amostra foi depositada sobre brometo de potássio (KBr) para a realização da análise.

4.6.3 RELAÇÃO CÁCIO-FOSFORO

A composição química da HA bifásica sem adsorção de flúor foi determinada nos estudos de caracterização físico-químicas através do método de ICP (Inductively Coupled Plasma), conforme descrito nos seguintes padrões:

- American Society for Testing and Materials (ASTM) F 1185- 03, "Standard Specification for Composition of Ceramic Hydroxylapatite for Surgical Implants," 2003.
- American Society for Testing and Materials (ASTM) F1088 - 04ae1 "Standard Specification for Beta-Tricalcium Phosphate for Surgical Implantation," 2004.

Os resultados obtidos pertencente à REBLAS, indicando que A bifásica sem adsorção de flúor atende os requisitos das normas aplicáveis.

Na monitoração das características físico-químicas são encontrados os seguintes grupos de componentes (nas faixas aproximadas: Relação Ca:P = 1,67 a 1,7 e pH = 6,0-8,0. Metais pesados: As =< 3ppm ; Cu = <3ppm ; Cd = <5ppm; Cr = <3ppm ; Hg = <3ppm ; Pb = <30ppm.

4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A HA foi fixada com esmalte para unha (Colorama Ltda, São Paulo, SP, Brasil) em uma base metálica cilíndrica, com dimensões de 10 mm de altura e 9 mm de diâmetro e levados ao aparelho metalizador (Aparelho Desk IV - Denton Vacuum, Moorestown, EUA), onde, em uma câmara a vácuo, as amostras são superficialmente pulverizadas com o metal nobre.

A análise foi realizada no microscópio eletrônico de varredura (JSM-T220A, Jeol, Japão), pertencente à Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/ USP, obtendo-se imagens e fotografias da HA, operando com 10 ou 15 kV e aumento de 1000 e 1500 vezes.

As fotomicrografias obtidas foram digitalizadas e transferidas a um computador, onde as imagens foram submetidas à análise com o auxílio dos softwares AutoCAD 2007 (Autodesk Inc, EUA) e ImageTool (UTHSCSA, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho é pioneiro em realizar adsorção de fluoreto a uma hidroxiapatita bifásica, material em desenvolvimento que apresenta uma porosidade maior que o material comercialmente disponível (GenPhos, Baumer AS, Mogi Mirim, Brasil). A porosidade aumentada facilita a remodelação óssea e a tentativa de se adsorver o fluoreto a este material veio da capacidade que este íon tem em interferir positivamente no processo de neoformação óssea, quando presente em concentrações adequadas. Tem sido relatado que doses de 10^{-8} a 10^{-5} M de NaF podem estimular os processos de proliferação e atividade da fosfatase alcalina, enquanto que doses mais altas, da ordem de 10^{-4} a 10^{-3} M de NaF promovem diminuição da atividade de fosfatase alcalina, proliferação celular e habilidade de mineralização, ao passo que aumentam a taxa de apoptose celular (QU et al., 2008). Em adição, a dose preconizada de fluoreto para tratamento da osteoporose é entre 5 e 12,5 μ M (FARLEY et al., 1990). Assim, as concentrações de fluoreto adicionadas à HA bifásica no presente trabalho visavam a levar a uma liberação de fluoreto em meio de cultura da ordem de 10^{-5} M.

Uma vez que este é o primeiro trabalho a realizar a adsorção de fluoreto à HA bifásica, não se conheciam as concentrações de fluoreto a serem empregadas, de forma a promover uma adsorção tal que gerasse liberação em meio de cultura na ordem de 10^{-5} M. Então, os testes de adsorção foram feitos em 2 etapas. Na primeira etapa utilizaram-se concentrações mais altas de fluoreto para adsorção (100 a 2000 ppm ou mg/L). Os resultados da concentração de fluoreto adsorvido são mostrados na Figura 1. Foi observada uma relação dose-resposta entre a concentração de fluoreto que se adsorveu à HA e concentração de fluoreto presente

nas soluções em que a HA foi incubada. O tempo de incubação nas soluções fluoretadas não alterou a concentração de fluoreto adsorvido. Observou-se que a porcentagem de adsorção de fluoreto variou muito pouco (entre 15 e 25%) mesmo diante das diferentes concentrações de fluoreto nas soluções e tempos de incubação (Figura 2). Então, pensou-se que a capacidade de adsorção da quantidade utilizada de HA (10 g) era pequena, frente à concentração de fluoreto das soluções. Por isto, decidiu-se, no próximo experimento, utilizar concentrações menores de fluoreto nas soluções de incubação.

Figura 1. Concentração de fluoreto adsorvido à HA bifásica em função da incubação em soluções contendo diferentes concentrações de fluoreto (na forma de NaF) por 3, 6, 12 ou 24 h.

Figura 2. Porcentagem de adsorção de fluoreto à HA bifásica em função da incubação em soluções contendo diferentes concentrações de fluoreto (na forma de NaF) por 3, 6, 12 ou 24 h.

No experimento de adsorção subsequente, utilizaram-se soluções contendo entre 0,625 e 80 ppm de fluoreto. No primeiro experimento, a adsorção não variou no intervalo de tempo entre 3 e 24 horas. Entretanto, como as concentrações de fluoreto a serem utilizadas eram bem menores, optou-se pelo maior tempo de incubação. Assim, no experimento seguinte, a HA foi incubada em soluções contendo entre 0,625 e 80 ppm de fluoreto, por 24 e 48 h (Figura 3). Como para o primeiro experimento, foi observada uma relação dose-resposta entre a concentração de fluoreto que se adsorveu à HA e a concentração de fluoreto presente nas soluções em que a HA foi incubada. Entretanto, no período de 48 h de incubação, para algumas concentrações de fluoreto, houve uma redução na adsorção. Quanto à porcentagem de adsorção (Figura 4), para as soluções contendo entre 2,5 e 80 ppm, a mesma foi similar àquela observada no experimento

anterior. Entretanto, para as menores concentrações de fluoreto (0,625 e 1,25 ppm), as porcentagens foram maiores, chegando a aproximadamente 35%. Decidiu-se então que os experimentos de liberação de fluoreto no meio de cultura seriam conduzidos com as amostras provenientes deste segundo experimento, uma vez que, no primeiro, as porcentagens de adsorção foram constantes, independentemente da concentração de fluoreto presente na solução. Deve ser ressaltado que não foi possível utilizar um número amostral maior nestes experimentos, que permitisse a realização de análise estatística, devido à pequena quantidade de biomaterial que foi cedida pelo fabricante.

