AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**AVALIAÇÃO DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA EM TÍBIA DE COELHOS UTILIZANDO
CÚPULA DE HIDROXIAPATITA ASSOCIADA A DIFERENTES BIOMATERIAIS**

NANCY TIAKI MAEDA

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear - Materiais**

Orientadora:

**Profa. Dra. Ana Helena de Almeida
Bressiani**

**São Paulo
2013**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**AVALIAÇÃO DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA EM TÍBIA DE COELHOS UTILIZANDO
CÚPULA DE HIDROXIAPATITA ASSOCIADA A DIFERENTES BIOMATERIAIS**

NANCY TIAKI MAEDA

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear - Materiais**

Orientadora:
**Profa. Dra. Ana Helena de Almeida
Bressiani**

Versão Corrigida
#

São Paulo
2013

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares- IPEN.

À Profa. Dra. Ana Helena de Almeida Bressiani pela devida orientação, com inestimável atenção, compreensão e carinho. Agradeço pelo modelo profissional, com a dose adequada de rigor, respeito, ética e muita sabedoria. Agradeço a oportunidade de aprendizado e amadurecimento, através da execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Yoshimoto, pela confiança em me entregar este trabalho e pela colaboração em sua execução.

Ao Prof. Dr. Sergio Allegrini Junior e ao Prof. Dr. Marcos Barbosa Salles, pela grande ajuda nos experimentos *in vivo* e pelas conversas e sugestões para o desenvolvimento do trabalho.

À Profa. Dra. Olga Zazuco Higa e ao aluno Fernando José Costa Baratéla, do Centro de Biotecnologia- IPEN, pelos ensaios *in vitro* e ensinamentos.

À Dra. Carola, ao Kalan e à Dra. Tamiye, pela ajuda com o tratamento dos animais, durante o ensaio *in vivo*.

Ao Dr. Márcio Mendes, pela colaboração com os gráficos e análises realizadas neste trabalho.

À Profa. Dra. Christiane Ribeiro e ao Prof. Dr. Luis Gênova, pela contribuição no desenvolvimento da cúpula.

A todos os colegas do IPEN, que de maneira direta ou indireta, colaboraram com este trabalho.

Ao Departamento de Neuroanatomia do Instituto de Ciências Biomédicas-USP, em especial à Profa. Dra Maria Inês Nogueira, Leila e. Silvia.

Aos técnicos do laboratório do Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais- IPEN, que colaboraram com as análises e ao técnico Pedro, pela ajuda na confecção da cúpula.

Aos técnicos do laboratório do Departamento de Anatomia- ICB, Martha e Boleta, pelo preparo das amostras histológicas.

À DSP Biomedical, pela contribuição com os implantes e com as amostras histológicas.

Aos meus pais, Toshimitsu e Julia, pelos ensinamentos, pela força, carinho e apoio em todas as etapas e dificuldades em toda minha vida, e pelo exemplo diário de caráter e dignidade.

Ao meu noivo, Newton Hisayasu, companheiro, amigo e amado, com quem compartilho minhas conquistas e angústias, e que sempre tem as palavras ou o silêncio que me motiva a cada dia.

Aos meus irmãos, Erica e Edson, familiares e amigos, pelos momentos de descontração, desabafo e alegria, e por acreditarem no meu esforço e trabalho, aumentando, assim, a motivação para realizar bons trabalhos.

Aos coelhos, que participaram, e foram fundamentais para a realização deste trabalho.

E, acima de tudo, a Deus, pelas bênçãos e graças recebidas em minha vida.

AVALIAÇÃO DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA EM TÍBIA DE COELHOS UTILIZANDO CÚPULA DE HIDROXIAPATITA ASSOCIADA A DIFERENTES BIOMATERIAIS

Nancy Tiaki Maeda

RESUMO

A instalação de implantes odontológicos requer a presença de substrato ósseo adequado para garantir estabilidade e equilíbrio biomecânico. A deficiência óssea requer procedimentos de enxertia para adequar o volume para a instalação de implantes, porém a utilização de enxertos autógenos causa aumento de morbidade ao paciente e o uso de material homogêneo e xenógeno apresenta dúvidas quanto à reação autoimune, transmissão de doenças e ao grau de reabsorção do enxerto. Com o grande desenvolvimento científico e tecnológico dos biomateriais, os materiais cerâmicos, tornaram-se alternativas promissoras para a recomposição da estrutura óssea perdida. As cerâmicas à base de fosfato de cálcio como a hidroxiapatita (HA) e o beta- fosfato tricálcico (beta-TCP), são materiais que apresentam qualidades desejáveis no processo de neoformação óssea como, por exemplo, a biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade. A proposta deste trabalho é desenvolver e estudar corpos de prova na forma de cúpula oca de hidroxiapatita preenchidos por coágulo, beta- TCP e composto vitamínico, para estudar a osteogênese supracortical, a partir do potencial osteocondutor da cúpula de HA. As cúpulas foram obtidas por prensagem isostática a 200 MPa e sinterização ao ar a 1100°C por 60 minutos. As caracterizações físico-químicas das matérias-primas e da cúpula de HA foram realizadas por difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura e determinação da densidade. Na caracterização biológica, foram realizados o teste de citotoxicidade *in vitro* e ensaio *in vivo*. Foram designados 9 coelhos (raça Nova Zelândia), sendo instaladas 18 cúpulas, divididas em três grupos, de acordo com o preenchimento: controle, composto vitamínico e β -TCP em forma de pó. O período de reparação tecidual foi de 8 semanas, no qual foram aplicados marcadores de fluorescência. Após o período de cicatrização e eutanásia, as amostras foram incluídas em resina para a obtenção das lâminas e observadas em microscópio de fluorescência, para avaliar a quantidade de tecido ósseo neoformado, em microscópio de campo claro, para verificar as células presentes no tecido formado e por Espectroscopia de Energia Dispersiva, para análise química, da formação no interior das cúpulas. Como resultados, a cúpula de hidroxiapatita apresenta bom desempenho como arcabouço para neoformação óssea acima da cortical da tíbia de coelhos, pois manteve-se íntegra, com boa estabilidade e boa integração ao tecido ósseo, e principalmente pela neoformação óssea, demonstrando seu potencial osteocondutor. Em relação aos materiais de preenchimento, o beta-TCP apresenta maior valor de área de osso neoformado, em comparação com o coágulo. Nas cúpulas com preenchimento de composto vitamínico, não há formação de tecido ósseo pela não reabsorção do material.

EVALUATION OF NEW BONE FORMATION IN RABBITS USING HYDROXYAPATITE DOME ASSOCIATED TO DIFFERENT MATERIALS

Nancy Tiaki Maeda

ABSTRACT

The installation of dental implants requires the presence of adequate bone substrate to ensure stability and biomechanical balance. Deficiency requires bone grafting procedures to adjust the volume for implant placement, but the use of autogenous grafts cause increased morbidity to the patient and the use of homogenous and xenogenous materials has doubts about the autoimmune reaction, transmission of disease and the degree of resorption of the graft. With the great scientific and technological development of biomaterials, ceramic materials, have become promising alternatives for restoration of lost bone structure. The ceramics based on calcium phosphate such as hydroxyapatite (HA) and beta-tricalcium phosphate (beta-TCP) are materials having desirable qualities in the process of bone formation, for example, biocompatibility, bioactivity and osteoconductivity. The purpose of this work is to develop and study the dome-shaped hydroxyapatite filled with blood clot, beta-TCP and vitamin compound, to study osteogenesis supracortical from the osteoconductive potential of the dome of HA. The domes were obtained by isostatic pressing at 200 MPa and sintered in air at 1100 ° C for 60 minutes. The physico-chemical characterization of raw materials and the dome of HA were performed by X-ray diffraction, scanning electron microscopy and density determination. In biological characterization were performed tests for in vitro cytotoxicity and tests in vivo. Were designated 9 rabbits (New Zeland), and installed 18 domes, divided into three groups, according to the filling: control, vitamin compound and β -TCP in powder form. The period of wound healing was 8 weeks, when a fluorescence marker was applied. After the healing period and euthanasia, the samples were embedded in resin to obtain the slides and observed under fluorescence microscope to evaluate the amount of newly formed bone tissue in bright field microscope to check the cells present in the tissue and by Energy Dispersive Spectroscopy for chemical analysis, inside the domes. As a result, the hydroxyapatite dome has good performance as scaffold for bone formation above the cortical tibia of rabbits, it remained intact, with good stability and good integration with bone tissue, especially bone formation, demonstrating osteoconductive potential. Regarding the filling materials, beta-TCP has a higher value of area of new bone formation compared to the clot. In the domes-filled vitamin compound, there is no formation of bone resorption by not material.

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO	1
2) REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1) Tecido Ósseo	6
2.1.1) Composição do tecido ósseo- estrutura e classificação	6
2.1.2) Osteogênese.....	9
2.1.3) Inflamação/ reparação.....	11
2.2) Biomateriais	12
2.2.1) Biocerâmicas.....	14
2.2.2) Cerâmicas a base de fosfato de cálcio	16
2.2.3) Hidroxiapatita	19
2.2.4) Beta-TCP	20
2.2.5) Composto Vitamínico	21
2.3) Regeneração óssea guiada- Cúpula	23
2.4) Adesivos à base de cianoacrilato	26
3) OBJETIVOS	27
4) MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1) Caracterização	30
4.1.1) Difração de raios X.....	30
4.1.2) Microscopia Eletrônica de Varredura.....	31
4.2) Caracterização das matérias-primas	31
4.3) Obtenção dos corpos de prova.....	31
4.4) Caracterização do material sinterizado.....	32
4.5) Caracterização biológica	33
4.5.1) Teste de citotoxicidade- <i>ensaio in vitro</i>	33
4.5.2) Ensaio <i>in vivo</i>	34
4.6) Microscopia de fluorescência	40
4.7) Microscopia de campo claro	41
4.8) Espectroscopia de Energia Dispersiva em Microscópio Eletrônico de Varredura	42
5) RESULTADOS	44
5.1) Caracterização dos pós e do composto vitamínico.....	45
5.2) Caracterização do material sinterizado.....	47
5.3) Teste de Citotoxicidade- <i>ensaio in vitro</i>	48
5.4) Ensaio <i>in vivo</i>	50
5.5) Microscopia de Fluorescência	52
5.6) Microscopia de campo claro.....	58

5.7) Espectroscopia de Energia Dispersiva	64
6) CONCLUSÕES	68
7) ANEXOS	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de estrutura óssea, contendo os três tipos de tecido ósseo lamelar: os sistemas de Havers e as lamelas circunferenciais externas e internas. O sistema de Havers, no alto e à esquerda, mostra a orientação das fibras colágenas em cada lamela. À direita, um sistema de Havers isolado, mostrando um capilar sanguíneo central e muitos osteócitos com seus prolongamentos ¹⁷	8
Figura 2- Diagrama de fase parcial do sistema CaO/ P ₂ O ₅ em alta temperatura (°C no eixo vertical). Pressão de vapor de água= 500mm Hg. Área sombreada refere-se à faixa de processamento para produção de HA ³⁶	17
Figura 3: Ilustração da técnica de ROG: a) Crista alveolar delgada; b) Técnica de ROG, com parafusos de fixação; c) Implante odontológico instalado ⁵⁷	24
Figura 4: Esquema e dimensões da cúpula de hidroxiapatita utilizada nos experimentos in vivo	32
Figura 5: (a) Acesso à área operatória; (b) Parafuso ortodôntico instalado; (c) Fixação da cúpula com adesivo à base de cianocrilato reforçado por parafusos ortodônticos; (d) Visão da cúpula fixada	36
Figura 6: Bloco de resina polimerizado, contendo o bloco de tíbia	38
Figura 7:(a) Micrótomo Exact Ban system 300, cortando o bloco de resina; (b) Posicionamento do bloco de resina, com cortes perpendicular ao longo eixo da tíbia.....	39
Figura 8: Esquema das regiões da cúpula, divididas para análise de microscopia de fluorescência	41

Figura 9: Difrátogramas de raios X dos pós de partida (a) hidroxiapatita e (b) beta-TCP, apresentando apenas as fases características dos materiais.	45
Figura 10: Difrátograma do composto vitamínico, demonstrando picos característicos de hidróxido de magnésio e fosfato tricálcico (beta-TCP).....	46
Figura 11: Micrografias dos materiais de partida (a) hidroxiapatita e (b) Beta-TCP.	47
Figura 12: Difrátograma da cúpula de Hidroxiapatita sinterizada (HA) e o padrão da JCPDS- IDCC: 9-0432.	47
Figura 13: Micrografia da amostra da superfície de fratura da HA sinterizada, com boa densificação e presença de poros (seta).	48
Figura 14: Gráfico da viabilidade celular da amostra da cúpula de hidroxiapatita e dos controles positivo e negativo.	49
Figura 15: Gráfico da viabilidade celular dos materiais utilizados como preenchimentos das cúpulas, beta-TCP e composto vitamínico, e dos controles positivo e negativo.	50
Figura 16: Bloco da tíbia contendo a cúpula fixada por parafusos ortodônticos. Vista superior (a) e lateral(b), com formação óssea sobre a cúpula (seta).	51
Figura 17: Microscopia de fluorescência, filtro duplo. Imagem da região da cúpula implantada (estrela) preenchida com β -TCP, demonstrando neoformação óssea em seu interior, através do marcadores: alizarina (seta vermelha), calceína (seta amarela) e tetraciclina.	52
Figura 18: Imagens da região R2, da cúpula preenchida por coágulo (a) filtro duplo, (b) alizarina, (c) calceína, (d) tetraciclina.	53

Figura 19: Imagens da região R2, com preenchimento de composto polivitamínico (a) filtro duplo, (b) alizarina, (c) calceína, (d) tetraciclina. 54

Figura 20: Imagens da região R2, com preenchimento de β -TCP (a) filtro duplo, (b) alizarina, (c) calceína, (d) tetraciclina. 55

Figura 21: Imagem da região R2, com preenchimento de coágulo, demonstrando a quantificação dos marcadores realizada através do programa Image Pro-Plus..... 55

Figura 22: Lâminas coradas com azul de toluidina da cúpula com preenchimento de coágulo: (a) vista geral da cúpula, estrela: cúpula; círculo: perfuração do osso cortical da tíbia para perfusão sanguínea; seta branca: tecido ósseo; (b) região basal lateral da cúpula, estrela: cúpula, seta preta: vaso sanguíneo, seta branca: camada de osteoblastos em contato com matriz osteóide, revestindo o tecido ósseo neoformado; seta laranja: células ósseas aderidas à cúpula. 59

Figura 23: Lâminas coradas com Stevenel's blue da cúpula com preenchimento de coágulo: (a) vista geral da cúpula, estrela: cúpula; vermelho: tecido mineralizado; (b) região do ápice da cúpula- R2: seta branca: osteoblastos enfileirados, demonstrando atividade metabólica; seta amarela: lamelas ósseas, tecido neoformado organizado. 60

Figura 24: Lâminas coradas com azul de toluidina da cúpula com preenchimento de composto vitamínico: (a) visão geral, estrela: cúpula; círculo: perfuração do osso cortical da tíbia (b) região basal lateral da cúpula- R3: estrela: cúpula; seta preta: cortical óssea da tíbia; seta vermelha: descontinuidade entre tecido ósseo e composto vitamínico; CV: composto vitamínico..... 60

Figura 25: Lâminas coradas com Stevenel's blue da cúpula com preenchimento de composto vitamínico: (a) visão geral da cúpula, estrela: cúpula; (b) região basal lateral da cúpula- R3: estrela: cúpula, seta preta: cortical óssea da tíbia; seta vermelha: descontinuidade entre tecido ósseo e composto vitamínico; CV: composto vitamínico. ... 61

Figura 26: Lâminas coradas com azul de toluidina da cúpula com preenchimento de β -TCP: (a) visão geral da cúpula, estrela: cúpula; (b) região apical da cúpula- R2 e (c) região basal lateral- R3: seta branca: fileira de osteoblastos depositando matriz osteóide, demonstrando atividade metabólica; seta amarela: osteócitos, indicando tecido ósseo maduro, com formação de lamelas. 62

Figura 27: Lâminas coradas com Stevenel's blue da cúpula com preenchimento de β -TCP: (a) vista geral da cúpula, estrela: cúpula; (b) região basal lateral da cúpula- R3; (c, d, e) região do ápice da cúpula- R2: seta amarela: osteócitos e lamelas ósseas, indicando tecido mineralizado; seta branca: osteoblastos em atividade, formando matriz óssea; seta azul: matriz osteóide. 63

Figura 28: (a) Micrografia obtida por MEV do corte histológico da cúpula de HA, com preenchimento de coágulo, sendo: estrela: cúpula, seta: formação óssea. (b) Mapeamento dos elementos químicos obtidos por EDS no corte histológico. (c) Espectroscopiade Energia Dispersiva identificando os elementos Ca e P, em função da energia 64

Figura 29: (a) Micrografia obtida por MEV do corte histológico da cúpula de HA, com preenchimento de composto vitamínico, sendo: estrela: cúpula. (b) Mapeamento dos elementos químicos obtidos por EDS no corte histológico. (c) Espectroscopiade Energia Dispersiva identificando os elementos Ca, P, O, Mg e Si, em função da energia..... 65

Figura 30: (a) Micrografia obtida por MEV do corte histológico da cúpula de HA, com preenchimento de beta-TCP, sendo: estrela: cúpula, seta: formação óssea, seta vermelha: partícula de β - TCP. (b) Mapeamento dos elementos químicos obtidos por EDS no corte histológico. (c) Espectroscopiade Energia Dispersiva identificando os elementos Ca, P e O, em função da energia 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Tipos de biocerâmica, adesão tecidual e classificação.....	15
Tabela 2- Propriedades mecânicas de biocerâmicas comparativamente aos ossos cortical e esponjoso.....	16
Tabela 3: Fosfatos de cálcio e ocorrência em sistemas biológicos ²⁶	18
Tabela 4: Formação, dosagem e tempo de aplicação dos marcadores celulares.....	37
Tabela 5: Valores de pH dos extratos com concentração de 100%.....	50
Tabela 6: Valores das médias e desvios-padrão, das áreas de osso neoformado, das cúpulas com preenchimento.....	56
Tabela 7: Valores das médias e desvio-padrões, dos marcadores de fluorescência, com preenchimento de coágulo.	56
Tabela 8: Valores das médias e desvio-padrões, dos marcadores de fluorescência, com preenchimento de β - TCP.	56

INTRODUÇÃO

O avanço da reabilitação oral através de implantes odontológicos, necessita de meios para adequar o substrato ósseo para a correta instalação dos implantes. Neste capítulo é abordada, de maneira sucinta, a evolução dos biomateriais e das técnicas de reconstrução do rebordo alveolar, visando a melhoria do tratamento e bem-estar do paciente.

1) INTRODUÇÃO

O interesse em utilizar materiais com finalidade terapêutica teve início há milhares de anos, em civilizações antigas, na tentativa de restaurar a estética e funções danificadas do corpo humano. Há pelo menos 2000 anos, romanos, chineses, maias e astecas usavam artifícios para substituição de dentes ausentes, através de dentes humanos, ou de animais, amarrados com fios de ouro; ou até mesmo conchas do mar e ferro esculpidos em forma de dentes. Olhos de vidro e peças em madeira, para próteses ortopédicas, eram materiais de uso comum^{1,2}.

A Revolução Industrial, séculos XVIII e XIX, trouxe maior conhecimento às áreas de Anatomia e Fisiologia, através do aprimoramento de técnicas cirúrgicas e desenvolvimento de materiais. No século XX ocorreu uma maior compreensão das reações biológicas e infecciosas, principalmente pela descoberta da penicilina, em 1929, por Alexander Fleming, ocasionada pela preocupação em impedir o crescimento de bactérias nas feridas infectadas dos combatentes de guerra. O desenvolvimento de biomateriais no século XX também aparece, principalmente, em resposta à necessidade de oferecer tratamentos aos indivíduos com condições clínicas graves relacionadas a acidentes e desastres, ocorridos nas grandes Guerras Mundiais¹.

Após a 2ª Guerra Mundial, médicos observaram que, em ex-combatentes feridos, alguns materiais de projéteis promoviam uma menor reação de corpo estranho. Assim, muitos materiais passaram a ser utilizados em técnicas de transferência de tecidos ou ainda como materiais para próteses e dispositivos médicos. Os danos provocados à saúde dos pacientes, por muitos dos materiais utilizados nos atos cirúrgicos, foram considerados catastróficos. Esses resultados fizeram com que em 1947 fosse recomendada oficialmente a utilização de aços inoxidáveis¹⁻³.

Nos anos 60 do século passado, ocorreu o 1º Simpósio de Biomateriais na Universidade de Clemson, nos Estados Unidos da América, culminando na formação da Sociedade de Biomateriais, em 1975, fortalecendo a ciência dos Biomateriais. Atualmente existem departamentos acadêmicos, programas de pós-graduação de biomateriais e institutos de pesquisas com o objetivo de pesquisar e explorar a ciência e engenharia dos biomateriais^{1,2,4}. O termo biomaterial engloba todos os materiais usados para aplicações médicas que estejam em interfaces com sistemas vivos ou desenvolvidos para usos extracorpóreos, como próteses, e incluem metais, cerâmicas, polímeros naturais (biopolímeros), polímeros sintéticos de estrutura simples ou complexa, e compósitos.

O progresso na pesquisa de biomateriais têm contribuído significativamente para o avanço da Medicina moderna, na aquisição de conhecimentos sobre interações

entre biomateriais e tecidos biológicos, no desenvolvimento de órgãos artificiais, envolvendo cultivo de células, além do avanço nos sistemas para liberação controlada de drogas e dispositivos cardiovasculares, miniaturização de próteses, enxertos ósseos e dispositivos ortopédicos, resultados da obtenção de novos biomateriais poliméricos, metálicos e cerâmicos. A área de biomateriais tem amadurecido, tornando-se uma área de pesquisa multidisciplinar, a partir da colaboração entre engenheiros biomédicos, cientistas de materiais, químicos, físicos, biólogos e médicos, que envolve a utilização de conceitos fundamentais no desenvolvimento de materiais para aplicação na prática clínica, como a caracterização físico-química do biomaterial, que é de fundamental importância para a determinação de seu desempenho e consequente definição de requisitos mínimos a serem atendidos pela indústria⁴.

A perda de um órgão ou de uma parte do corpo, ocasionada por trauma, patologia, ou devido ao aumento da expectativa de vida, gera, além da perda da função, transtornos sociais e psicológicos. Os avanços alcançados na Medicina e Odontologia tem possibilitado o desenvolvimento de técnicas que conduzem a uma melhor qualidade de vida às pessoas.

A partir de estudos realizados por Bränemark *et al* em 1969⁵, que propôs a utilização de cilindros de titânio inseridos na região do mento em mandíbula, para posterior restabelecimento protético, foi introduzido o conceito de Osteointegração. A Osteointegração foi definida como sendo a ligação direta, estrutural e funcional, entre osso ordenado e vivo e a superfície de um implante sujeito a cargas funcionais. Desde então, a Implantodontia apresenta um grande desenvolvimento na área de reabilitação oral e novas pesquisas se concentram em materiais ou técnicas para acelerar a osteointegração⁶.

Um dos problemas na Implantodontia atual é a falta de espessura óssea na região anterior da maxila, por se tratar da região mais visível no sorriso das pessoas. A demanda pelo restabelecimento desta estética é fundamental para se considerar o sucesso de um tratamento por meio de implantes dentais. A deficiência óssea requer procedimentos de enxertia para adequar o volume para a instalação de implantes^{7,8}.

Os defeitos ósseos alveolares podem ter origem de extração de elementos dentais, fraturas ou processos patológicos. Estes defeitos podem comprometer a instalação ideal dos implantes, prejudicando a reabilitação protética e estética. O aumento do rebordo alveolar pode ser alcançado por uma variedade de técnicas e materiais, como a utilização de membranas (barreiras) com enxerto particulado (Regeneração Óssea Guiada), enxertos em bloco, distração osteogênica, entre outras⁹.

As técnicas de reconstrução do rebordo ósseo residual com procedimentos de enxertos ósseos autógenos, isto é, obtidas do próprio paciente, tem apresentado bons resultados, sendo considerado o melhor material em procedimentos de regeneração óssea por proporcionar as melhores propriedades osteocondutivas, osteogênicas e osteoindutivas. Porém, trazem consigo o problema do aumento da morbidade, pois para sua obtenção se faz necessário, abordar outras áreas cirúrgicas, além da limitação da disponibilidade de material e viabilidade cirúrgica^{8,10}. A utilização de material homogêneo, de origem da mesma espécie, tem a vantagem de possuir grande disponibilidade, em vários tamanhos e formatos, sem prejudicar outras estruturas do paciente. Por outro lado, levanta a questionamentos morais, religiosos e éticos, por se tratar de material oriundo de doadores humanos, além do risco de transmissão de doenças, como a HIV, hepatite C, contaminações bacterianas e outras possíveis infecções virais¹⁰⁻¹². Para diminuir este risco, o material é processado (congelamento, desidratação, radiação ou métodos químicos) e esterilizado (óxido de etileno ou radiação), porém pode ocorrer a desnaturação das proteínas e enzimas presentes no material homogêneo, afetando o processo de incorporação do enxerto pela perda de sua força estrutural e diminuição das células viáveis, que ofereciam a propriedade osteoindutiva^{13,14}. O material xenógeno, de origem de espécies diferentes, apresenta dúvidas quanto à possibilidade de reação autoimune¹⁵ e, finalmente materiais aloplásticos, sintéticos, que, devido ao grande desenvolvimento científico e tecnológico, são cada vez mais utilizados, apresentam-se como alternativa promissora para recomposição da estrutura óssea perdida por atrofia do processo alveolar do sistema estomatognático originada pela perda do elemento dental¹⁶.

As cerâmicas à base de fosfato de cálcio possuem grande semelhança química com a fase mineral do osso, já que este possui íons cálcio e fósforo como principais constituintes, apresentando características interessantes para o metabolismo ósseo. A hidroxiapatita, cerâmica biocompatível, possui potencial osteocondutor e bioatividade, permitindo adesão, proliferação, migração e ativação das células ósseas, ocorrendo neoformação óssea em aposição direta ao biomaterial¹⁰. Estas propriedades da hidroxiapatita podem gerar resultados benéficos aos pacientes, sendo assim, selecionada como material a ser utilizado neste estudo.

O objetivo deste trabalho é desenvolver metodologia com corpos de provas de hidroxiapatita, na forma de cúpula oca, para neoformação óssea. As cúpulas são preenchidas com coágulo, material particulado de β -TCP ou um composto vitamínico, nos experimentos *in vivo*, tendo sido utilizado o osso cortical da tíbia de coelhos, para se observar a capacidade de neoformação óssea.

REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo, foram abordados alguns conceitos importantes sobre o tecido ósseo e uma descrição dos biomateriais utilizados neste trabalho. Para melhor compreensão da interação dos biomateriais e do tecido ósseo são discutidos temas como a composição, histogênese e reparação do tecido ósseo, além dos tipos de biomateriais e suas relações com o tecido hospedeiro, dando ênfase aos biomateriais utilizados neste estudo.

2) REVISÃO DA LITERATURA

2.1) Tecido Ósseo

O tecido ósseo é o constituinte principal do esqueleto, serve de suporte para os tecidos moles e protege órgãos vitais, como o cérebro, aloja e protege a medula óssea, formadora das células do sangue, proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis, e constitui um sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular. Além dessas funções, os ossos funcionam como depósito de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os, ou liberando-os, de maneira controlada, para manter constante a concentração destes importantes íons nos líquidos corporais¹⁷.

2.1.1) Composição do tecido ósseo- estrutura e classificação

O osso é um composto altamente ordenado de matriz orgânica e mineral inorgânico. A matriz óssea, chamada osteóide, quando recém formada e antes da mineralização, é principalmente um conjunto de fibras colágenas (95%) constituídas de colágeno tipo I, embebidas em substância fundamental (gel de água viscoso e complexos de glicoproteína/proteína). Contém também numerosos fatores orgânicos (citocinas, fatores de crescimento) que ajudam a controlar a ativação celular, maturação da matriz e mineralização¹⁸. A parte inorgânica representa cerca de 50% do peso da matriz óssea. Os íons mais encontrados são o fosfato e o cálcio, além dos íons bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato. O cálcio e o fósforo existem basicamente sob a forma de cristais de hidroxiapatita, mas o fosfato de cálcio também está presente na forma amorfa. Os íons da superfície dos cristais de hidroxiapatita são hidratados, formando uma camada em volta do cristal. Essa camada é denominada capa de hidratação, que facilita a troca de íons entre os cristais e o líquido intersticial^{17,19}.

Os ossos são órgãos porque são grupos de tecidos funcionalmente associados, cada osso tem formato e função únicos. Combinações específicas de tipos de tecido mineralizado, periósteo, cartilagem, medula, vascularização, nervos, tendões e ligamentos desempenham um papel particular no suporte mecânico e metabolismo¹⁸. Do ponto de vista macroscópico, a estrutura óssea é classificada de acordo com a densidade, como: osso compacto, tecido denso que reveste a superfície externa, e osso esponjoso ou trabecular, que reveste a cavidade medular. O tecido ósseo esponjoso possui trabéculas ósseas ramificadas e espículas projetando-se da superfície interna do

tecido ósseo compacto para a cavidade medular. Não há sistema de osteonas no tecido ósseo esponjoso, mas há arranjos regulares de lamelas. Estas contêm lacunas abrigando osteócitos, que são nutridos por difusão das cavidades medulares por entre as trabéculas; estas cavidades estão preenchidas por medula óssea¹⁹.

A medula óssea existe sob duas formas: a medula óssea vermelha, na qual se formam os elementos figurados do sangue (eritrócitos, leucócitos e plaquetas), e a medula óssea amarela, constituída principalmente por tecido adiposo unilocular e pouca quantidade de elementos figurados do sangue em formação¹⁹.

Histologicamente existem dois tipos de tecido ósseo: o imaturo ou primário; e o maduro, secundário ou lamelar. Os dois tipos possuem os mesmos tipos de células e os mesmos constituintes da matriz. O tecido primário é o que aparece primeiro, tanto no desenvolvimento embrionário como na reparação das fraturas, sendo temporário e substituído por tecido secundário¹⁷.

No tecido ósseo primário as fibras colágenas se dispõem irregularmente, sem orientação definida, tem menor quantidade de minerais e maior proporção de osteócitos do que o tecido ósseo secundário. No adulto, o tecido primário é muito pouco frequente, persistindo apenas próximo às suturas dos ossos dos crânios, nos alvéolos dentários e em alguns pontos de inserção de tendões¹⁷.