Figura 3. Concentração de fluoreto adsorvido à HA bifásica em função da incubação em soluções contendo diferentes concentrações de fluoreto (na forma de NaF) por 24 ou 48 h.

Figura 4. Porcentagem de adsorção de fluoreto à HA bifásica em função da incubação em soluções contendo diferentes concentrações de fluoreto (na forma de NaF) por 24 ou 48 h.

A Figura 5 mostra a concentração de fluoreto liberada nos meios de cultura, a partir das HAs que tinham sido incubadas com soluções fluoretadas contendo entre 0,625 e 80 ppm de fluoreto 10^{-5} M. Houve uma redução na concentração de fluoreto liberada, em função da redução da concentração de fluoreto na solução de incubação da HA. O *design* experimental deste trabalho foi conduzido de forma a se buscar um material que liberasse concentrações de fluoreto para o meio na ordem de 10^{-5} M, já que a dose preconizada de fluoreto para tratamento da osteoporose é entre 5 e 12,5 μ M (FARLEY et al., 1990). Em adição, doses entre 10^{-8} e 10^{-5} M de NaF podem estimular os processos de proliferação e atividade da fosfatase alcalina, enquanto que doses mais altas, da ordem de 10^{-4} a 10^{-3} M, promovem diminuição da atividade de fosfatase alcalina, proliferação celular e habilidade de mineralização, além de aumentarem a taxa de apoptose celular (QU et al., 2008). Apenas para a

HA incubada em 80 ppm de fluoreto, a concentração de fluoreto liberada para o meio de cultura foi da ordem de 10^{-5} M. Outro achado interessante foi que, para a maioria das concentrações de NaF na solução, houve uma diminuição da liberação de fluoreto para o meio de cultura nos tempos maiores. Uma possível hipótese para isto seria a complexação do fluoreto liberado, ao longo do tempo, com os componentes do meio de cultura, que contém aminoácidos, vitaminas, sais inorgânicos e outros componentes, como dextrose, ácido lipoico, vermelho fenol e piruvato de sódio (SIMONSEN & LEVISON, 1983). Entretanto, esta hipótese é pouco provável, pois o método analítico utilizado emprega um ácido forte (ácido sulfúrico 3M), que fica em contato com as amostras *overnight*, sendo capaz de descomplexar todo o fluoreto (TAVES, 1968; WHITFORD, 1996). A hipótese mais provável para explicar esta diminuição seria uma readsorção deste fluoreto à superfície da HA ao longo do tempo. As implicações desta readsorção numa situação clínica, entretanto, não parecem ser importantes, uma vez que no organismo há uma constante circulação de fluidos. Em virtude dos resultados satisfatórios de liberação de fluoreto obtidos para a HA incubada com solução contendo 80 ppm de fluoreto, este material foi selecionado para a avaliação físico-química.

Figura 5. Concentração de fluoreto liberada em meio de cultura a partir de HA previamente incubada com soluções contendo diferentes concentrações de fluoreto. A liberação foi avaliada nos tempos de 3, 6 e 24 h.

Quanto aos resultados da DRX, a tabela 1 apresenta o resultado da análise qualitativa de fases para a HA com adsorvido, a presença de hidroxiapatita e whitelockite. Já a tabela 2 apresenta o resultado da análise quantitativa pelo método de Rietveld da fase identificada pela técnica de Difração de Raios-X, observando-se 73,07% de hidroxiapatita e 26,93% de whitelockite.

Tabela 1. Análise qualitativa de fases de hidroxiapatita bifásica com fluoreto adsorvido.

Amostra	Fases	Fórmula Química	Estruturas
	Hidroxiapatita	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Hexagonal
	Whitlockite	$\text{Ca}_{9,5}\text{Mg}_{0,5}(\text{PO}_4)_7$	Trigonal

Tabela 2. Valores obtidos das quantificações de fases (%) para a HA com fluoreto adsorvido.

Amostra	Hidroxiapatita Hexagonal	Whitlockite Trigonal
	73,07	26,93

Em seguida, são apresentados os difratogramas das amostras com e sem fluoreto adsorvido (Figuras 6 e 7, respectivamente), com seus respectivos refinamentos realizados pelo método de Rietveld. Os difratogramas para ambos os materiais são semelhantes, podendo ser observada a natureza bifásica dos produtos, identificando-se as fases de HA e β -TCP. Na figura 7 pode-se observar o pico que caracteriza a HA (2 theta 32) e da β -TCP (2 theta 7,5).

A tabela 3 mostra os resultados comparativos entre ambos os materiais. Para a HA bifásica sem adsorção de fluoreto, foram observados picos característicos de HA (31,818), em concentração de 70%, enquanto que para a HA com fluoreto adsorvido, a concentração de HÁ foi de 73%, como revelado na Tabela 2.

Tabela 3. Análise comparativa dos testes de DRX para as amostras de HA bifásica com e sem fluoreto adsorvido.

Amostra	ESTUDO	LAUDO	RESULTADO
Enxerto Ósseo Cerâmico Bifásico (Modelo: GenPhos XP)	DRX – qualitativa e quantitativa	Unicamp R:035/09	Picos característicos HA (31,818) em Concentração de 70%. Amostra com micro e macro poros elementos
Enxerto Ósseo Cerâmico Bifásico (Modelo: GenPhos XP) + Flúor.	DRX – qualitativa e quantitativa	e-Diffraction Pharma, R:127/2013	Picos característicos HA em concentração de 73%. Amostra com micro e macro poros elementos:

Figura 6. Difratograma DRX obtido para a amostra de HA bifásica com fluoreto adsorvido.

Figura 7. Difratograma DRX obtido para a amostra de HA bifásica sem fluoreto adsorvido

Os resultados observados na Espectroscopia no Infravermelho (FTIR) do enxerto ósseo cerâmico bifásico apresentam bandas de absorções Grupo OH observadas em 3.572 cm^{-1} e em 631 cm^{-1} . Verifica-se também em 1.088 (9) cm^{-1} , 1046 (7) cm^{-1} , 631 cm^{-1} , 601 cm^{-1} e 571 cm^{-1} bandas características do grupo fosfato, isto tanto para a HA sem adsorção como na HA com adsorção de fluoreto. A tabela 4 mostra as principais bandas de absorção na região do infravermelho observadas nas amostras e suas respectivas atribuições.

Tabela 4. Descrição das principais bandas apresentadas no espectro das amostras de HA bifásica com e sem fluoreto adsorvido.

Bandas de absorção (cm^{-1}) HA bifásica sem fluoreto adsorvido	Bandas de absorção (cm^{-1}) HA bifásica com fluoreto adsorvido	Atribuições
3572	3573	grupo OH
3452	-	H ₂ O (estrutural ou adsorvida)
1088	1089	grupo fosfato
1046	1047	grupo fosfato
631	631	grupo OH
601	601	grupo fosfato
571	571	grupo fosfato

As cerâmicas bifásicas HA/TCP porosas com e sem fluoreto apresentaram superfície irregular com várias concavidades e fendas, além de macro e microporos de diferentes diâmetros, observar-se uma régua na parte inferior da figura medindo 10μ para facilitar a visualização dos diversos diâmetros como podem ser vistos nas Figuras 8 e 9. As partículas mostravam-se íntegras e praticamente ausentes de fragmentos em sua superfície.

Os dados de caracterização físico química da HA bifásica com fluoreto adsorvido revelaram bastante semelhança com o mesmo material sem fluoreto adsorvido. Portanto, a adsorção de fluoreto à HA bifásica não alterou suas propriedades físico-químicas. Isto é importante, pois estudos prévios revelaram que a HA bifásica porosa original é biocompatível (TAGA, R. – comunicação pessoal)

Figura 8. Eletromicrografia da cerâmica bifásica HA/TCP porosa com adsorção de fluoreto com aumentos de 1000x e 1500x .

Figura 9. Eletromicrografia da cerâmica bifásica HA/TCP porosa sem adsorção de fluoreto com aumentos de 1000x e 1500x .

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho foi pioneiro em propor a modificação de um biomaterial osteocondutor em desenvolvimento (HA bifásica porosa) pela adsorção ao mesmo de fluoreto, o qual, ao ser liberado para o meio, acrescentaria propriedades osteoindutoras ao material. O presente estudo pode ser considerado preliminar, por ter avaliado diferentes níveis de adsorção de fluoreto. Com base em testes de liberação deste elemento em meio de cultura osteogênico, observou-se que o material originado da incubação da HA bifásica porosa em solução contendo 80 ppm de fluoreto (como NaF) é capaz de liberar concentrações de fluoreto para o meio de cultura na ordem de 10^{-5} M. É sabido que estas concentrações são capazes de estimular os processos de proliferação osteoblástica e atividade da fosfatase alcalina (QU et al., 2008). Em adição, os testes de caracterização físico-química deste material com fluoreto adsorvido revelaram semelhança com o material original (sem fluoreto). Uma importante limitação do presente estudo foi o fato de os testes de liberação de fluoreto para o meio de cultura terem sido feitos apenas com uma amostra, devido à indisponibilidade de quantidades maiores do biomaterial, que ainda se encontra em fase de desenvolvimento. Assim, estudos futuros deveriam repetir estes testes com um número amostral adequado, que permita a realização de análise estatística. Se os resultados encontrados no presente estudo forem confirmados, trabalhos subsequentes deverão avaliar, *in vitro* (cultura de células) e *in vivo* (animais), o potencial osteogênico do material, o qual, se confirmado, permitirá o emprego do material na clínica.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

AUBIN, J. E.(2011). Regulation of osteoblast Formation and Function. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**. V.2; 81-94, 2011.

ALLORI A.C.; SAILON, A.M.; WARREN, S.M. Biological basis of bone formation, remodeling, and repair - part I: biochemical signaling molecules. *Tissue Eng Part B Rev*, v. 14, n. 3, p. 258-73, Sept. 2008.

AOBA, T; FEJERSKOV, O. Dental fluorosis: chemistry and biology. **Crit Ver Oral Biol Med**, v. 13, n. 2, p. 155-70, 2002.

BAHAR, H. *et al*. Molecular signaling in bone regeneration. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, v. 17, n. 2, p. 87-101, 2007.

BELLOWS, C.G.; AUBIN, J.E.; HEERSCHE, J.N.M. Differential effects of fluoride during initiation and progression of mineralization of osteoid nodules formed in vitro. **J Bone Miner Res**, v. 8, p. 1357-63, 1993.

BERTONI, E. *et al*. Nanocrystals of magnesium and fluoride substituted hydroxyapatite. **Journal of Inorganic Biochemistry**. 72, 29-35, 1998.

Bianco, P., M. Riminucci, *et al*. Bone sialoprotein (BSP) secretion and osteoblast differentiation: relationship to bromodeoxyuridine incorporation, alkaline phosphatase, and matrix deposition. **J Histochem Cytochem**, 41(2):183-91, 1993.

BIGI, A. *et al*. Magnesium influence on hydroxyapatite crystallization. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 49,69-X8 , 1993.

BLOCK, M.S., KENT, J. N. Sinus augmentation for dental implants: the use of autogenous bone . **J Oral Maxillofac Surg**; 55(11):1281-6, 1997.

BOIVIN, G. *et al*. Skeletal fluorosis: iliac bone histomorphometry and bone fluoride content. **J Bone and Mineral Res**, Abstract, 9th Annu Scient Meet Am Soc Bone and Mineral Res, v. 2, Suppl. I, 1987.

BOIVIN, G. *et al*. Skeletal fluorosis: histomorphometric analysis of bone changes and bone fluoride content in 29 patients. **J. Bone** 10:89-99, 1989.

* Conforme Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). NBR 6023, 2002.

BOIVIN, G., POWER, G. Winter condition and proximate composition of anadromous arctic charr (*Salvelinus alpinus*) in eastern Ungava Bay. **Canadian Journal of Zoology**. 68:2284-2289, 10:1139/z90-31, 1990.

BONASSAR, L. J., VACANTIL, C.A. Tissue Engineering: The First Decade and Beyond. **Journal of Cellular Biochemistry Supplements**, 30/31: 297-303,1998.

BOYNE, P.J.; JAMES, R.A. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. **J. Oral Surg.**, v.38, n.8, p.613-6, 1980.

BRIANCON, D.; MEUNIER, P.J. Treatment of osteoporosis with fluoride, calcium, and vitamin D. **Ortop Clin Nort Am**, v. 12, p. 629-48, 1981.