O tecido ósseo secundário é o tecido ósseo maduro composto por fibras colágenas organizadas em lamelas, com 3 a 7 μm de espessura, paralelas ou concêntricas em torno de canais com vasos, formando os sistemas de osteonas. As lacunas, contendo os osteócitos, estão em geral situadas entre as lamelas ósseas, porém algumas vezes estão dentro delas. Em cada lamela, as fibras colágenas são paralelas umas às outras. Separando grupos de lamelas, ocorre frequentemente o acúmulo de uma substância cimentante que consiste em matriz mineralizada, porém com muito pouco colágeno. Os canais centrais da osteona comunicam-se entre si, com a cavidade medular e com a superfície externa de osso por meio de canais transversais ou oblíquos, os canais perfurantes ósseos. Estes se distinguem dos canais centrais de osteona por não apresentarem lamelas ósseas concêntricas¹⁷ (Fig. 1).

Figura 1: Esquema de estrutura óssea, contendo os três tipos de tecido ósseo lamelar: os sistemas de osteon e as lamelas circunferenciais externas e internas. O sistema de osteon, no alto e à esquerda, mostra a orientação das fibras colágenas em cada lamela. À direita, um sistema de osteon isolado, mostrando um capilar sanguíneo central e muitos osteócitos com seus prolongamentos¹⁷.

As células do tecido ósseo incluem células osteoprogenitoras, as quais se diferenciam em osteoblastos. Os osteoblastos são responsáveis pela secreção da porção orgânica da matriz óssea (colágeno tipo I e glicoproteínas, como: a osteopontina e osteocalcina, citocinas e fatores de crescimento)²⁰, sendo capazes de concentrar o fosfato de cálcio e participar da mineralização da matriz. Dispõem-se sempre nas superfícies ósseas, lado a lado, num arranjo que lembra o epitélio simples. Quando estas células ficam envolvidas pela matriz, elas se tornam quiescentes e são denominadas osteócitos. A matriz depositada ao redor do corpo da célula e de seus prolongamentos, formam as lacunas e os canalículos. Dentro dos canalículos, os prolongamentos dos osteócitos estabelecem contatos através das junções comunicantes, por onde podem passar pequenas moléculas e íons de um osteócito para outro^{17,19}. Os osteoclastos, células gigantes multinucleadas originadas da fusão de precursores mononucleados advindos da medula óssea, são responsáveis pela reabsorção e remodelação do tecido ósseo, pela acidificação do tecido mineral ósseo causando sua dissolução e pela degradação da matriz óssea extracelular desmineralizada²⁰. Frequentemente, nas áreas de reabsorção óssea encontram-se porções dilatadas dos osteoclastos, colocadas em

depressões da matriz escavadas pela atividade dos osteoclastos e conhecidas como lacunas de Howship^{17,19}.

As superfícies internas e externas dos ossos são recobertas por células osteogênicas e tecido conjuntivo, que constituem o endóstio e o perióstio, respectivamente. A camada mais superficial do perióstio contém principalmente fibras colágenas e fibroblastos. As fibras de Sharpey são feixes de fibras colágenas do perióstio que penetram no tecido ósseo e prendem firmemente o perióstio ao osso. Na sua porção profunda, o perióstio é mais celular e apresenta células osteoprogenitoras que se diferenciam em osteoblastos, desempenhando papel importante no crescimento dos ossos e na reparação das fraturas. O endóstio é geralmente constituído por uma camada de células osteogênicas achatadas revestindo as cavidades do osso esponjoso, o canal medular, os canais centrais das osteonas e os canais perfurantes ósseos. As principais funções do endóstio e do perióstio são a nutrição do tecido ósseo e o fornecimento de novos osteoblastos, para o crescimento e a recuperação do osso¹⁷ (Fig.1).

2.1.2) Osteogênese

A osteogênese a partir das células osteoprogenitoras se realiza por dois processos básicos: 1) ossificação intramembranosa, com formação de tecido ósseo a partir de uma membrana conjuntiva fibrosa, sem modelo cartilaginoso prévio (por exemplo, ossos da calota craniana); 2) ossificação endocondral, que implica a formação de um modelo inicial produzido por condrócitos originando uma matriz cartilaginosa calcificada, a qual é remodelada em osso (por exemplo, ossos longos)²¹.

A ossificação intramembranosa surge em uma membrana mesenquimal ricamente vascularizada, onde células osteoprogenitoras se diferenciam em osteoblastos, os quais iniciam a produção de matriz orgânica óssea, formando assim trabéculas de tecido ósseo. Conforme mais e mais trabéculas se formam nas vizinhanças, elas se tornam interconectadas. À medida que se unem, formam um tecido ósseo esponjoso, cujas regiões periféricas são remodeladas para originar tecido ósseo compacto. As superfícies destas trabéculas são povoadas de osteoblastos, podendo também estar presentes osteoclastos. É através das interações dos osteoclastos com os osteoblastos que o tecido ósseo é remodelado. A região da membrana mesenquimal que não participa do processo de ossificação permanece como o componente tecidual mole do osso, isto é, perióstio e endóstio²².

A ossificação endocondral, responsável pela formação de ossos longos e curtos, baseia-se na presença de um modelo de cartilagem hialina que é utilizado como um molde sobre o qual o osso é formado. Entretanto a cartilagem não se transforma em tecido ósseo. Por sua vez, um colar ósseo subperióstico é formado (através de ossificação intramembranosa) ao redor da região mediana da diáfise do modelo cartilaginoso. Este colar ósseo aumenta em espessura e comprimento. Os condrócitos no centro do molde cartilaginoso hipertrofiam e reabsorvem um pouco de sua matriz, aumentando suas lacunas de modo que se tornem confluentes. Os condrócitos hipertrofiados, subsequentemente à assistência ao processo de calcificação da cartilagem, degeneram e morrem. Os espaços recém-formados são invadidos pelo broto periosteal (composto de vasos sanguíneos, células mesenquimais e células osteoprogenitoras). As células osteoprogenitoras se diferenciam em osteoblastos, e estas células produzem uma matriz orgânica óssea por sobre a cartilagem calcificada. À medida que o colar ósseo subperióstico aumenta em espessura e comprimento, os osteoclastos reabsorvem o complexo formado pela cartilagem calcificada e pelo tecido ósseo recém formado e calcificado, deixando um espaço aumentado, o futuro canal medular (o qual será povoado por células da medula óssea). Todo o processo de calcificação ocorre a partir deste centro primário de ossificação, e pelo tecido ósseo, formando a diáfise de um osso longo. A formação das epífises ósseas (centros secundários de ossificação) ocorre de uma maneira modificada, de modo a haver a manutenção de uma cobertura de cartilagem na superfície articular. O crescimento em comprimento de um osso longo é devido à presença dos discos epifisários de cartilagem hialina, localizados entre as epífises e a diáfise²².

O tecido ósseo é o único tecido com capacidade de crescimento e de remodelação por meio de reabsorção e neoformação. Durante o crescimento, ocorre modificação da estrutura anatômica do osso, fortalecendo regiões mais requisitadas (que suportam maiores tensões e estão sujeitas à sobrecarga de peso) e que requerem maior resistência. O tecido ósseo permite a renovação de 5-15% da massa óssea total por ano sob condições normais, atingindo seu auge entre 30 e 40 anos, quando se estabelece o equilíbrio entre as taxas de reabsorção e neoformação, observando-se, a partir daí, predomínio progressivo da reabsorção óssea. Entre os fatores locais, fatores de crescimento e citocinas, as proteínas da matriz óssea também atuam como moduladores da remodelação. Os fatores de crescimento são polipeptídeos produzidos pelas próprias células ósseas ou tecidos extra-ósseos, que atuam como moduladores das funções celulares, principalmente crescimento, diferenciação e proliferação. Os principais fatores de crescimento atuantes no tecido ósseo são IGF- I e II (Insulin-like growth factor I e II-

somatomedina), TGF- β (fator de transformação do crescimento β), BMP (proteína morfogenética óssea), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), FGF (fator de crescimento fibroblástico) e VEGF (fator de crescimento endotelial vascular). Pela remodelação, o tecido ósseo pode ainda controlar a homeostase mineral, juntamente com os rins e os intestinos^{21,23}.

2.1.3) Inflamação/reparação

A produção de um defeito ósseo, como a preparação de um leito receptor para a inserção de um implante, implica na promoção de um trauma local, com a instalação de um processo inflamatório. Este processo divide-se em duas fases: a inflamação propriamente dita e o processo de reparo, que se inicia junto à inflamação, porém estendendo-se muito além do término desta²⁴.

A inflamação é uma resposta protetora direcionada a eliminar a causa inicial da lesão, patógenos infecciosos e tecidos lesados, bem como as células e tecidos necróticos que resultam do insulto original. A inflamação realiza sua função protetora diluindo, destruindo ou neutralizando os agentes nocivos, como os micróbios e toxinas, através da reação dos tecidos vascularizados, caracterizada pela saída de líquidos e células do sangue para o interstício^{21,25}.

A implantação cirúrgica de dispositivos produzidos com biomateriais é, por si só, suficiente para gerar um processo inflamatório, já que o trauma da incisão pode necrosar células. As propriedades físicas e químicas dos biomateriais, assim como a topografia e a forma do material na interface com os tecidos influenciam no tipo, na intensidade e na duração da resposta inflamatória²⁶.

Quanto maior a duração do processo inflamatório, menor a possibilidade de regeneração. A presença de infecção e/ou de corpo estranho diminui as chances de regeneração e inclusive complica a cicatrização²⁶. Quando o processo inflamatório torna-se exacerbado, ocorre uma produção excessiva de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio decorrente do brusco aumento do metabolismo celular, o que aumenta o estresse oxidativo dos tecidos circunvizinhos e pode acarretar em uma série de eventos biológicos indesejáveis e retardadores no processo cicatricial e/ou reparador, podendo até mesmo comprometê-los²⁶.

A reparação do defeito ósseo supracortical é semelhante aos padrões do crescimento ósseo intramembranoso e seu desenvolvimento ocorre através da sequência de remodelação. Sob condições mecânicas estáveis, o osso é formado direta ou

primariamente, dado que duas condições essenciais estejam presentes: um suprimento sanguíneo amplo e uma base sólida para a deposição óssea²⁷⁻²⁹.

Após a organização inicial do coágulo, no espaço supracortical mantido pela barreira, a regeneração se inicia com a diferenciação das células osteoprogenitoras, presentes no coágulo, em osteoblastos, que depositam matriz osteóide. Secundariamente, a rede de osso imaturo (rede esponjosa primária) é gradualmente reforçada por osso lamelar de fibras paralelas depositadas concetricamente, se iniciando nas proximidades das paredes mesial e distal do defeito, como uma continuação do córtex original. O final deste processo ocorre quando os primeiros espaços intertrabeculares atingem o porte de canais corticais regulares, e em conjunto com as lamelas concêntricas circundantes, constituem os ósteons (ou ostenas) primários. O início da remodelação óssea ocorre com a formação de ósteons secundários, no osso recentemente formado, fechando a margem do defeito²⁷⁻²⁹.

2.2) Biomateriais

Em 1987, durante a conferência de biomateriais na Europa (*Consensus Conference on Definitions in Biomaterials Science of the European Society for Biomaterials*), o termo biomaterial foi definido como “um material não vivo, utilizado como dispositivo médico, projetado para interagir com sistemas biológicos”. Posteriormente, esta definição foi considerada insuficiente, pois restringia-se a materiais não vivos, sendo o termo redefinido como “todo material destinado a interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar, reforçar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do organismo”³⁰.

Atualmente, a utilização dos biomateriais abrange áreas, como engenharia de tecidos e terapia celular, necessitando de uma nova redefinição do termo biomaterial, como sendo “toda substância projetada para assumir uma forma que, por si só ou como parte de um sistema complexo, é utilizada para direcionar, através do controle das interações com os componentes dos sistemas vivos, o percurso de qualquer procedimento de diagnóstico ou terapêutico, no ser humano ou na Medicina Veterinária”³⁰.

O material a ser utilizado na área médica e odontológica deve desempenhar a função a que se destina e ser aceito pelo corpo do hospedeiro, isto é, ser biofuncional e biocompatível. A biofuncionalidade refere-se ao desempenho da função desejada através de propriedades específicas do material, como a transmissão de cargas, distribuição de tensões, preenchimento de cavidades, guia para regeneração de tecidos, entre outras^{3,31}.

A biocompatibilidade é a capacidade de um material funcionar com uma resposta apropriada do hospedeiro em uma aplicação específica, ou melhor, refere-se a capacidade de um material em desempenhar a sua função de maneira desejada, no que diz respeito a uma terapia médica, sem induzir quaisquer efeitos locais ou sistêmicos indesejáveis no destinatário ou no beneficiário da terapia, mas gerando a resposta celular ou tecidual mais adequada e benéfica, nessa situação específica, e otimizando o desempenho clinicamente relevante desta terapia³².

Nenhum material é realmente inerte, uma vez que todo material implantado em tecidos vivos causam uma resposta do organismo. Assim, os biomateriais podem ser classificados segundo o comportamento fisiológico, baseado na resposta do tecido hospedeiro²⁶.

Os materiais bioinertes, que apropriadamente deveriam ser considerados quase inertes, não liberam nenhum tipo de componente ou liberam uma quantidade mínima, sendo considerados estáveis, mantendo suas propriedades físicas e mecânicas durante a vida útil do implante clínico. Pode ocorrer a formação de uma camada fibrosa extremamente fina, praticamente inexistente, sendo estes biomateriais utilizados tanto em funções de revestimento como de sustentação mecânica. Nesta categoria encontram-se óxidos, como: zircônia, titânia, alumina e materiais carbonosos, além do titânio^{3,31,33}.

Os materiais biotoleráveis são aqueles tolerados pelo organismo, ou seja, em sua presença, há a formação de uma camada de tecido fibroso ao seu redor. Esta camada é induzida por meio da liberação de compostos químicos, íons, produtos de corrosão e outros, por parte do material implantado. De acordo com a espessura desta camada é definida a toxicidade do material ao tecido. Esses materiais são utilizados em função das propriedades mecânicas de sustentação. Exemplos destes são praticamente todos os polímeros sintéticos e a grande maioria dos metais, como o aço inoxidável, ligas de cobalto-cromo e ligas de titânio^{3,33}.

Os materiais chamados bioativos promovem ligações de natureza química entre o material e o tecido ósseo, em função da similaridade química entre estes materiais e a parte mineral óssea, ocorrendo uma osteocondução^{3,33}.

O conceito de osteocondução pode ser caracterizada por um processo de crescimento ósseo na superfície do material ou internamente, em seus poros, canais ou tubos, com invasão de vasos sanguíneos, de tecidos perivasculares e de células osteoprogenitoras do sítio receptor para o biomaterial. Na osteocondução, o biomaterial funciona como uma matriz física ou arcabouço para deposição de novo osso oriundo das imediações.^{28,34}

Os biomateriais de superfície ativa são propensos ao crescimento de cristais de apatita carbonatada na superfície, a partir de fluidos corpóreos. A atividade biológica da maioria desses materiais cerâmicos bioativos está relacionada com a sua capacidade de promover a formação de cristais de apatita carbonatada análogos ao mineral ósseo e também associações específicas a proteínas ósseas, sendo o ponto inicial para a reconstrução do tecido. Exemplos de materiais bioativos: hidroxiapatita, biovidros e vitrocerâmicas^{3,33}.

Quando os materiais, após certo período de tempo em contato com o tecido, são degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo, são chamados de biorreabsorvíveis. Estes materiais são de extremo interesse em aplicações em que não é desejável outra intervenção cirúrgica, tal como na engenharia tecidual, pois estes materiais implantados são absorvidos e transformados naturalmente em novo tecido ósseo. São materiais como a poli(e-caprolactona), o beta-fosfato tricálcico (β -TCP), o alfa fosfato tricálcico (α -TCP)^{3,33}.