BUSER, D. 20 years of guided bone regeneration in implant dentistry. Ed.2. Berna: **Quintessence Publishing**. 262p., 2009.

BURG, K. J. L., PORTER, S., KELLAM, J. F. Biomaterial Developments for Bone Tissue Engineering. **Biomaterials**, 21, 2347-2359, 2000.

BUZALAF, M. A. R. et al. Bone surface and whole bone as biomarkers for acute fluoride exposure. **J Anal Toxicol**, v. 29, n. 8, p. 810-3, 2005.

BUZALAF, M. A. R. et al. Nail and bone surface as biomarkers for acute fluoride exposure in rats. **J Anal Toxicol**, v. 28, n. 4, p. 249-52, 2004.

BUZALAF, M. A. R., PESSAN, J. P., HONÓRIO, H. M., ten Cate JM. Mechanisms of action of fluoride for caries control. **Monogr Oral Sci**, v. 22, p. 97-114, 2011

BEZERRA DE MENEZES, L.M. et al. Bone as a biomarker of acute fluoride toxicity. **Forensic Sci Int**, v. 137, n. 3, p. 209-14, 2003.

CARVALHO, P.S.P.; BASSIA, A.P.F.; VIOLIN, L.A. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais. **Implant News**, v.1, n.3, p.256-261, 2004.

CAVERZASIO, J.; PALMER, G.; BONJOUR, J.P. Fluoride: mode of action. **J. Bone**, v. 6, n. 22, 585-9, 1998.

CASAGRANDE, L.; SILAVALAUXE, I.; FERNANDES, M. I. O Emprego da Engenharia Tecidual na Odontologia. **Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre**, v. 50, n. 1, p. 20-23, jan./abr., 2009.

Chachra, D., et al. The effect of fluoride treatment on bone mineral in rabbits". **Calcif Tissue Int**, 64(4):345-51, 1999.

CHAE, H.J. et al. Mechanism of mitogenic effect of fluoride on fetal rat osteoblastic cells: evidence for Shc, Grb2 and p-CREB-dependent pathways. **Res Commun Mol Pathol and Pharm**, v. 105, n. 3, p. 185-99, 1999

CHARLES, P.; MOSEKILDE, L.; JENSEN, F.T. The effects of sodium fluoride, calcium phosphate, and vitamin D2 for one to two years on calcium and phosphorus metabolism in postmenopausal women with spinal crush fractures osteoporosis. **J. Bone**, n. 6, p. 201-6, 1985.

CHENG, K. et al. In vitro behavior of osteoblast-like cells on fluoridated hydroxyapatite coatings. **Biomaterials**, v. 26, n. 32, p. 6288-95, 2005.

COOPER, L.F. et al. Fluoride modification effects on osteoblast behavior and bone formation at TiO₂ grit-blasted c. p. titanium endosseous implants. **Biomaterials**, v. 27, n. 6, p. 926-36, Feb. 2006.

COUTELIER, L.; NOEL, H.; MALDAGUE, B. Bone remodeling alterations induced by fluor poisoning in the bovine. **Abstract, Symposium CEMO**, p. 189-93, 1978.

DAIJEI, H. Further observations on radiological changes of endemic foodborne skeletal fluorosis. **J. Fluoride**, v. 17, n. 1, p. 9-14, 1984.

DEQUEKER, J.; DECLERCK, K. Fluor in the treatment of osteoporosis. An overview of thirty years clinical research. **Schweiz Med Wochenschr**, v. 123, n. 47, p. 2228-34, 1993

De LA SOTA, M., PUCHE, R. et al. Changes in bone mass and in glucose homeostasis in subjects with high spontaneous fluoride in take . **Medicina (B Aires)**, 57(4):417-20, 1997.

de LIMA, I.R., et al. Understanding the impact of divalent cation substitution on hydroxyapatite: an in vitro multiparametric study on biocompatibility. **J Biomed Mater Res** . 98A:351-8, 2011.

DUNIPACE, A.J. et al. Effect of aging on animal response to chronic fluoride exposure. **J Dent Res**, v. 74, n. 1, p. 358-68, 1995.

DURE-SMITH, B.A. et al. Fluoride therapy for osteoporosis: a review of dose response, duration of treatment, and skeletal sites of action. **Calcif Tissue Int**, v. 49, suppl, p. S64-7, 1991.

EILLIOT, J. C. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. **Stud. Inorg. Chem.**, 18, 389, 1994.

ERIKSEN, E.F.; MOSEKILDE, L.; MELSEN, F. Effect of sodium fluoride, calcium, phosphate and vitamin D2 on trabecular bone balance and remodeling in osteoporotics. **J. Bone**, n. 6, p. 381-9, 1985.

Ergun C, Webster TJ, Bizios R, Doremus RH. Hydroxylapatite with substituted magnesium, zinc, cadmium, and yttrium.I. Structure and microstructure. **J Biomed Mater Res**. 59: 305–11, 2002.

EVERETT, E. T., et al. Dental fluorosis: variability among different inbred mousestrains. **J Dent Res**, v. 81, n. 11, p. 794-8, Nov. 2002.

FARLEY, J. R., WERGEDAL, J. R., BAYLINK, D. J. Fluoride directly stimulates proliferation and alkaline phosphatase activity of bone-forming cells. **Science**, v. 222, p. 330-2, 1983.

FARLEY, J. R., *Mitogenic action(s) of fluoride on osteoblast line cells: determinants of the response in vitro*. **J Bone Miner Res**. 5 Suppl 1: p. S107-13, 1990.

FRATZL, P. et al. Abnormal bone mineralization after fluoride treatment in osteoporosis : a small-angle x-ray-scattering study. **J. Bone Miner Res**: 9; 1541-9, 1994.

FROUM, S.J; WALLACE, S.S.; CHO, S.C.; TARNOW, D.P. Use of xenografts for sinus augmentation. In: JENSEN, O.T. The Sinus Bone Graft. 2nd ed. Illinois: Quintessence Publishing, p.211-219, 2006.

Grynpas, M. D. Fluoride effects on bone crystals. **J Bone Miner Res**, 5 Suppl 1: S169-75, 1990.

HADJIDAKIS, D. J., ANDROULAKIS, I. I. Bone remodeling. **Ann NY Acad Sci**, v. 1092, p. 385-96, Dec, 2006.