As características dos materiais reabsorvíveis e bioativos, como as biocerâmicas, possibilitam preenchimento das cavidades ósseas, servindo de suporte e condutor ósseo^{3,31}.

2.2.1) Biocerâmicas

O termo “cerâmica” vem da palavra grega *keramikos*, que significa “matéria-prima queimada”, indicando que, as propriedades desejáveis desses materiais são, normalmente, atingidas através de um processo de tratamento térmico a alta temperatura³⁵. As cerâmicas desenvolvidas para reparar ou reconstruir partes do corpo humano, enfermas ou destruídas, são chamadas de biocerâmicas³⁶.

As biocerâmicas podem ser classificadas de acordo com a adesão tecidual, que está diretamente relacionada com o tipo de resposta tecidual na interface do implante³⁶. (Tab. 1)

Tabela 1: Tipos de biocerâmica, adesão tecidual e classificação^{1,33}.

Tipo de biocerâmica	Característica da biocerâmica	Adesão com o tecido	Exemplo
Bio Inerte	Densa	Fixação morfológica	Alumina densa
Macro Porosa	Poros > 100 µm	Fixação biológica, com crescimento tecidual dentro dos poros	Alumina porosa
Bioativa	Densa ou porosa	Fixação bioativa	Biovidro, vitrocerâmicas, HA
Biorreabsorvível	Densa ou porosa	Substituição por tecido ósseo	Sulfato de cálcio, Fosfato tricálcico

Nos materiais bioinertes, a adesão tecidual ocorre através do crescimento ósseo na superfície irregular do material, formando um tecido fibroso fino entre o biomaterial e o tecido, se houver movimentação entre estes, o tecido fibroso formado é espesso, podendo ocorrer falha na fixação do implante. Os materiais bioinertes mais utilizados são a alumina, a zircônia e o carbono. A alumina tem sido utilizada na cirurgia ortopédica, como por exemplo em cabeças de fêmur em implantes de quadril, pela sua excelente resistência à corrosão, boa biocompatibilidade e resistência à compressão, diminuindo o coeficiente de atrito e desgaste entre os materiais^{3,36,37}.

O mecanismo de adesão das cerâmicas porosas é o crescimento de tecido na superfície interna dos poros e na superfície do implante. Uma limitação destas biocerâmicas é que, para o tecido permanecer viável e saudável, é necessário que os poros possuam dimensões entre 50 a 150 µm, para prover suprimento sanguíneo para o crescimento de tecido. Porém, quanto maior a porosidade, menor a resistência do material. Consequentemente, estes materiais são bem utilizados em recobrimentos metálicos ou como preenchimentos em regiões sem sobrecarga ou como arcabouço para formação óssea, em áreas sem solicitação mecânica^{1,36,38}.

Os materiais bioativos produzem uma resposta biológica específica na interface do material, resultando na ligação química entre tecido e material, ocorrendo uma fixação bioativa, como na hidroxiapatita, sendo utilizados em cirurgia vertebral, substituição do ouvido médio, reparo de defeitos periodontais^{1,36,38}.

Os materiais biorreabsorvíveis são projetados para serem degradados gradualmente durante um período de tempo e substituídos pelo tecido hospedeiro

natural. Para um bom desempenho deste biomaterial, devem ser respeitadas as condições de manutenção da força e estabilidade da interface durante o período de degradação e substituição pelo tecido hospedeiro, combinando o nível de reabsorção do material com o nível de reparação do tecido. Os materiais biorreabsorvíveis devem ser constituídos por substâncias metabolicamente aceitáveis³⁸. Cerâmicas de fosfatos de cálcio, como o β -TCP, têm demonstrado resultados satisfatórios na substituição de tecidos duros quando aplicados em regiões de baixa tensão ao material¹.

Os ossos e os componentes substitutos devem suportar forças que se originem de fora do corpo e que resultem de ações musculares, como as forças de mastigação. Essas forças são de natureza complexa e variam ao longo do tempo em termos de magnitude, direção e taxa de aplicação. Dessa forma, as características mecânicas, como o módulo de elasticidade (ou de Young), limite de resistência à compressão, tenacidade à fratura, são propriedades importantes dos materiais. Por exemplo, o módulo de elasticidade do material a ser implantado deve ser compatível com aquele exibido pelo osso; uma diferença significativa pode levar a uma deterioração do tecido ósseo ao redor do implante³⁵. Algumas propriedades mecânicas das cerâmicas de HA e β -TCP, comparadas ao tecido ósseo são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2- Propriedades mecânicas de biocerâmicas comparativamente aos ossos cortical e esponjoso²⁶.

PROPRIEDADE	OSSO CORTICAL	OSSO ESPONJOSO	HA SINTERIZADA (>99,2%)	β-TCP SINTERIZADO (>99,7%)
Densidade (g/cm ³)	1,6- 2,1		3,16	3,07
Resistência à compressão (MPa)	100- 230	2- 12	500- 1000	140- 154
Resistência à flexão (MPa)	50- 150		115- 200	33- 90
Módulo de elasticidade (GPa)	7- 30	0,05- 0,5	80- 110	
Tenacidade à fratura, (Mpa/m ²)	2- 12		1,0	

2.2.2) Cerâmicas à base de fosfato de cálcio

O interesse pela utilização das cerâmicas à base de fosfato de cálcio tem crescido principalmente nos últimos 20 anos, pelo fato de os íons cálcio e fosfato serem

os principais constituintes do osso e, assim, apresentarem características favoráveis como a biocompatibilidade³⁹.

O meio e as condições em que as cerâmicas à base de fosfato de cálcio são produzidas possuem alto grau de influência nas suas características físicas (área de superfície, tamanho dos cristais) e químicas (composição). A estabilidade termodinâmica das cerâmicas deve ser obtida, respeitando-se a temperatura de sinterização para cada cerâmica para não haver transformações de fases, de acordo com o diagrama de fases, e da presença de água, após o processo de obtenção ou no meio em que se encontram³⁸. (Fig. 2)

Figura 2- Diagrama de fase parcial do sistema CaO/ P_2O_5 em alta temperatura ($^{\circ}C$ no eixo vertical). Pressão de vapor de água= 500mm Hg. Área sombreada refere-se à faixa de processamento para produção de HA³⁸.

As cerâmicas de fosfatos de cálcio podem ser identificadas em calcificações normais ou patológicas em sistemas biológicos, despertando interesse significativo nas possibilidades de uso destas biocerâmicas, de acordo com a proporção entre Ca e P^1 , tabela 3:

Tabela 3: Fosfatos de cálcio e ocorrência em sistemas biológicos²⁶.

<u>Fosfatos de cálcio</u>	<u>Fórmula química</u>	<u>Razão</u> <u>Ca/ P</u>	<u>Ocorrência natural</u>
Apatita	$(Ca,Z)_{10}(PO_4Y)_6(OH,X)^{-2}$	Variável	Esmalte, dentina, osso, cálculo dentário, pedras comuns, cálculo urinário e calcificação de tecido cartilaginoso
Fosfato octacálcico, OCP	$Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5 H_2O$	1,33	Cálculo dentário e urinário
Hidrogenofosfato de cálcio diidratado, DCPD (brushita)	$CaHPO_4 \cdot 2 H_2O$	1,0	Cálculo dentário, condrocalcinose, cristalúria, ossos em decomposição
Fosfato tricálcico, β -TCP (whitlockita)	$Ca_3(PO_4)_2$	1,5	Cálculo dentário e urinário, cristais de saliva, cárie dentária, cartilagem de artrite, calcificação de tecido cartilaginoso
Fosfato de cálcio amorfo, ACP	$(Ca, Mg)_2(PO_4, Y')_2$	Variável	Calcificação de tecido cartilaginoso
Fosfato tetracálcico, TTCP	$Ca_4(PO_4)_2$		—
Hidroxiapatita, HA	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	1,67	—
Hidrogenofosfato de cálcio, DCP (monetita)	$CaHPO_4$	1,0	—

O material adequado deve manter o suporte biológico necessário durante o período de cicatrização, para ocorrer a proliferação de vasos sanguíneos, e a gradual substituição do material para a formação de tecido ósseo, ou, em outras condições clínicas, ser lentamente reabsorvido, ou não, para manter o volume para o crescimento ósseo e prevenir o colapso do tecido mole⁴⁰.

As cerâmicas à base de fosfatos de cálcio têm que se manter estáveis por um período suficiente para ocorrer o crescimento ósseo interno. Foi avaliada, em estudos comparativos, a reabsorção dos implantes *in vivo* em função da composição, sendo observado um comportamento de reabsorção da seguinte forma: $HA < \beta\text{-TCP} < \alpha\text{-TCP}$, embora esta tendência também seja influenciada pela densidade, distribuição de tamanho de poros, área de superfície específica e pH do meio⁴¹.

As cerâmicas de HA foram consideradas neste trabalho, para a confecção da cúpula, por manter a integração por períodos mais longos que cerâmicas à base de β -TCP⁴².

Dentre os biomateriais utilizados na Implantodontia, os cerâmicos apresentam-se como materiais com características muito interessantes para o metabolismo ósseo⁴³⁻⁴⁵. As cerâmicas à base de fosfatos de cálcio, como, hidroxiapatita e β -TCP, são materiais que apresentam qualidades desejáveis no processo de neoformação óssea como, por exemplo, a biocompatibilidade, bioatividade e a osteocondutividade^{43,44,46,47}. A osteocondutividade destes biomateriais permite adesão, proliferação, migração e ativação das células ósseas, ocorrendo neoformação óssea em aposição direta ao biomaterial^{10,48}. Estas propriedades se bem direcionadas podem gerar resultados benéficos para os pacientes, sendo assim, os materiais utilizados para este estudo.

2.2.3) Hidroxiapatita

A apatita é uma definição da estrutura química e não da composição. A apatita pode ter origem de minerais como constituintes de várias rochas ígneas e metamórficas, especialmente em calcários cristalinos, esqueletos de algumas espécies marinhas ou por precipitação direta da água do mar, através do carbonato de cálcio e fosfato de cálcio⁴⁹.

Cristalograficamente, a estrutura da apatita pertence ao sistema hexagonal, representada pela fórmula: $\text{Me}_{10}(\text{XO}_4)_6\text{Y}_2$, onde Me é um metal divalente (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} ...), XO_4 é um ânion trivalente (PO_4^{3-} , AsO_4^{3-} , VO_4^{3-} ...), e Y é um ânion monovalente (F^- , Cl^- , Br^- , I^- , OH^- ...). A palavra hidroxiapatita é formada pela junção das palavras hidroxi (referente ao grupo hidroxila) e apatita (nome mineral). A hidroxiapatita é um fosfato de cálcio hidratado, com fórmula química estequiométrica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, razão Ca/P igual a 1,67 e é o fosfato de cálcio mais estável de todos, em relação à biorreabsorção^{20,26}.

Devido à similaridade química, os tecidos calcificados (osso, esmalte dentário e dentina) são chamados de hidroxiapatitas biológicas. A HA biológica é o constituinte mineral natural encontrado no osso, representando 30 a 70% da massa dos ossos e dentes, e difere da HA pura na estequiometria (não é estequiométrica), na composição (pode conter traços de elementos inorgânicos), cristalinidade, e outras propriedades físicas e mecânicas. As HAs biológicas são, normalmente, deficientes em cálcio e substituídas por carbonato, sendo, portanto, mais indicado referenciá-las como apatita carbonatada ao invés de hidroxiapatitas biológicas^{33,39}.

A HA sintética é um dos materiais mais biocompatíveis, favorecendo o crescimento ósseo nos locais em que ela se encontra (osteocondutora), estabelecendo ligações de natureza química entre ela e o tecido ósseo (bioativa), permitindo a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas, as quais não a distinguem da superfície óssea. A superfície da hidroxiapatita permite a interação de ligações do tipo dipolo, fazendo com que moléculas de água e também proteínas e colágeno sejam adsorvidos na superfície, induzindo a regeneração tecidual²⁶.

Os biomateriais de superfície ativa, como a HA, são propensos à nucleação *in situ* e crescimento de cristais de apatita carbonatada na superfície, a partir de fluidos corpóreos. A formação de apatita carbonatada ocorre devido a bioatividade dos biomateriais e é importante no desenvolvimento da interface implante/tecido para os materiais. O mecanismo envolvido apresenta as etapas de: acidificação do meio, como uma consequência da interação celular com o material; dissolução de materiais à base de fosfatos de cálcio e formação de apatita carbonatada, associada a uma matriz orgânica. Esta matriz pode incorporar íons carbonato ou magnésio do fluido biológico, necessários à produção de uma matriz extracelular (proteína de colágeno e sem colágeno) e consequentemente à mineralização simultânea de fibrilas de colágeno e incorporação de cristais de hidroxiapatita carbonatada (HCA), recém-formados no remodelamento do novo osso. A fase HCA é equivalente em composição e estrutura à fase mineral óssea^{3,33}.

2.2.4) β -TCP

O TCP possui fórmula química $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, com razão Ca-P 1,5, morfologia romboédrica e duas formas: α e β . O α -TCP é produzido a altas temperaturas (acima de 1125°C) e o β -TCP a baixas temperaturas (abaixo de 1125°C)⁵⁰. O β -TCP é obtido por reações térmicas a 800-1000 °C, por sinterização do fosfato de cálcio amorfo ou pela sinterização da apatita, preparados sobre condições específicas, ou ainda por hidrólise^{33,42}.

A reabsorção ou biodegradação das cerâmicas de fosfatos de cálcio, de maneira geral, podem ser causadas por alguns fatores: 1) dissolução físico-química, que depende da solubilidade do produto e do pH local, podem ser formadas novas fases superficiais, como o fosfato de cálcio amorfo, fosfato dicálcico dihidratado, fosfato octacálcico; 2) desintegração física em pequenas partículas, como resultado de ataques químicos ao material; 3) fatores biológicos, como a fagocitose, que causa a diminuição na concentração local do pH^{1,3}. A degradação do β -TCP pode ser causada pela combinação da dissolução e reabsorção mediada por células multinucleadas⁵¹.

O β -TCP interfere no processo de ossificação por ser reabsorvido em ambiente fisiológico. O cálcio, liberado do TCP, é um mensageiro secundário para as células, interferindo na diferenciação celular na superfície de contato. Portanto, a dissolução parcial do TCP produz um aumento na concentração local de íons cálcio e fósforo com subsequente precipitação de cristais de apatita que faz a mineralização do colágeno mais facilmente, através da diferenciação de fibroblastos em osteoblastos⁵².

A osteogênese pode ocorrer por uma sequência de reações: 1) dissolução da cerâmica; 2) precipitação dos íons da solução sobre a cerâmica; 3) troca iônica; 4) deposição da fase mineral; 5) adesão celular; 6) proliferação; 7) diferenciação e 8) formação de matriz extracelular⁵². A osteogênese das cerâmicas biorreabsorvíveis é considerada diferente das cerâmicas bioativas, pois resulta da formação de “apatita semelhante ao osso”, via reação química com o fluido corpóreo⁵³.

Em estudo comparativo de formação óssea entre enxerto autógeno, heterógeno (osso bovino inorgânico) e β -TCP, em minipigs, Jensen *et al*⁴⁰ observaram que, houve maior formação óssea em defeitos preenchidos por osso autógeno, nas primeiras semanas. O osso bovino inorgânico apresentou menor formação óssea (42%) que o β -TCP (57%) ou enxerto autógeno (55%), na oitava semana. O β -TCP exibiu grande reabsorção durante o período de observação, sendo nas primeiras semanas com pouca formação óssea, porém na oitava semana ultrapassou o volume ósseo neoformado pelo enxerto autógeno, substituindo quase totalmente o defeito ósseo. Concluiu-se que o β -TCP pode ser bem utilizado como preenchimento de cavidades contidas, para promover a completa substituição por novo osso e prevenir o colapso inicial causado por tecido conjuntivo no interior do defeito.

2.2.5) Composto Vitamínico

Salles⁵⁴, em 2001, estudando o comportamento do polímero de poliuretana de mamona, para melhorar a osteointegração, adicionou ao polímero, uma série de microelementos funcionais, que foi denominado composto vitamínico, com o propósito de proteger e estimular o tecido e metabolismo local, para uma neoformação óssea organizada.

Tendo como base o peso absoluto de fosfato tricálcico, foram adicionados a este 15% de alfa tocoferol (Vitamina E), 10% de complexo B (25% de nicotinamida-vitamina B3, 12,5% de piridoxina- vitamina B6, 37,5% tiamina- vitamina B1, 6,25% riboflavina- vitamina B2, 12,5% pantotenato de cálcio- grupo prostético- coA e levedura de cerveja), 5% de carbonato de magnésio, 5% de sulfato de zinco, 15% de ácido

glutâmico. Este composto vitamínico foi desenvolvido para contribuir com o mecanismo de reparo tecidual, por ações sinérgicas ou individualizadas de cada elemento na proteção, estimulação e direcionamento do metabolismo local, com o objetivo de proporcionar um reparo mais rápido e organizado do tecido lesado, criando assim, um ambiente favorável à reparação do tecido e utilizando a própria maquinaria celular e extracelular que envolvem os processos de adaptação, reparo e inflamação⁵⁴.

Assim, Salles avaliou a resposta óssea pela instalação de implantes de titânio associados à poliuretana de mamona contendo o composto vitamínico, em cães. O polímero de poliuretana de mamona, sem o carbonato de cálcio, e com polimerização *in situ*, revelou-se um material não compatível com os tecidos periimplantares adjacentes. Tendo um alto índice de reatividade sistêmica negativa e um baixo nível de reabsorção, indicando sua elevada toxicidade ao tecido ósseo adjacente. Com a adição do composto vitamínico ao polímero de poliuretana de mamona as reações do tecido adjacente ao enxerto e implantes correspondentes se tornaram menos agressivas. Com isto, houve um aumento significativo da neoformação óssea local, principalmente na região supracortical, e uma diminuição da resposta inflamatória, com a utilização do composto vitamínico⁵⁴.

Allegrini²⁴ avaliou o efeito da BMPb (proteína morfogenética óssea bovina), do composto vitamínico e da hidroxiapatita quando inseridos em leito ósseo na tíbia de coelho. A BMPb e o composto foram utilizados em conjunto com HA e colágeno, comparados com esta mesma mistura e sem enxertia. Nesse estudo, a BMPb e o composto vitamínico não desencadearam efeitos positivos no processo de deposição óssea em comparação ao grupo de HA. O composto vitamínico não foi absorvido pelo organismo, permanecendo entre o osso e a hidroxiapatita.

Em 2007, Salles⁵⁵ estudou o estresse oxidativo agudo pós trauma cirúrgico, pela ativação de uma endonuclease sensível ao estresse, o fator nuclear kappa-beta (NF-kB), avaliada em cortical óssea de ratos Wistar. As causas do estresse oxidativo (ruptura do equilíbrio da oxidação-redução das células) pode ser divididas em duas classes: interna (inflamação, reações auto-imunes, problemas metabólicos, isquemia) e externa (organismos microbiológicos, radiação eletromagnética ou mecânica, ação térmica ou química), ocasionando falta de habilidade do organismo ou célula para se defender contra as espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio. O NF-kB é considerado um fator de estresse cuja ativação induz a produção de citocinas pró inflamatórias, a morte celular programada (apoptose) ou ainda a adaptação celular, também descrita como um dos fatores responsáveis pela osteoporose. O trauma cirúrgico desencadeia a ativação da NF-kB por toda a cortical óssea, não se limitando à região lesada. Como resultado, o

grupo composto vitamínico reduziu significativamente a imunorreatividade positiva do NF- κ B, indicando uma efetiva proteção do composto na manutenção do equilíbrio redox.

Beolchi⁵⁶, em 2009, estudou a regeneração óssea em fêmures de ratos através da implantação de implantes cerâmicos de β -TCP puro e de mistura de HA e β -TCP, na proporção de 60:40 em massa. A estes materiais cerâmicos, foi acrescentado o composto vitamínico, na proporção de 35% em relação à massa do material cerâmico, comparando a resposta óssea com os grupos sem composto. Neste estudo foram confirmadas a osteocondução e osteointegração dos implantes de β -TCP e da mistura HA/ β -TCP, sem observar a absorção, ou não, do composto vitamínico, além de observar que o composto vitamínico favoreceu uma melhor e maior regeneração do tecido ósseo pela diminuição da inflamação e diminuição da velocidade de reabsorção das cerâmicas, pela observação da quantidade e qualidade do tecido neoformado.

2.3) Regeneração Óssea Guiada

A regeneração óssea guiada (ROG) é um procedimento reconstrutivo dos defeitos ósseos alveolares anteriormente à inserção de implantes dentários ou associados a estes, que evoluiu a partir da técnica da regeneração tecidual guiada (RTG), que é descrita como o tratamento de defeitos ósseos em dentes naturais ⁵⁷.

O princípio biológico da ROG é baseado no conceito de seletividade celular, permitindo a neoformação óssea, através da utilização de uma membrana, como barreira mecânica à migração de células epiteliais, proteção quanto à estabilização do coágulo e à pressão exercida pelo retalho de tecido mole. Assim, há a criação de um espaço protegido, com alojamento para o coágulo sanguíneo que permite a migração de células osteoprogenitoras para dentro deste espaço, resultando em neoformação de tecido ósseo^{57,58}.

As características desejáveis para a barreira utilizada em ROG incluem biocompatibilidade, propriedades de oclusão para manter a seletividade celular, integração com o tecido hospedeiro, manuseabilidade clínica e mantenedor de espaço⁵⁹.

As membranas classicamente utilizadas na ROG são fabricadas a partir de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE), que é um material inerte e não-reabsorvível. Estas são colocadas entre o tecido conjuntivo gengival do retalho e o defeito ósseo alveolar⁶⁰. Um dos problemas da utilização das membranas de e-PTFE é a manutenção do espaço, pela não rigidez do material. Para a estabilização da barreira são utilizados parafusos de titânio, prendendo as bordas da membrana, ou também, internamente,

para, manter o espaço (Fig. 3). A estabilização da ferida é crítica, pois o movimento da membrana, durante a cicatrização, influencia diretamente na diferenciação celular^{58,60}.

Figura 3: Ilustração da técnica de ROG: a) Crista alveolar delgada; b) Técnica de ROG, com parafusos de fixação; c) Implante odontológico instalado⁵⁸.

Assim, para assegurar o volume desejado para neoformação óssea, outros tipos de membranas foram elaborados a partir de materiais diferentes. Alguns materiais biodegradáveis foram testados, como colágeno tipo I, poliuretano, ácidos polilático e poliglicólico, copolímeros, porém sem sucesso em relação ao controle do tempo de reabsorção dos materiais. Também foram testadas membranas de e-PTFE suportadas por armação de titânio, que são constituídas por duas partes: a parte interna, mais rígida, com porosidade limitada que permite a exclusão de células epiteliais e conjuntivas do processo de cicatrização óssea; e a externa, mais flexível, permitindo a adaptação ao defeito ósseo^{29,59,61}.

Em 2003, Steenberghe *et al* utilizaram uma barreira oclusiva de titânio, com 0,2 mm de espessura, 12 mm de diâmetro e 6 mm de altura, para estudar o crescimento ósseo em seu interior, em coelhos e em humanos. As barreiras foram fixadas por adesivo à base de cianoacrilato e preenchidas por coágulo. Foram utilizados 12 coelhos, sendo instaladas 18 barreiras de titânio em 9 coelhos, uma na porção anterior e outra na porção posterior da calvária, e 3 coelhos foram utilizados como controle. Em um coelho controle, foi utilizada uma barreira de metilmetacrilato, em outro, a barreira de titânio não foi fixada por adesivo à base de cianocrilato e no terceiro coelho, foi instalado um parafuso de titânio, no topo da barreira de titânio. Após 3 meses de cicatrização, o grupo da barreira de titânio foi avaliado em 32% e 17% de volume de tecido ósseo formado na região anterior e posterior, respectivamente, enquanto que, no grupo controle da barreira de

metilmetacrilato o volume ósseo foi de 5 e 2%, após 5 meses. Em relação ao coelho controle sem utilização de adesivo, houve formação de uma fenda entre o crânio e a barreira de titânio, e com crescimento ósseo limitado em seu interior. No coelho controle, com utilização de parafuso de titânio houve formação óssea favorecida pela “osteocondutividade” do material. Os autores alegam que o crescimento ósseo no interior da cúpula de titânio ocorre pela propriedade “osteocondutora” do material. Porém, como foi descrito anteriormente, o material utilizado é biotolerável. O estudo em humanos foi realizado em 10 pacientes, do Departamento de Periodontia, do Hospital da Universidade Católica de Leuven, para reabilitação oral, por meio de implantes e próteses, com edentulismo parcial ou total. As barreiras de titânio foram confeccionadas a partir de modelos das maxilas, obtidos por tomografia computadorizada e estereolitografia. Houve exposição prematura em 5 dos 10 pacientes, não sendo possível a instalação de implantes em 2 destes pacientes, pela pouca formação óssea. Após 9 a 17 meses, foram realizadas as cirurgias de remoção das barreiras, para a instalação de 39 implantes em 8 pacientes, sendo que 36 implantes mantiveram-se estáveis, após 8 meses de cicatrização⁶².

Almasri e Atalibi, em 2011, utilizaram 11 coelhos da raça Nova Zelândia para testar a eficácia de enxerto aloplástico sintético (HA/TCP) sob câmara biodegradável de PLA/PGA, para reconstrução óssea de defeito horizontal. A membrana de PLA/PGA foi preparada de acordo com as instruções do fabricante e moldada através de pressão contra um molde metálico. A câmara de membrana possuía as seguintes dimensões: 4.5 mm (C) × 4.5 mm (L) × 3.2 mm (A), e foram preenchidas com mistura de HA/TCP particulado, e fixadas por parafusos de titânio. Houve crescimento ósseo, com média de 20,7% de área com preenchimento de HA/TCP e média de 6,2% sem enxerto (controle). A desvantagem desta técnica é a não manutenção do espaço da câmara de PLA/PGA. 14 das 22 câmaras (64%) mantiveram a sua forma geométrica, enquanto que 8 das 22 câmaras entraram em colapso. Após 3 meses de cicatrização, todas as membranas foram parcialmente degradadas, porém houve manutenção do material de HA/TCP. Assim, os autores concluíram que, apesar do manuseio sensível e difícil preparação da câmara, sendo relativamente demorada (10 min por câmara), a utilização da membrana de PLA/PGA possui a vantagem de ser reabsorvida, não sendo necessária sua remoção para instalação do implante, como é o caso da cúpula de titânio, que durante este processo de remoção, pode ocorrer prejuízo ao osso neoformado⁶³.

A utilização da cúpula de hidroxiapatita, neste trabalho, para a ROG, tem como vantagens: 1) bioatividade e osteocondução da hidroxiapatita; 2) rigidez da cúpula,

mantendo o espaço para neoformação óssea; 3) possibilidade de manutenção da cúpula, para posterior instalação de implantes, sem necessidade de outra intervenção cirúrgica.

2.4) Adesivos à base de cianoacrilato

A utilização de adesivos à base de cianoacrilato, neste trabalho, foi idealizada para manutenção da estabilidade da cúpula para promoção da formação óssea. A variável perda de volume dos biomateriais é devido à sua reabsorção que pode ser agravada pela instabilidade do biomaterial ao leito receptor, e formação de material fibroso, portanto a fixação é de fundamental importância. Estes adesivos têm sido estudados por apresentarem propriedades como: 1) efeito bacteriostático; 2) efeito hemostático; 3) biodegradabilidade; 4) biocompatibilidade; 5) facilidade de manuseio ^{64,65}.

A adesão entre o osso e o adesivo pode ser promovida com a presença de um filme fino de sangue ou soro, pois os cianoacrilatos se polimerizam rapidamente, mesmo na presença de umidade, promovendo uma fixação adequada do biomaterial. Durante a polimerização, ocorre a formação de produtos como cianoacetato e formaldeído, através de reação exotérmica, que causam discreta inflamação local dos tecidos. Estes produtos são degradados com o tempo e podem induzir a neoformação óssea, através da resposta inflamatória, que atrai fatores de crescimento, como proteínas ósseas morfogenéticas. Assim, a reação inflamatória discreta pode ser benéfica para a reparação óssea, sendo comparável à reparação, fixação e densidade óssea obtidas em fixação rígida com parafusos ^{65,66}.

Apesar de o cianoacrilato (Super Bonder®) não ser indicado para fins médicos e odontológicos, é um material de fácil aplicação, de fácil disponibilidade no mercado brasileiro e possui grande força adesiva (maior que colas cirúrgicas) e com menor tempo de cura (aproximadamente 1 minuto sendo que colas cirúrgicas demoram aproximadamente 10 minutos) ⁶⁶. Foi observada maior neoformação óssea em comparação à fixação realizada por cola cirúrgica (Histoacryl®- B.Braun- Alemanha), devido à melhor força adesiva, estabilidade mais adequada ao enxerto, e consequentemente promovendo neoformação óssea mais precoce, e por possuir degradação mais rápida, devido à menor cadeia éster, promove maior penetração de tecido conjuntivo nos períodos iniciais, ocorrendo diferenciação celular mais rápida ⁶⁴.

OBJETIVOS

Neste tópico são apresentadas as propostas da tese, que configuram o objetivo principal, descrito a seguir.

3) OBJETIVOS

Um dos objetivos deste trabalho é desenvolver e caracterizar corpos de provas na forma de cúpula oca de hidroxiapatita e a proposta principal é a utilização das cúpulas desenvolvidas para avaliação da capacidade de neoformação óssea. Estas foram preenchidas por coágulo, material particulado de β -TCP ou um composto vitamínico, e os testes *in vivo* realizados acima da cortical da tíbia de coelhos, o que deve permitir:

- A) Observar o desempenho da cúpula oca de hidroxiapatita, como arcabouço para neoformação óssea, através da manutenção de espaço preenchido por coágulo, β -TCP ou um composto vitamínico, e da fixação à tíbia de coelho, durante o período de cicatrização;
- B) Analisar com o auxílio da histomorfometria, a neoformação óssea no interior da cúpula de hidroxiapatita, com os diferentes preenchimentos;
- C) Observar os tempos de maturação óssea durante o período de cicatrização através de marcadores celulares e microscopia de fluorescência.
- D) Observar os elementos presentes no interior das cúpulas, após o tempo de cicatrização determinado, com o auxílio da microscopia em campo claro e da técnica de EDS-MEV.

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são descritas as metodologias utilizadas para a caracterização físico-química das matérias primas e do material desenvolvido, a obtenção dos corpos de prova, o ensaio *in vitro* e *in vivo*, o preparo das amostras para análise em microscopia de fluorescência e microscopia de luz, para alcançar os objetivos propostos neste estudo.