HAGUENAUER, D. et al. Fluoride for the treatment of postmenopausal osteoporotic fractures: a meta-analysis. **Osteoporosis Int**, v. 11, n. 9, p. 727-38, 2000.

HALLANGER JOHNSON, J.E. *et al.* Fluoride-related bone disease associated with habitual tea consumption. **Mayo Clin Proc**, v. 82, n. 6, p. 719-24, June 2007.

HARADA, S.; RODAN, G.A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 349-55, 2003.

HENCH, L. L.; WILSON, J. *Introduction to Bioceramics*. T ed. Singapore: **WordScientific Publishing Co. Pte. Ltd.**, 1993.

GARG AK. Grafting Materials in Repair and Restoration. In: *Tissue Engineering-Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. **Quintessence Books (Publishing)**. Cap.5, 1999.

GOSAIN, A. K. *et al.* A 1-year study of hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: III. Comparison with autogenous bone graft for facial augmentation. **Plast Reconstr Surg**. Sep 15;116(4):1044-52, 2005.

HAGUENAUER, D. *et al.* Fluoride for the treatment of postmenopausal osteoporotic fractures: a meta-analysis. **Osteoporosis Int**, v. 11, n. 9, p. 727-38, 2000.

HALLANGER JOHNSON, J.E. *et al.* Fluoride-related bone disease associated with habitual tea consumption. **Mayo Clin Proc**, v. 82, n. 6, p. 719-24, June 2007.

HARINARAYAN, C.V. *et al.* Fluorotoxic metabolic bone disease: an osteo-renal syndrome caused by excess fluoride ingestion in the tropics. **J. Bone**, v. 39, n. 4, p. 907-14, 2006.

HENCH, L. L.; WILSON, J. *Introduction to Bioceramics*. T ed., Singapore: **Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.**, 1993.

HING, K.A. *et al.* Mediation of bone ingrowth in porous hydroxyapatite bone graft substitutes. **J Biomed Mater Res**, v. 68, n. 1, p. 187-200, 2004.

HOLN, A.; CURVO, A.P.R. Enxerto de seio maxilar com substituto ósseo bovino (Gen Mix). **RBO: Revista Brasileira de Odontologia**. v.65, n.2, p.228-233, 2008.

Hong Y, Fan H, Li B, Guo B, Liu M, Zhang X. Fabrication, biological effects, and medical applications of calcium phosphatene nanoceramics. **Mater Sci Eng Reports**. 70:225-42, 2010.

HUNT, D.R.; JOVANOVIC, A.S. Autogenous bone harvesting: a chin graft technique for particulate and monocortical bone blocks. **Int. J. Periodont. Rest. Dent.**, v.19, n.2, p.165-173, 1999..

JUKES, J.M. et al. Potential of embryonic stem cells for in vivo bone regeneration. **Regen Med**, v. 3, n. 6, p. 783-5, 2008.

KARSENTY, G. Bone Formation and factors affecting this process. **Matix Biology** . 19; 85-89, 2000.

KASSEM, M.; MOSEKILDE, L.; ERIKSEN, E.F. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ potentiates fluoride-stimulated collagen type I production in cultures on human bone marrow stromal osteoblast-like cells. **J Bone Miner Res**, v. 8, p. 1453-8, 1993.

KATO MT, BOLANHO A, ZARELLA BL, SALO T, TJÄDERHANE L, BUZALAF MA. Sodium fluoride inhibits MMP-2 and MMP-9. **J Dent Res**, v. 93, n. 1, p.74-7, 2014.

KASSEM, M.; MOSEKILDE, L.; ERIKSEN, E.F. Effects of fluoride on human bone cells in vitro: differences in responsiveness between stromal osteoblast precursors and mature osteoblasts. **Eur J Endocrinol**, v. 30, p. 381-6, 1994.

KEBSCH, M. et al. The effect of fluoride administration on rat serum osteocalcin expression during orthodontic movement. **J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 131, n. 4, p. 515-24, 2007.

KAWASHI, E.Y. Fosfatos de Cálcio: Porosidade, Cristalinidade, Potencial de Interface e Comportamento in Vivo.. Dissertação (Mestrado) - **Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)**, São Paulo, 1997.

KHOKER, M.A.; DANDONA, P. Fluoride stimulates [+H] thymidine incorporation and alkaline phosphatase production by human osteoblasts. **Metabolism**, v. 39, n. 11, p. 1118-21, Nov. 1990.

KOBAYASHI, Y. UDAGAWA, N. TAKAHASHI, N. Action of RNKL and OPG for Osteoclastogenesis. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, v. 19, n. 1, p. 61-72, 2009.

KOBAYASHI, Y. UDAGAWA, N. TAKAHASHI, N. Action of RNKL and OPG for Osteoclastogenesis. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, v. 19, n. 1, p. 61-72, 2009.

KIM, J., KIM M., KIM S. Modulation of osteoblastic/odontoblastic differentiation of adult mesenchymal stem cells through gene introduction: a brief review. **J. Korean Oral Maxillofa. Surg.** Apr, 39(2): 55-62, 2013.

KLEEROKOPER, M. et al. A randomized trial of sodium fluoride as a treatment for postmenopausal osteoporosis. **Osteoporos Int**, v. 1, n. 3, p. 155-61, June 1991.

KRAGSTRUP, J.; RICHARDS, A.; FEJERSKOV, O. Experimental osteo-fluorosis in the domestic pig: a histomorphometric study of vertebral trabecular bone. **J Dent Res**, v. 63, n. 6, p. 885-9, June, 1984.

KRISHNAMACHARI, K.A. Skeletal fluorosis in humans: a review of recent progress in the understanding of the disease. **Progr Food Nut Sci**, v. 10, n. 3-4, p. 279-314, 1986.

KROOK, L.; MAYLIN, G.A. Industrial fluoride pollution: chronic fluoride poisoning in Cornwall Island cattle. **Cornell Vet**, v. 69, Suppl. 8, p. 1-70, Apr. 1979.

KÜRKÇÜ, M. *et al.* Histomorphometric evaluation of implants coated with enamel or dentine derived fluoride-substituted apatite. **J Mater Sci Mater Med**, v. 9, n. 1, p. 59-65, 2008.