4) MATERIAIS E MÉTODOS

4.1) Caracterização

O processo e as condições em que os materiais são sintetizados podem influenciar nas características físicas e químicas, como área superficial, cristalinidade e pureza, afetando as condições de processamento e uso³⁹. A sinterização é um processo térmico, no qual ocorre a progressiva transição do estado de aglomeração das partículas em simples justaposição, para uma unidade com a união de umas às outras e formação de um corpo rígido. Durante o processo ocorrem modificações como: diminuição da área de superfície, redução do volume da amostra, aumento das fases cristalinas e aumento das propriedades mecânicas.⁴⁹ A utilização de análises, como, difração de raios-X e microscopia eletrônica de varredura, são importantes para se determinar as características físicas e químicas da matéria-prima e se estas foram mantidas durante o processamento do material.

4.1.1) Difração de raios X

A Difração de raios X é um método de análise das propriedades cristalográficas do material, que fornece as seguintes informações: 1) identidade: cada composição e estrutura cristalina possui uma identidade própria, isto é, os picos de difração, correspondem aos específicos ângulos de difração, que são únicos para cada composição e estrutura, mesmo em casos de materiais com a mesma fórmula química; 2) pureza: se o composto consiste de uma ou mais fases; 3) cristalinidade: tamanho dos cristais ou ausência de deformação/ tensão no cristal, aparecem como alargamento dos picos de difração^{26,42}.

As amostras dos pós de hidroxiapatita e de β -TCP, da cúpula de hidroxiapatita sinterizada e do composto vitamínico foram submetidas à difração de raios X (Rigaku DMAX 2200, radiação Cu-K α = 1,5418 Å, 40 kV, 20 mA, adotando faixa de varredura (2θ) de 5° a 50°, com velocidade de 2°/min) para determinação das fases cristalinas presentes, os difratogramas foram comparados com os padrões da JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards, 2003).

4.1.2) Microscopia Eletrônica de Varredura

A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) permite a obtenção de imagens ampliadas da amostra a partir da interação de um feixe de elétrons com o material, desde que este não seja transparente aos elétrons²⁶. Permite observar a morfologia do material particulado (tamanho e formato) e da superfície do material⁴².

O MEV fornece rapidamente informações sobre a morfologia e topografia da amostra sólida, possibilitando visualizar imagens com riqueza de detalhes e precisão para medição e tamanho de partícula, e imagens com aparência tridimensional, resultado direto de grande profundidade de campo⁶⁷.

Foram observados pós de hidroxiapatita e de β -TCP, e a morfologia de superfície de fratura da cúpula de hidroxiapatita, em equipamento JSM-6701F, com campo de emissão de 1 kV, em alto vácuo, com elétrons secundários e retroespalhados.

4.2) Caracterização das matérias-primas

A caracterização físico-química dos pós de hidroxiapatita (cód. 20-2039, Strem Chemicals) e de β -TCP (cód. 21218, Fluka Chemika) e do composto vitamínico foram realizadas por difração de raios X. Os pós foram analisados por microscopia eletrônica de varredura e foram realizados testes de citotoxicidade nas amostras do pó de β -TCP e do composto vitamínico.

4.3) Obtenção dos corpos de prova

A confecção da cúpula de hidroxiapatita foi realizada por prensagem isostática, 200 MPa, utilizando-se molde de borracha de silicone, que possui resistência a altas temperaturas (Silicones Paulista ®) e parte em aço inoxidável. A pressão é aplicada por um fluido, isostaticamente³⁵. Os corpos compactados foram sinterizados ao ar a 1100 °C, por 60 minutos.

As cúpulas possuem as seguintes dimensões finais: diâmetro externo de 8mm, altura externa de 3mm, diâmetro interno de 4mm e altura interna de 2mm (Fig. 4). As cúpulas foram acondicionadas individualmente em invólucros próprios para esterilização e esterilizadas com uma dose de 25kGy por meio de radiação gama (Co60, Gammacell modelo 220).

Figura 4: Esquema e dimensões da cúpula de hidróxiapatita utilizada nos experimentos in vivo

4.4) Caracterização do material sinterizado

A caracterização físico-química da cúpula de hidróxiapatita foi realizada por difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura, determinação da densidade e teste de citotoxicidade.

A determinação da densidade das amostras sinterizadas foi realizada pelo método de Arquimedes:

1. Imersão da amostra sinterizada em água destilada em ebulição, para preenchimento dos poros, durante aproximadamente uma hora. Após resfriamento pesagem em balança analítica;
2. Determinação da massa imersa;
3. Determinação da massa úmida- amostra não totalmente seca, isto é, com os poros preenchidos com água;
4. Determinação da massa seca, após secagem das amostras em estufa, a 120°C, por 12 horas.
5. Cálculo da densidade aparente através da fórmula:

$$Densidade\ aparente = \frac{massa\ seca}{massa\ úmida - massa\ imersa} \cdot densidade\ da\ água$$

4.5) Caracterização biológica

4.5.1) Teste de citotoxicidade- *ensaio in vitro*

Para a realização dos ensaios *in vivo* e *in vitro*, todas as amostras (particulado de β -TCP, composto vitamínico, cúpula de HA) foram esterilizadas por radiação gama, com uma dose de 25kGy (Co60, Gammacell modelo 220), para evitar possíveis contaminações cruzadas.

O teste de citotoxicidade pode ser uma avaliação qualitativa (observação de mudanças morfológicas das células) e/ou quantitativa (investigação de parâmetros celulares como a morte celular, inibição do crescimento, proliferação celular ou formação de colônias).

O teste de citotoxicidade *in vitro* foi realizado de acordo com a norma ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices- partes 5 e 12, no Centro de Biotecnologia- IPEN- sob orientação da Prof. Dra. Olga Zacuco Higa, este teste é necessário para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material *in vitro* com potencial para aplicações médicas^{68,69}.

A citotoxicidade foi avaliada por meio de metodologia quantitativa. O ensaio baseia-se na determinação de células viáveis após a exposição da população celular a diversas concentrações do extrato.

Foi utilizada cultura de células proveniente de uma linhagem de células de ovário de hamster chinês (CHO-k1), previamente selecionada através da formação de monocamada no fundo da placa, separadas pela proteína tripsina. Após a tripsinização, a suspensão foi centrifugada e lavada com solução salina estéril (PBS), sendo o precipitado colocado em suspensão novamente em meio RPMI (Gibco®) com 10% de soro fetal bovino. A contagem de células foi feita em câmara Neubauer para estabelecer uma concentração de células por mililitro na ordem de 100.000 cel/mL.

Na preparação dos extratos das amostras seguiu-se a proporção de 0,2 g de massa ou 1 cm² de área da amostra para 1mL de meio de cultura. O extrato foi obtido a partir da incubação das amostras em meio de cultura celular RPMI, a 37°C por 24 horas sob constante agitação, e posteriormente, filtrado e diluído, em cinco concentrações (100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%), para receber a suspensão de células e determinar a viabilidade celular. Para cada 1 mL do extrato diluído, foram adicionados 2 mL de solução RPMI.

Os testes foram feitos em quintuplicata em placas de cultura de 96 poços. As placas contendo as soluções da amostra com a suspensão celular foram incubadas por 24h em estufa de CO₂ a 37°C.

A análise da quantidade de células viáveis foi realizada por metodologia colorimétrica, pela incorporação de corante supravital e um agente acoplador de elétrons (MTS/PMS). Foram adicionados 20 µL de corante mais 80µL de meio de cultura em cada poço da placa, repetindo-se o processo de incubação por mais duas horas, para, então, realizar-se a leitura em espectrofotômetro a 490 nm. A quantidade de corante incorporada pela população celular é diretamente proporcional ao número de células viáveis em cultura, sendo determinada pela relação:

$$VC(\%) = \frac{DO \text{ amostra}}{DO \text{ controle}} \times 100$$

Onde, VC= viabilidade celular (%); DO amostra= densidade óptica da amostra; DO controle= densidade ótica do controle de células totais.

A relação entre a concentração do extrato e a quantidade de células viáveis resultou em uma curva dose-resposta, considerando o CI_{50%} um parâmetro utilizado para avaliação da citotoxicidade, que é a concentração do extrato que mata 50% das células expostas no teste (CI - Concentração Inibitória).

Para este teste foram utilizadas amostras de β-TCP na forma de pó, do composto vitamínico e amostras sinterizadas de hidroxiapatita, como controle positivo (citotóxico) solução fenol a 0,02%, e como controle negativo (não citotóxico) amostra de alumina.

4.5.2) Ensaios *in vivo*

Para o ensaio *in vivo* (Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) número 76/11- Anexo I) foram utilizadas 18 cúpulas de hidroxiapatita, divididas em três grupos. Grupo A, controle, no qual foi estimulada a formação de um coágulo na região de implantação da cúpula. Grupo B, as cúpulas receberam o composto vitamínico no seu interior, para avaliar a função de moderador do processo inflamatório e mediar de forma favorável a neoformação óssea. Grupo C, as cúpulas receberam preenchimento de β-TCP em forma de pó, material reabsorvível pelo organismo.

Nove coelhos adultos machos, da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*) foram designados como modelo animal neste estudo. A utilização de coelhos apresenta algumas vantagens como a facilidade de obtenção e manutenção em biotério adequado. A região de tíbia de coelhos apresenta a quantidade de tecido ósseo suficiente para a instalação da cúpula de hidroxiapatita. Os animais foram alocados no biotério do IPEN em gaiolas individuais apropriadas à temperatura constante de 21°C, isentos de estresse,

sob iluminação natural, através das janelas do biotério, tratados com dieta à base de ração seca e água fornecida *ad libitum*.

Antes do procedimento cirúrgico foram administradas via intramuscular, as seguintes drogas: Calmiun- Agener União– Cloridrato de xilazina 2%, sedativo analgésico e relaxante muscular em concentração de 5mg/kg; Ketamina Agener- Agener União – Cloridrato de Cetamina a 10%, anestésico dissociativo- em concentração de 20 mg/kg. Os coelhos são animais que se estressam com facilidade, sendo necessária a utilização de um tranquilizante ou sedativo, além de reduzir a dor e o desconforto dos animais, diminui a quantidade de agentes anestésicos utilizados, minimizando efeitos indesejáveis, como alteração da função cardiorespiratória. A técnica anestésica de associação de xilazina e cetamina é adequada para anestesia do coelho e bastante utilizada por ser de baixo custo, fácil administração e por manter um plano anestésico cirúrgico efetivo⁷⁰. Como anestésico local foi administrado nas áreas cirúrgicas Cloridrato de lidocaína (0,02g)-fenilefrina (0,0004g), com apresentação em tubetes de 1,8mL.

A região do joelho dos animais foi tricomizada e feita a antissepsia com gluconato de clorhexidina a 0,12% e iodopovidona. Em seguida, foi realizada incisão nos tecidos moles, com bisturi (Bard-Parker nº3) munido de lâmina 15, de forma retilínea em movimento único, paralelamente ao longo eixo da porção medial da tíbia. O descolamento do periósteo por meio de descolador de periósteo tipo “freer” teve como objetivo proporcionar o acesso e visão à área operatória (Fig. 5a).

Inicialmente, a cúpula foi posicionada para verificar sua localização e a fixação dos parafusos ortodônticos (Minimplant Orthofit H10- DSP Biomedical). Para promover um fluxo de sangue para a região interna da cúpula foi feita uma perfuração, através da superfície cortical óssea penetrando a cavidade medular⁷¹, por broca tipo “Lança” com diâmetro de 2,0 mm, acoplada a um contra-ângulo com redução de 16:1, com motor elétrico com velocidade de 1.500 rpm e 30 N/cm² de torque, sob constante irrigação (solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9%). A perfuração do osso cortical permite a migração de células angiogênicas e osteogênicas para o espaço a ser preenchido por novo osso, sendo importantes para o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos e indução de osteoblastos ativos para neoformação óssea e proliferação celular⁷¹. Em seguida, foram realizadas as perfurações para os parafusos ortodônticos, com broca cilíndrica com 1 mm de diâmetro (Fig. 5b). As cúpulas foram fixadas por cianoacrilato (Super bonder®- Loctite- Henkel Ltda.) reforçado pelos parafusos ortodônticos (Figs. 5c e 5d).

Figura 5: (a) Acesso à área operatória; (b) Parafuso ortodôntico instalado; (c) Fixação da cúpula com adesivo à base de cianocrilato reforçado por parafusos ortodônticos; (d) Visão da cúpula fixada

Após a instalação dos implantes, a sutura foi realizada com fios de sutura mononylon 4,0 e agulha 1,5 cm. Após a cirurgia, os animais foram medicados com antibiótico de amplo espectro- Pentabiótico ® Veterinário Reforçado (Fort Dodge Saúde Animal Ltda.), analgésico- Cloridrato de Tramadol (Tramal ® - Pfizer) e anti-inflamatório não- esteróide- Cetoprofeno (Profenid ® - Sanofi Aventis).

No decorrer das 8 semanas aguardadas para a cicatrização dos implantes, foram administrados, subcutaneamente, marcadores ósseos de união à apatita, com a finalidade de determinar os períodos de formação óssea. Para uma interpretação morfológica quantitativa, foi utilizada uma sequência de três marcadores com cores diferentes e em dose dupla, isto é, repetida a dose por duas semanas, para assegurar a diferenciação dos corantes⁷².

Os marcadores utilizados foram: alizarina (Labsynth produtos para laboratórios LTDA), calceína (Labsynth produtos para laboratórios LTDA) e tetraciclina (Cloridrato de oxitetraciclina – Terramicina- Pfizer) utilizando a sequência de marcadores detalhado na tabela 4⁷³⁻⁷⁶. Os marcadores celulares de polifluorcromo na forma de pó

(Alizarina e Calceína) foram pesados em balança de precisão e diluídos em soro fisiológico e solução tampão de Na_2HPO_4 , a tetraciclina utilizada- Terramicina® solução injetável- uso veterinário- Laboratórios Pfizer Ltda- é uma solução pronta.

Tabela 4: Formação, dosagem e tempo de aplicação dos marcadores celulares

Tempo	Marcador	Dose por kg de animal
<u>14 dias</u>	Alizarina	<u>30 mg/ kg + 20 mg Na_2HPO_4</u>
<u>21 dias</u>	Alizarina	<u>30 mg/kg + 20 mg Na_2HPO_4</u>
<u>28 dias</u>	Calceína	<u>10 mg/kg + 20 mg Na_2HPO_4</u>
<u>35 dias</u>	Calceína	<u>10 mg/kg + 20 mg Na_2HPO_4</u>
<u>42 dias</u>	Tetraciclina	<u>1,5 ml/kg + 20 mg Na_2HPO_4</u>
<u>49 dias</u>	Tetraciclina	<u>1,5 ml/kg + 20 mg Na_2HPO_4</u>
<u>56 dias</u>	Eutanásia	

O tempo de 8 semanas *in vivo* foi adotado, como comparativo ao tempo de reparação óssea em humanos que é de 24 semanas, uma vez que o metabolismo ósseo no coelho é, em média, três vezes superior ao da espécie humana¹⁸. Os animais foram sacrificados por meio de uma dose excessiva de Ketamina®, ~1mL/kg do animal. Os tecidos moles foram dissecados e blocos das tíbias, contendo os implantes, foram removidos, com o auxílio de serra manual, e mantidos imersos em solução neutra de formalina a 10% durante 48 horas, para fixação da peça.

A preparação do bloco, a microtomia, o acabamento e o polimento dos cortes foram realizados no Departamento de Anatomia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo- ICB-USP, no Laboratório de Tecidos Mineralizados. Após a fixação, as peças foram lavadas em água corrente por 12 horas e posteriormente, desidratadas em álcool 70°, por 24hs, e em três soluções de álcool 100°, sendo que na primeira solução foram mantidas por 24hs, na segunda, 48hs, e na terceira, 56hs. As peças foram desidratadas para melhor penetração da resina. A diafanização foi realizada por imersão das peças em xilol por 24hs, sendo trocada a solução e permanecendo por mais 48 horas. As peças foram incluídas em resina formulada com Diisobutilftalato- plastificante (Sigma-Aldrich Chemistry®), Metilmetacrilato (Sigma-Aldrich Chemistry®) e Peróxido de Benzoíla (Fluka Chemistry®). As peças foram imersas em solução preparada com 15% de Diisobutilftalato e 85% de Metilmetacrilato (solução A),

sendo separadas em frascos de vidro com tampa, de aproximadamente 20 mL, mantidas por 7 dias em geladeira. Após esse período, as peças foram mergulhadas por mais 7 dias, em solução A com acréscimo de 1% de Peróxido de Benzoíla e mantidas em geladeira. Enfim, as amostras foram mergulhadas em solução A acrescida de 5% de Peróxido de Benzoíla, por 3 a 5 dias, permanecendo em temperatura ambiente até a completa polimerização da resina. Concluída a polimerização, os recipientes de vidro foram quebrados e os blocos de resina obtidos foram reduzidos, com auxílio de uma serra, mantendo-se somente a parte ocupada pelo bloco de tíbia contendo a cúpula e os parafusos ortodônticos (Fig. 6).

Figura 6: Bloco de resina polimerizado, contendo o bloco de tíbia

A microtomia foi realizada, de acordo com os princípios de Donath e Breuner⁷⁷, utilizando micrótomo EXAKT BAN SYSTEM 300 CP, que possui uma fita de tungstênio, que permite efetuar os cortes dos blocos de resina com precisão (Fig. 7a). Foram efetuados cortes de aproximadamente 100 micrômetros de espessura que foram colados com éster de cianoacrilato em lâminas de acrílico incolor e transparente, de 2 mm de espessura. Os cortes foram realizados perpendicularmente ao longo eixo da tíbia, obtendo-se 5 a 7 secções da cúpula, sendo escolhido o corte mais central para análise histomorfométrica (Fig. 7b).

Figura 7:(a) Micrótomo Exact Ban system 300, cortando o bloco de resina; (b) Posicionamento do bloco de resina, com cortes perpendicular ao longo eixo da tíbia

As secções foram afinadas e polidas por meio de lixas abrasivas de carbeto de silício, nas granulações de 320, 600, 2400 e 4000, utilizadas nas máquinas politriz metalográficas MOD. DP-IO e EXAKT APPARATEBAU GM B4- 400CS. Concluídos estes procedimentos, as lâminas foram analisadas em microscópio de luz fluorescente.

4.6) Microscopia de fluorescência

O uso de fluorocromo em pesquisas de tecido ósseo é uma técnica bem aceita e utilizada para o estudo da formação óssea e da dinâmica do remodelamento ósseo. Os marcadores de fluorocromo permitem a determinação cronológica e da localização da mineralização e a direção e a velocidade da formação óssea⁷⁸.

O microscópio de fluorescência transmite um cone de luz de excitação que passa através dos filtros, por espelho dicróico específico e da lente objetiva padrão até a amostra. A luz é parcialmente absorvida ou refletida pela amostra. É necessário escolher o filtro de luz apropriado para observar a luz fluorescente emitida por cada marcador⁷⁸.

Os marcadores de fluorocromo ligam-se aos íons cálcio, incorporando sítios de mineralização na forma de cristais de hidroxiapatita, a íons de hidrogênio ou outras moléculas de interesse⁷⁹. Isto significa que os marcadores podem indicar sítios de mineralização no espécime estudado, como sítios de formação óssea, deposição de dentina e cartilagem hipertrófica⁷⁸.

As lâminas foram analisadas no Departamento de Neuroanatomia (ICB-USP), em Microscópio Nikon- Eclipse- E1000, com câmera Nikon DXM 1200F, com filtros monocromáticos UV-2E/C(DAPI) para marcador tetraciclina (AZUL), B-2E/C (FITC) para marcador calceína (VERDE), sem filtro para marcador alizarina (VERMELHO) e filtro double (F-R) FITC, TRITC para verificar a sobreposição dos marcadores e área total.

As imagens captadas foram analisadas no programa Image Pro- Plus 5.1, Media Cybernetics, por medição da área de neoformação óssea e da área de cada marcador. A quantificação da área de neoformação óssea foi realizada em micrografias digitalizadas, permitindo selecionar de maneira distinta os três marcadores teciduais utilizados por meio da diferença da intensidade de pixels que dão origem à imagem, na qual estes são contados e medidos por área. O processo tem início com a calibração do programa com o uso de uma régua milimetrada para a objetiva utilizada, com aumento de 4 vezes. Foi atribuída uma classe de cor correspondente a cada marcador: alizarina, classe cor vermelha, calceína, classe cor verde e tetraciclina, classe cor amarela. Essas classes são associadas às colorações dos marcadores teciduais obtidos nas micrografias, criando uma graduação de cores. A área da cúpula estudada foi dividida em regiões, sendo: região 1 (R1) e região (R3) as regiões da base da cúpula do lado direito e esquerdo, e a região 2 (R2), a região da abóbada da cúpula. (Fig 8).

Figura 8: Esquema das regiões da cúpula, divididas para análise de microscopia de fluorescência

Foram selecionadas e delimitadas as áreas a serem quantificadas e estas foram associadas às classes definidas previamente. Desta maneira, a área de cada marcador foi quantificada pela porcentagem de área neoformada, de acordo com a área delimitada. Os valores foram somados, obtendo-se a média para cada preenchimento (coágulo, composto vitamínico e β -TCP) e para cada marcador (alizarina, calceína e tetraciclina), assim como o desvio-padrão. Os dados foram comparados em cada parâmetro com o uso da ANOVA (*one way analysis of variance*- Bioestat 5.0®), com os resultados submetidos ao teste de Tukey, com nível de significância de $p \leq 0,05$, identificando diferenças entre as médias das amostras.

4.7) Microscopia de campo claro

Após a análise por Microscopia de luz fluorescente, as lâminas foram coradas, utilizando-se o corante azul de toluidina ou Stevenel's blue, para o estudo da interface do tecido ósseo e hidroxiapatita e neoformação óssea no interior da cúpula de hidroxiapatita.

O corante de azul de toluidina é um corante acidofílico metacromático que cora seletivamente os componentes ácidos dos tecidos (sulfatos, carboxilatos e radicais fosfatos).⁸⁰ A metacromasia é a propriedade que certas moléculas tem de mudar a cor de certos corantes básicos. Neste caso, a estrutura contendo a molécula metacromática é corada de cor diferente (púrpura- vermelho) daquela do corante utilizado (azul)¹⁷. O azul de toluidina possui afinidade por ácidos nucleicos, e portanto se ligam ao material nuclear dos tecidos que possuem alto conteúdo de RNA e DNA.⁸⁰

As lâminas foram coradas por azul de toluidina, através dos seguintes passos: a) hidratação com álcool etílico absoluto ao álcool 70%, por dois minutos; b)

lavagem por dois minutos em água corrente; c) imersão por dois minutos em água oxigenada 10 volumes; d) lavagem por cinco minutos em água corrente; e) secagem em papel absorvente; f) imersão em solução aquosa de azul de toluidina a 0,5% por 20 a 30 minutos; g) lavagem em água destilada e secagem²⁴.

Stevenel's Blue é um método histológico desenvolvido para secções de tecido contendo implantes metálicos, pode ser bem utilizado em implantes cerâmicos e poliméricos, e possui boa evidenciação em tecidos mineralizados. As células e estruturas extracelulares são coradas em tons de graduação azul e as fibras colágenas, em azul esverdeado. A alizarina vermelha cora o cálcio, assim o tecido mineralizado aparece em tons de laranja a púrpura⁸¹.

O processo de coloração foi realizado da seguinte maneira: a) imersão das lâminas em cubeta contendo Stevenel's Blue (1g de Azul de metileno em 75 ml de solução de água +1,5g permanganato de potássio em 75 ml de solução de água destilada) a 60°C, em banho maria, por 15 min; b) lavagem em água destilada a 60°C; c) secagem com ar seco; d) imersão das lâminas em Van Gieson's (fucsina ácida 1% e ácido pícrico aquoso) em temperatura ambiente por 5 minutos; e) lavagem, de forma rápida, em álcool absoluto; f) secagem com ar seco; g) pipetagem de pequena quantidade de alizarina vermelha 2%, na superfície da lâmina de resina, por 5 minutos em temperatura ambiente; h) lavagem, de forma vigorosa, em água destilada corrente para remover o excesso de corante; i) secagem com ar seco.

As lâminas foram examinadas e fotografadas em microscópio de luz Nikon-Eclipse- E1000, com câmera Nikon DXM 1200F.

4.8) Espectroscopia de Energia Dispersiva em Microscópio Eletrônico de Varredura

A técnica de EDS- MEV (Espectroscopia de Energia Dispersiva) é um dos mais importantes instrumentos para a análise química de materiais orgânicos e inorgânicos. Através da identificação dos raios-X emitidos pela amostra, quando da interação desta com o feixe eletrônico, é possível determinar elementos químicos presentes em regiões com até 1 µm de diâmetro. É uma técnica não destrutiva, podendo determinar quantidades de até 1-2% dos elementos presentes na amostra. Os raios X que incidem no detector são convertidos em sinais que podem ser processados fornecendo um espectro de energia de raios X. Este espectro consiste de uma série de picos representativos do tipo e quantidade de cada elemento na amostra, assim, pode-se obter o mapa composicional da região em observação, permitindo que se correlacione a microscopia óptica ou eletrônica com informações microcomposicionais detalhadas. Na

técnica de EDS, os raios-X são distribuídos no espectro por ordem de sua energia e mais comumente do baixo número atômico (baixa energia) para elevado Z (alta energia).⁸²

Para a análise das lâminas, estas foram recobertas com uma fina camada de carbono, formando uma película condutora para escoar as cargas eletrostáticas provenientes da fonte de elétrons, permitindo analisar a composição da amostra, após o tempo de cicatrização.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos no decorrer da pesquisa, em relação às matérias-primas, ao material sinterizado, ao ensaio *in vitro* e *in vivo* e às análises das lâminas por microscopia de fluorescência e microscopia de luz. Os valores de áreas obtidos foram analisados estatisticamente, para melhor comprovação dos resultados.

5) RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1) Caracterização dos pós e do composto vitamínico

Os difratogramas de raios X, obtidos para os pós de partida hidroxiapatita e β -TCP, foram comparados com as fichas padrão, base de dados da JCPDS- IDCC 2003 (Joint Committee on Powder Diffraction International Centre for Diffraction Data), para avaliar a coexistência de fases secundárias, como o fosfato tricálcico, que pode estar presente em hidroxiapatitas comerciais, ou CaO e Ca(OH)_2 empregados para atingir a razão estequiométrica ideal de Ca/P no material, além de confirmar a presença das fases características destes materiais. Os difratogramas obtidos são apresentados na Figura 9 (a) e (b), sendo possível observar apenas os picos característicos da HA e β -TCP, respectivamente, correspondentes às fichas padrões ICDD: 9-0432 para HA e 70-2065 para β -TCP.

Figura 9: Difratogramas de raios X dos pós de partida (a) hidroxiapatita e (b) β -TCP, apresentando apenas as fases características dos materiais.

A amostra do composto vitamínico foi analisada por difração de raios X para identificar as fases cristalinas presentes. Como resultado, foram observados picos característicos de hidróxido de magnésio (ICDD: 07-0239) e fosfato tricálcico (ICDD: 03-0713), conforme figura 10.

Figura 10: Difratoograma de raios X do composto vitamínico, apresentando picos característicos de hidróxido de magnésio e fosfato tricálcico (β -TCP).

A hidroxiapatita apresenta morfologia esférica, superfície rugosa e presença de aglomerados, com partículas de dimensões entre 50-100 nm (Fig. 11a). As partículas de β TCP são maiores, $\sim 2 \mu\text{m}$, com geometria facetada (acicular), e superfícies mais lisas (Fig. 11b).

Figura 11: Micrografias dos materiais de partida (a) hidroxiapatita e (b) β -TCP.

5.2) Caracterização do material sinterizado

As cúpulas sinterizadas de hidroxiapatita foram caracterizadas por difração de raios X, figura 12, observando apenas os picos característicos da hidroxiapatita, padrão ICDD: 9-0432.

Figura 12: Difratoograma da cúpula de Hidroxiapatita sinterizada (HA) e o padrão da JCPDS- IDCC: 9-0432.

Não foram observadas fases secundárias nos materiais de partida, nem formação de novas fases durante o processamento, demonstrando boa estabilidade térmica das cerâmicas nas condições de sinterização.

As micrografias de superfície de fratura da cúpula de hidroxiapatita apresentam uma boa densificação do material, com poros distribuídos homogeneamente e com diâmetro da ordem de 1 μm , ou menores (Fig. 13). Apresentam porosidade fechada, característica comum de materiais que atingiram o último estágio de sinterização³.

Figura 13: Micrografia da amostra da superfície de fratura da HA sinterizada, com boa densificação e presença de poros (seta).

Os dados obtidos de densidade relativa, pelo método de Arquimedes, apresentam um valor médio de densidade de 2,99g/cm³, 95% da densidade teórica da hidroxiapatita, estando de acordo com a presença da quantidade de pequenos poros observada nas micrografias

Assim, pode-se concluir que a sinterização da hidroxiapatita (1100°C, 60 min) foi realizada dentro dos padrões, não alterando as propriedades do material, nem sua composição³. Podendo ser considerada cerâmica de alta densidade.⁴²

5.3) Teste de Citotoxicidade- ensaio *in vitro*

O teste de citotoxicidade *in vitro* foi realizado de acordo com a norma ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices- partes 5 e 12, sendo necessário para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material *in vitro* com potencial para aplicações médicas^{68,69}.

Para este teste foram utilizadas amostras: hidroxiapatita sinterizada, β -TCP na forma de pó e composto vitamínico, como controle positivo, solução fenol a 0,02%, e como controle negativo, amostra de alumina.

No teste de citotoxicidade, a porcentagem de viabilidade celular representa o Coeficiente de Variação Celular (CV) que indica a citotoxicidade da amostra. As curvas obtidas para cada amostra correlacionam o percentual médio de células vivas em função da concentração dos extratos.

A concentração inibitória, IC50, representa a concentração inibitória do crescimento e formação de colônias, indicando o grau de toxicidade da amostra. O controle positivo possui uma resposta citotóxica positiva, como é o caso da solução de fenol 0,5%, que apresenta IC 50 em aproximadamente 30% de viabilidade celular e a alumina (controle negativo) em aproximadamente 100%, indicando ausência de citotoxicidade.

Como resultado, a amostra de hidroxiapatita sinterizada mostrou-se não citotóxica, com viabilidade celular em aproximadamente 100%, como pode ser observado na representação gráfica dos dados de densidade óptica obtida. (Fig. 14)

Figura 14: Gráfico da viabilidade celular da amostra da cúpula de hidroxiapatita e dos controles positivo e negativo.

Com relação aos materiais de preenchimento, o extrato da amostra de β -TCP não apresenta coloração alterada em relação à do meio de cultura. Entretanto, o extrato do composto vitamínico apresenta alteração da coloração. Após este procedimento, foram adicionados 100 μ L da solução composta por 80% de meio de cultura com soro e 20% de solução de MTS/PMS (20:1). As placas foram incubadas por 2 horas e depois lidas em leitor de microplacas a 490nm. A Tabela 5 apresenta o pH inicial dos extratos antes das diluições (concentração de 100%).

Tabela 5: Valores de pH dos extratos com concentração de 100%.