LAGIER, R. Effects of fluorine on bone morphology. In: CORVOISIER, B.; DONATH, A.; BAUD, C.A. Fluoride and bone: second symposium CEMO (Centre d'étude des maladies ostéo-articulaires de Genève) Geneva: **Médecine et Hygiène**. p. 32, 1978.

LANE, J.M. Bone Graft Substitutes. **West J. Med.**, v.163, n.6, p.565-566, 1995.

LAU, K.H.; BAYLINK, D.J. Molecular mechanism of action of fluoride on bone cells. **J Bone Miner Res**, v. 13, n. 11, p. 1660-7, Nov. 1998.

LAU, K.H.; BAYLINK, D.J. Phosphotyrosyl protein phosphatases: potential regulators of cell proliferation and differentiation. **Crit Rev Oncog**, v. 4, n. 4, p. 451-71, 1993.

LeGEROS, R. Z. Hydroxyapatite and related materials. Boca Raton: **CRC Press**; 1994.

LEHMANN R. , et al Drinking water fluoridation: bone mineral density and hip fracture incidence. **J. Bone**. Mar;22(3):273-8, 1998.

LEONETTI, J. A., KOUP, R. Localized maxillary ridge augmentation with a block allograft for dental implant placement: case reports. **Implant. Dent.**, 12(3), p. 217-26, 2003.

LI Y, et al. Effect of long-term exposure to fluoride in drinking water on risks of bone fractures . **J Bone Miner Res**. 16(5):932-9, 2001.

LIM, P. N., TAY. B.Y., CHAN, C. M., THIAN, E.S. Synthesis and characterization of silver/silicon-cosubstituted nanohydroxyapatite. **J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater**. 100B:285–91, 2012.

MANDRACCHIA, V.J.; NELSON, S.C.; BARP, E.A. Current concepts of bone healing. **Clin Podiatr Med Surg**, v. 18, n. 1, p. 55, 2001.

MANDUCA, P. et al. D. FMS* Calciumfluor specifically increases mRNA levels and induces signaling via MAPK 42, 44 and not FAK in differentiating at osteoblasts. **Cell Biol Int**, v. 29, p. 629-73, 2005.

MARIE, P. J., De VERNEJOU, M. C., LOMRI A. Stimulation of bone formation in osteoporosis patients treated with fluoride associated with increased DNA synthesis by osteoblastic cells in vitro. **J Bone Miner Res**. 7(1):103-13, 1992.

MARTIN, T. GOOI, J.H.; SIMS, N.A. Molecular mechanisms in coupling of bone formation to resorption. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, v. 19, n. 1, p. 73-88, 2009.

MELCHER, A. H.; DENT, H. D. The use of heterogenous anorganic bone as an implant material in oral procedures. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 15, p. 996-1000, 1962.

MELO, W.M. Osso autógeno associado a osso bovino inorgânico (GenOx Inorg[®]) para aumentos do soalho do seio maxilar e instalação de implantes: análise comparativa do potencial osteogênico de cultura de células derivadas do sítio doador e do sítio de implantação. 2012. 41f.[dissertação(Mestrado em Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial)]. **Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo**; 2012.

MERZ, W. The essential trace elements. **Sci**, v. 213, n. 1332-8, 1981.

MEUNIER, P. J. et al. Fluoride salts are no better at preventing new vertebral fractures than calcium-vitamin D in postmenopausal osteoporosis. **The FAVO Study**. 1998.

MODROWISK, D. et al. Effect of fluoride on bone and bone cells in ovariectomized rats. **J Bone Miner Res**, v. 7, p. 961-9, 1992.

MOHR, H. Fluoride effect on bone formation-an overview. **Tandlaegebladet**, v. 94, n.18, p. 761-3, Dec. 1990.

MOUSNY, M. et al. Fluoride effects on bone formation and mineralization are influenced by genetics. **Bone**, v. 43, n. 6, p. 1067-74, 2008. **Oral Implants Res**, Vienna - Austria, v. 16, n. 4, p. 461-5, 19 Aug. 2005.

Miao et al. In vivo and in vitro study on the effect of excessive fluoride on type I collagen of rats. **Wei Sheng Yan Jiu**. 31(3):145-7, 2002.

MISCH C. E., DIETSH F. Bone-grafting materials in implant dentistry. **Implant. Dent** 1993; 2:158-167.

MIRAOUI, H., OUDINA K., PETITE H., TANIMOTO, Y., MORIYAMA, K., MARIE, P. J. J. Biol Chem. Fibroblast growth factor receptor 2 promotes osteogenic differentiation in mesenchymal cells via ERK1/2 and protein. **kinase C signaling**. 20;284(8):4897-904, 2009.

MUNDLOS, S. & OLSEN, B. R. Heritable diseases of the skeleton. Part I: Molecular insights into skeletal development-transcription factors and signaling pathways. **Faseb J**, 11(2):125-32, 1997.

NAKASE, T., YOSHIKAWA, H. Potential roles of bone morphogenetic proteins (BMPs) in skeletal repair and regeneration". **J Bone Miner Metab**.24(6):425-33, 2006.

NANCI, A. Ten cate's oral histology: development, structure, and funcion. Philadelphia-USA: **Elsevier**, 2008. 411p, 2008.

NARY FILHO, H., SARTORI, I., RIBEIRO JUNIOR, R. D. Reabilitações maxilares : técnicas de ancoragem x reconstrução. IN Querido, M .R . & Gomes, Y.L .F. Implantes osseointegrados-Inovando Soluções . **Artes Medicas** 12: 217-249, 2004.

OHMI, K. *et al*. The effect of fluoridation and its discontinuation on fluoride profiles in the alveolar bone of rat. **Calcif Tissue Int**, v. 77, n. 4, p. 226-32, 2005.

OLIVEIRA, R.C. et al. Efeito da temperatura de desproteinização no preparo de osso cortical bovino microgranular. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular em subcutâneo de ratos. **Rev. Fac. Odontol. Bauru**, v.7, p.85-93, 1999.

OLIVEIRA, R.C. et al. Avaliação histológica e bioquímica da resposta celular ao enxerto de osso cortical bovino previamente submetido a altas temperaturas. Efeito da temperatura no preparo de enxerto xenógeno. **Rev. Bras. Ortop.**, v.38, n.9, p.551-560, 2003.

OLIVEIRA, R.C. et al. Tissue response to a membrane of demineralized bovine cortical bone implanted in the subcutaneous tissue of rats. **Braz. Dental J.**, v.15, n.1, p.3-8, 2004.

ORUC, N. Occurrence and problems of high fluoride Waters in Turkey: an overview. **Environ Geochem Health**, v. 30, n. 4, p. 315-23, Aug. 2008.

PALERMO, C. et al. Osteogenesis in vitro rat tibia-derived osteoblasts is promoted by the homeopathic preparation, FMS*Calciumfluor. **Cell Biol Int**, v. 23, p. 31-40, 1999.

Partridge, K. et al. Adenoviral BMP-2 gene transfer in mesenchymal stem cells: in vitro and in vivo bone formation on biodegradable polymer scaffolds. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 292 ;144-152, 2004.

PERES-BUZALAF, C. et al. Genetic influences fluoride effects on mesenchymal cells-derived osteogenic differentiation". In: **88th General Session & Exhibition of the IADR**, Barcelona, Espanha, 2010.

PERROT, D. H., SMITH, R. A., KABLAN, L. B. The use of fresh frozen allogeneic bone for maxillary and mandibular reconstruction. **Int J Oral Maxillofac Surg**. 21:260-65, 1992.

PRUSS, A. et al. Validation of the 'Marburg bone bank system' for thermodisinfection of allogenic femoral head transplants using selected bacteria, fungi, and spores. **Biologicals**, v. 31, n. 4, p. 287-294, 2003.

QU, H.; WEI, M. Effect of fluorine content on mechanical properties of sintered fluoridated hydroxyapatite. **Mat Sci Engineer**, v. 26, p. 46-53, 2006.

QU, H.; WEI, M. The effect of fluoride contents in fluoridated hydroxyapatite on osteoblast behavior. **Acta Biomater**, v. 2, n. 1, p. 113-9, 2006.

QU, W.J. *et al.* Sodium fluoride modulates caprine osteoblast proliferation and differentiation. **J Bone Miner Metab**, v. 26, n. 4, p. 328-34, 2008.

- RAFFI, M.B.; MÉNDEZ, M.C.; RIET-CORREA, F. Estudos histomorfométrico e histológico das lesões ósseas causadas por flúor em aves. **Pesq Vet Bras**, v. 17, n. 2, p. 69-76, 1997.
- RAGHOEBAR, G.M.; LOUWERSE, C.; KALK, W.W.I.; VISSINK, A. Morbidity of chin bone harvesting. **Clin. Oral Implant. Res.**, v.12, n.5, p.503-507, 2001.
- RATNER, B. D. Surface modification of polymers : chemical, biological and surface analytical challenges. Biosens. **Bioelect**, 1995.
- REED, B.Y. et al. Fluoride-stimulated [H^3]thymidine uptake in a human osteoblastic osteosarcoma cell line is dependent on transforming growth factor β . **J Bone Miner Res**, v. 8, p. 19-25, 1993.
- REGINSTER, J .Y. et al. The effects of sodiun monofluorphaphate plus calcion an vertebral fracture rate in postmenopausa womem with moderate osteoporosis. **Annal Int Med**, 129(1); 1-8, 1998.
- REID, I.R. et al. Addition of monofluorophosphate to estrogen therapy in postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, n. 7, p. 2446-52, 2007.
- RIET-CORREA, F. et al. Poluição industrial como causa de intoxicação por flúor no município de Rio Grande, RS. **Pesq Vet Bras**, v. 3, n. 4, p. 107-14, 1983.
- RIGGS, B.L. et al. Clinical trial of fluoride therapy in postmenopausal osteoporotic women: extended observations and additional analysis. **J Bone Miner Res**, v. 9, n. 2, p. 265-75, 1994.
- RIGGS, B.L. et al. Treatment of primary osteoporosis with fluoride and calcium: clinical tolerance and fracture occurrence. **J Am Med Assoc**, v. 243, p. 446-9, 1980.
- RIGGS, B. L. et al. Effect of fluoride treatment on the fracture rate in postmenopausal women with osteoporosis". **N Engl J Med**, 322(12):802-9, 1990.
- RINGE, J. D et al. Therapy of established postmenopausal osteoporosis with monofluorophosphate plus calcium: dose-related effects on bone density and fracture rate. **Osteoporos Int**, 9(2):171-8, 1999.
-

RODRIGUEZ, J.P.; ROSSELOT, G. Sodium fluoride induces changes on proteoglycans synthesized by osteoblasts in culture. **J Cell Biochem**, v. 83, p. 607-16, 2001.

ROODMAN, G.D. Treatment strategies for bone disease. **Bone Marrow Transplant**, v. 40, n. 12, p. 1139-46, Dec. 2007.

ROSA, F.P. et al. Tissue response to polyanionic collagen: elastin matrices implanted in rat calvaria. **Biomaterials**, v.24, n.2, p.207-212, 2003.

ROSEN, V.; THIES, R. S. The BMP proteins in bone formation and repair. **Tig March**, v. 8, n. 3, 1992.

SCHLIEPHAKE, H., et al. Use of cultivated osteoprogenitor cells to increase bone formation in segmental mandibular defects: an experimental pilot study in sheep. **Int. J. oral Maxillofac. Surg.**, 30(6): 531-7, 2001.

SCARANO, A.; DEGIDI, M.; IEZZI, G.; PECORA, G.; PIATTELLI, M.; ORSINI, G.; CAPUTI, S.; PERROTTI, V.; MANGANO, C.; PIATTELLI, A. Maxillary Sinus Augmentation With Different Biomaterials: A Comparative Histologic and Histomorphometric Study in Man. **Implant dentistry**, v.15, n. 2, p.197-207, 2006.

SCHLIEPHAKE, H. et al. Use of cultivated osteoprogenitor cells to increase bone formation in segmental mandibular defects: an experimental pilot study in sheep. **Int. J. oral Maxillofac. Surg.**, 30(6): 531-7, 2001.

SCHNITZLER, C.M.; SOLOMON, L. Trabecular stress fractures during fluoride therapy for osteoporosis. **Skeletal Radiol**, v. 14, p. 276-9, 1985.

SERRA, M. C., SARTINI FILHO, R., CURY, J. A. Incorporação e retenção de flúor em esmalte e dentina após aplicação tópica de flúor fosfato acidulado. **Rev Bras Odontol** . jan-fev; XLVI(1):18 – 23, 1989.

SHARMA, R.; TSUCHIYA, M.; BARTLETT, J.D. Fluoride induces endoplasmic reticulum stress and inhibits protein synthesis and secretion. **Environ Health Perspect**, v. 116, n. 9, p. 1142-6, Sept. 2008.

SICCA, C.M.; OLIVEIRA, R.C.; SILVA, T.L.; CESTARI, T.M.; OLIVEIRA, D.T.; BUZALAF, M.A.; TAGA, R.; TAGA, E.M.; KINA, J.R.; GRANJEIRO, J.M. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito do tamanho da partícula. **Rev. Fac. Odontol. Bauru**, v.8, p.1-10, 2000.

SIMONSEN, C. C., and LEVINSON, A. D. Isolation and expression of an altered mouse dihydrofolate reductase cDNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 80: 2495-2499, 1983.

SOGAARD, C. H., MOSEKILDE, L., SCHAWARTZ, W., LEIDIG, G., MINNE, H. W., ZIEGLER, R. Effects of fluoride on rat vertebral body biomechanical competence and bone mass. **Bone**.16:163–169, 1995.

SOLTANOFF, C.S. et al. Signaling networks that control the lineage commitment and differentiation of bone cells. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, v. 19, n. 1, p. 1-46, 2009.

STEVENS, M. M Biomaterials for bone tissue engineering. **Materialstoday** .Volume 11, Issue 5, May, Pages 18–25,. 2008

TADIC, D., PETERS, F., EPPLE, M. Continuous Synthesis of Amorphous Carbonated Apatites. **Biomaterials**, 23: 2553-2559, 2002.

TAGA, R et al. Reparo de defeito ósseo perene em crânio de cobaia pela aplicação de osseobond. **Rev. Bras. Implant**, v. 3, n. 1, p. 13-20, 1997.

TAGA, R., CESTARY, T. M., TAGA, E. M., TAVANO, O., GRANJEIRO, J. M. Evolução de enxertos ósseos autógenos e alógenos em defeitos ósseos de tamanho crítico em calvária de cobaias. **B. C. I.- Rev. Bras. Cirurg. Implant**. V.7, n.26, p37-44, 2000.

TAKEI, H. H. et al, Cirurgia periodontal reconstrutiva. IN: Newman, M. G., Carranza's Periodontia Reconstrutiva, 11th ed. Rio de Janeiro: **Elsevier editor Ltda**. Cap 61, p. 730-745, 2011.

TAMER, M. N. et al. Osteosclerosis due to endemic fluorosis. **Sci Total Environ**, v. 373, n. 1, p. 43-8, 2007.

TAVES, D. R. **Ibid.**, 211, 192, 1966.

TEITELBAUM, S.L. Bone resorption by osteoclasts. **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1504-8, Sept. 2000.

TRUBIANI, O.; FULLE, S.; TRAINI, T.; PALUDI, M.; LA ROVERE, R.; ORCIANI, M.; CAPUTI, S.; PIATTELLI, A. Functional assay, expression of growth factors and proteins modulating bone-arrangement in human osteoblasts seeded on an

anorganic bovine bone biomaterial. **European Cells and Materials**, v.20, p.72-83, 2010.

TURNER, C. H., et al. High Fluoride intakes cause osteomalacias and diminished bone strength in rats with renal deficiency. **Bone** . 19(6); 595-601, 1996.

TURNER, C. H., et al. Fluoride treatment increased serum IGF-1, bone turnover, and bone mass, but not bone strength, in rabbits. **Calcif Tissue Int**, 61(1): 77-83, 1997.

VESTERBY, A. et al. Marrow space star volume in iliac crest decreases in osteoporotic patients after continuous treatment with fluoride, calcium and vitamin. **Bone**, v. 12, p. 33-7, 1991.

VESTERGAARD, P. et al. Effects of treatment with fluoride on bone mineral density and fracture risk - a meta-analysis. **Osteoporos Int**, p. 1-12, July 2007.

WADDINGTON, R.J.; LANGLEY, M.S. Structural analysis of proteoglycans synthesizes by mineralizing bone cells in vitro in the presence of fluoride. **Matrix Biol**, v. 17, n. 255-68, 1998.

WADAGAKI, R., MIZUNO, D., YAMAWAKI-OGATA, A., SATAKE, M., KANEKO, H., HAGIWARA, S., YAMAMOTO, N., NARITA, Y., HIBI, H., UEDA, M. Osteogenic Induction of Bone Marrow-Derived Stromal Cells on Simvastatin-Releasing, Biodegradable, Nano- to Microscale Fiber Scaffolds. **Ann Biomed Eng**, 2011.

WADDINGTON, R.J.; LANGLEY, M.S. Structural analysis of proteoglycans synthesizes by mineralizing bone cells in vitro in the presence of fluoride. **Matrix Biol**, v. 17, n. 255-68, 1998

WANG, Y. et al. Osteoblastic cell response on fluoridated hydroxyapatite coatings. **Acta Biomaterialia**, v. 3, n. 2, p. 191-7, 2007.

WERGEDAL, J.E.; WILLIAN LAU, K.H.; BAYLINK, D.J. Fluoride and bovine extract influence cell proliferation and phosphatase activities in human bone cell cultures. **Clin Orthop**, v. 223, p. 274-82, 1988.

WHITFORD, G.M. Acute fluoride toxicity. In: WHITFORD, G.M. The metabolism and toxicity of fluoride. 2. ed. London: Karger Basel. cap. vii, p. 112-36, 1996.

WHITFORD, G.M. Fluoride metabolism and excretion in children. **J Public Health Dent**, v. 59, n. 4, p. 224-9, 1999.

WHITFORD, G.M. Intake and metabolism of fluoride. **Adv Dent Res**, v. 8, p. 5-14, 1994.

XIAO, G., JIANG, D., GOPALAKRISHNAN, R., FRANCESCHI, R. T. Fibroblast growth factor 2 induction of the osteocalcin gene requires MAPK activity and phosphorylation of the osteoblast transcription factor, Cbfa1/Runx2. **J Biol Chem**. 27; 277(39): 36181-7, 2002.

YAN, D. et al. Genetic background influences fluoride's effects on osteoclastogenesis. **Bone**, v. 41, n. 6, p. 1036-44, Dec. 2007.

Young, M. F., J. M. Kerr, et al. Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. **Clin Orthop Relat Res**, 281: 275-94, 1992.

Zhou H, Lee J. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. **Acta Biomater**. 7: 2769–81, 2011.