Extratos	pH
Controle Positivo (Fenol 0,5%)	7,5
Controle Negativo (Alumina)	7,7
β -TCP	7,5
Composto Vitamínico	8,2

Pelos resultados representados no gráfico, Fig. 15, é observado um certo grau de citotoxicidade do composto vitamínico, a partir da concentração de aproximadamente 50% do extrato. Na amostra de β -TCP não se observa citotoxicidade.

Figura 15: Gráfico da viabilidade celular dos materiais utilizados como preenchimentos das cúpulas, β -TCP e composto vitamínico, e dos controles positivo e negativo.

5.4) Ensaio *in vivo*

As cirurgias foram realizadas conforme metodologia descrita, ocorrendo um pós-operatório com alguma dificuldade na cicatrização inicial, devido a ruptura de suturas, em algumas feridas, com presença de sangramento e edema.

Para que não ocorresse infecção da ferida e para diminuir o desconforto dos animais, foram aplicadas doses de Pentabiótico ® Veterinário Reforçado (Fort Dodge Saúde Animal Ltda.), Cloridrato de Tramadol (Tramal ® - Pfizer) e cetoprofeno (Profenid ® - Sanofi Aventis). As medicações foram aplicadas em todos os espécimes para evitar falsos resultados. Foram também realizados curativos nas feridas, com lavagem com soro e pomada Nebacetin ®- sulfato de neomicina 5 mg/g, bacitracina 250 UI/ g- Nycomed Pharma Ltda.

A cicatrização das feridas ocorreu por segunda intenção (cicatrização de fechamento secundário, pela não aproximação das bordas da ferida) após, aproximadamente 10 dias.

Durante o período do experimento, os coelhos foram mantidos em gaiolas individuais, em temperatura constante de 21°C. Os animais não apresentaram nenhum trauma físico, aumentando o peso em 1 a 1,250 kg, até o final do experimento, denotando manutenção de boa saúde sistêmica. Após o período estabelecido de 56 dias, foi realizada a eutanásia dos animais e obtenção dos blocos das tíbias, conforme metodologia já descrita.

Durante a coleta do material, as cúpulas apresentaram boa estabilidade, com ausência de mobilidade, e boa fixação ao tecido ósseo, com a utilização de parafusos ortodônticos, que se mantiveram estáveis, e cianocrilato, sem sinal de inflamação ou infecção. Macroscopicamente, a área onde foi realizada a osteotomia apresentou boa qualidade de cicatrização, sem diferenciação entre as amostras com preenchimento de coágulo (controle), β -TCP ou composto vitamínico.

Os tecidos adjacentes à cúpula apresentaram cicatrização com aspecto de normalidade, sem indício de infecção e/ou inflamação, inclusive, ocorrendo formação de tecido ósseo sobre a cúpula (indicada pela seta na vista lateral- Fig. 16b).

Figura 16: Bloco da tíbia contendo cúpula fixada por parafusos ortodônticos. Vista superior (a) e lateral(b), com formação óssea sobre a superfície da cúpula (seta).

5.5) Microscopia de Fluorescência

As lâminas obtidas foram observadas em microscópio de fluorescência para analisar os tempos de formação óssea, de acordo com deposição dos marcadores alizarina, calceína e tetraciclina, e quantificar o tecido neoformado, de acordo com a metodologia descrita anteriormente.

O fenômeno da fluorescência ocorre quando incide excitação eletromagnética no material. Os marcadores fluorescentes possuem espectros característicos exclusivos para absorção (ou excitação) e emissão de luz. Utilizando os filtros adequados, o marcador alizarina fluoresce em vermelho, a calceína em verde e a tetraciclina em azul, e com a utilização do filtro duplo, a alizarina fluoresce na cor marrom-avermelhado, a calceína em verde-azulado e a tetraciclina em bege- acinzentado⁵⁶(Fig. 17).

Figura 17: Microscopia de fluorescência, filtro duplo. Imagem da região da cúpula implantada (estrela) preenchida com β -TCP, demonstrando neoformação óssea em seu interior, através dos marcadores: alizarina (seta vermelha), calceína (seta amarela) e tetraciclina (seta branca).

Como resultado, pode-se observar diferentes padrões de área de marcação, referente aos preenchimentos utilizados na cúpula de hidroxiapatita, com diferentes áreas de fluorescência pela mudança de filtros.

As cúpulas preenchidas por coágulo apresentam neoformação óssea discreta em contato com a cúpula, observando-se o potencial osteocondutor da hidroxiapatita. (Fig. 18)

Figura 18: Imagens da região R2, da cúpula preenchida por coágulo (a) filtro duplo, (b) alizarina, (c) calceína, (d) tetraciclina.

As cúpulas preenchidas com composto vitamínico não apresentam aspecto característico de tecido ósseo, possuem aglomerados em formato circular, que apresentam fluorescência. (Fig. 19)

Figura 19: Imagens da região R2, com preenchimento de composto polivitamínico (a) filtro duplo, (b) alizarina, (c) calceína, (d) tetraciclina.

As cúpulas preenchidas com β -TCP apresentam maiores áreas de formação óssea, chegando a preencher um lado da cúpula da base até a abóbada. Nota-se que a formação óssea tem início na região em contato ósseo em direção à abóbada da cúpula, seguindo a lateral da cúpula. (Fig. 20)

Figura 20: Imagens da região R2, com preenchimento de β -TCP (a) filtro duplo, (b) alizarina, (c) calceína, (d) tetraciclina.

As áreas a serem quantificadas foram selecionadas, delimitadas e associadas às classes de cores definidas previamente. (Fig. 21) O programa utilizado (Image Pro-Plus 5.1, Media Cybernetics) classifica automaticamente as áreas, permitindo ajuste manual, quando necessário. A área de cada marcador foi quantificada pela porcentagem de área neoformada, de acordo com a área delimitada.

Figura 21: Imagem da região R2, com preenchimento de coágulo, demonstrando a quantificação dos marcadores realizada através do programa Image Pro-Plus.

Os valores das áreas de neoformação óssea foram somados, na imagem com filtro duplo, obtendo-se a porcentagem da área total de tecido neoformado em cada cúpula. Para evitar a somatória dos marcadores, causada pela sobreposição destes, as imagens de cada marcador foram analisadas separadamente. Foi calculada a média das cúpulas com preenchimentos e dos marcadores, assim como os desvios padrão. Os dados foram comparados em cada parâmetro com o uso da ANOVA (*one way analysis of variance*- Bioestat 5.0®), com os resultados submetidos ao teste de Tukey, com nível de significância de $p \leq 0,05$, identificando diferenças entre as médias das amostras.

Os valores das médias e desvios- padrão, em porcentagem de área de osso neoformado, de acordo com o preenchimento utilizado, são apresentados na tabela 6. Os valores das médias e desvio-padrões dos marcadores de fluorescência, com preenchimento de coágulo são apresentados na tabela 7, e com preenchimento de β -TCP na tabela 8.

Tabela 6: Valores das médias e desvios-padrão, das áreas de osso neoformado, das cúpulas com preenchimento.

Preenchimento	Média (% área)	Desvio-padrão
Coágulo	7,5	$\pm 8,3$
Composto	-	-
β -TCP	14,1	$\pm 7,6$

Tabela 7: Valores das médias e desvio-padrões dos marcadores de fluorescência, com preenchimento de coágulo.

Marcador	Média (% área)	Desvio- padrão
Alizarina	1,9	$\pm 2,1$
Calceína	3,7	$\pm 5,2$
Tetraciclina	1,8	$\pm 1,9$

Tabela 8: Valores das médias e desvio-padrões dos marcadores de fluorescência, com preenchimento de β - TCP.

Marcador	Média (% área)	Desvio- padrão
Alizarina	5,4	$\pm 4,8$
Calceína	6,0	$\pm 3,3$
Tetraciclina	2,9	$\pm 1,7$

A neoformação óssea no interior da cúpula preenchida por coágulo comprova a propriedade osteocondutiva da hidroxiapatita, pela migração de células osteogênicas provenientes do coágulo sanguíneo, sem a ação de outro biomaterial⁸³. Esta neoformação óssea ocorreu de maneira não uniforme, iniciando-se de um lado da base da cúpula em direção ao ápice, não totalizando o preenchimento ósseo, de maneira que a base oposta da cúpula, apresentava pouca neoformação óssea, justificando o grande desvio-padrão apresentado pela estatística (média da área de formação óssea com preenchimento de coágulo: 7,5%, desvio- padrão: 8,3%).

Houve maior neoformação óssea com o preenchimento de β -TCP (14,1%), sendo que a diferença foi significativa, devido principalmente às características osteocondutivas do β -TCP^{8,10,40}

As partículas de β -TCP atraem células osteoprogenitoras que migram da superfície óssea e também dos componentes do coágulo sanguíneo. A biorreabsorção do β -TCP, favorecida pelo alto metabolismo celular sobre as partículas, causa um aumento local de íons cálcio e fósforo, que estimula a diferenciação em osteoblastos⁵¹. O preenchimento estabiliza o coágulo no interior da cúpula, conseqüentemente ajudando na regeneração óssea⁵⁰.

A não formação óssea no interior da cúpula preenchida pelo composto pode ser atribuída à falta de suprimento sanguíneo no interior da cúpula devido à dificuldade de penetração sanguínea através do composto. Um importante fator para a reparação óssea inclui o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos e a indução de osteoblastos ativos, que promovem a osteogênese⁷¹, como aparentemente não ocorreu a penetração sanguínea pela não reabsorção do composto, não ocorreu a osteogênese.

Houve maior formação óssea no período em que foi administrado a calceína (período entre 28 e 42 dias após a cirurgia), com preenchimento de coágulo e com preenchimento de β -TCP.

A calceína apresenta maior valor de deposição óssea comparado à alizarina e à tetraciclina, indicando maior metabolismo ósseo e processo de reparação mais intenso. A alizarina e tetraciclina apresentam menores taxas de deposição óssea, devido às fases em que foram aplicadas. A alizarina foi o primeiro marcador a ser injetado, durante a fase de reabsorção óssea, em virtude do preparo cirúrgico com utilização de fresas, correspondente à fase de início de reparação, quando ocorre necrose em algumas áreas e o início de remodelamento. A tetraciclina foi o último marcador, representando a fase final do processo de remodelação óssea, osteocondução e maturação, portanto, já com menor deposição óssea^{74,84,85}.

A prevalência do marcador calceína pode ser decorrência do quadro inflamatório inicial, que impossibilita a secreção de maior quantidade de matriz orgânica, pelas células ósseas, nos períodos iniciais de reparo²⁴. Segundo Lopes, o tecido ósseo primário é formado logo após o trauma cirúrgico, porém é rapidamente reabsorvido e substituído por tecido ósseo secundário, que após um certo período remodela-se em tecido cortical maduro. Segundo o mesmo autor, o marcador alizarina, administrado no período inicial de cicatrização, é reabsorvido em parte para dar lugar à calceína, depositada em maior quantidade. A tetraciclina, último marcador a se depositar, marcou a apatita numa fase mais estável em que o remodelamento ósseo já se encontrava próximo ao estado basal de transformação óssea, ou em estado de equilíbrio⁸⁴.

Não há uma ordem específica de deposição dos marcadores fluorocromáticos, não ocorrendo na sequência de aplicação dos marcadores. Pode-se observar áreas de deposição na sequência de aplicação, alizarina, calceína e tetraciclina, como áreas de deposição aleatórias, demonstrando que o processo de ossificação ocorreu durante todo o tempo avaliado, com deposição óssea contínua (Figuras 17, 18a e 20a).

5.6) Microscopia de campo claro

Para análise do material de preenchimento no interior das cúpulas, em microscópio de campo claro, as lâminas foram coradas pelos métodos de azul de toluidina e Stevenel's blue.

A finalidade do corante de azul de toluidina é identificar as células dos tecidos na interface com o implante, permitindo a identificação de osso imaturo. O azul de toluidina é altamente fixado pelas glicosaminoglicanas presente em alta quantidade neste tipo de osso⁸⁰.

Pelo método de Stevenel's blue, as células e estruturas extracelulares são coradas em tons de graduação azul e as fibras colágenas, em azul esverdeado. A alizarina vermelha cora o cálcio, assim o tecido mineralizado aparece em tons de laranja a púrpura⁸¹.

Nas cúpulas com preenchimento de coágulo, pode-se observar formação óssea por osteocondução pela migração óssea da cortical em direção ao ápice da cúpula (Figura 22a e 23a, seta branca). Esta deposição óssea resultou na formação de osso primário com camadas enfileiradas de osteoblastos arredondados com intensa produção de matriz osteóide (Fig. 22b, seta branca), ocorrendo também a migração de camadas típicas enfileiradas de osteoblastos, em íntimo contato do tecido ósseo com a cúpula (osteocondução). (Fig. 22b, seta laranja)

No tecido ósseo neoformado, observa-se amplos osteócitos (Fig. 23b, seta amarela) em grande quantidade, bastante corados, indicando vitalidade, e lamelas ósseas e canais vasculares indicando tecido ósseo organizado, e fileiras de osteoblastos representantes das frentes de mineralização.

Figura 22: Lâminas coradas com azul de toluidina da cúpula com preenchimento de coágulo: (a) vista geral da cúpula, estrela: cúpula; círculo: perfuração do osso cortical da tíbia para perfusão sanguínea; seta branca: tecido ósseo; (b) região basal lateral da cúpula, estrela: cúpula, seta preta: vaso sanguíneo, seta branca: camada de osteoblastos em contato com matriz osteóide, revestindo o tecido ósseo neoformado; seta laranja: células ósseas aderidas à cúpula.

Figura 23: Lâminas coradas com Stevenel's blue da cúpula com preenchimento de coágulo: (a) vista geral da cúpula, estrela: cúpula; vermelho: tecido mineralizado; (b) região do ápice da cúpula- R2: seta branca: osteoblastos enfileirados, demonstrando atividade metabólica; seta amarela: lamelas ósseas, com presença de osteócitos, indicando tecido neoformado organizado.

Não houve formação óssea no interior das cúpulas preenchidas por composto vitamínico, notando-se apenas a manutenção do material, pela não absorção deste e, provavelmente, pela não penetração sanguínea em seu interior. (Figs. 24 e 25)

Figura 24: Lâminas coradas com azul de toluidina da cúpula com preenchimento de composto vitamínico: (a) visão geral, estrela: cúpula; círculo: perfuração do osso cortical da tíbia (b) região basal lateral da cúpula- R3: estrela: cúpula; seta preta: cortical óssea da tíbia; seta vermelha: descontinuidade entre tecido ósseo e composto vitamínico; CV: composto vitamínico.

Figura 25: Lâminas coradas com Stevenel's blue da cúpula com preenchimento de composto vitamínico: (a) visão geral da cúpula, estrela: cúpula; (b) região basal lateral da cúpula- R3: estrela: cúpula, seta preta: cortical óssea da tíbia; seta vermelha: descontinuidade entre tecido ósseo e composto vitamínico; CV: composto vitamínico.

Notadamente, observa-se que houve melhores resultados com preenchimento de β -TCP, com maior quantidade e qualidade de tecido ósseo neoformado. Pode-se observar fileiras de osteoblastos, que agem como frente de ossificação, dando origem à matriz osteóide e, em seguida, ao tecido ósseo neoformado. (Figs. 26 e 27) :

Figura 26: Lâminas coradas com azul de toluidina de cúpula com preenchimento de β -TCP: (a) visão geral da cúpula, estrela: cúpula; (b) região apical da cúpula- R2 e (c) região basal lateral- R3: seta branca: fileira de osteoblastos depositando matriz osteóide, demonstrando atividade metabólica; seta amarela: osteócitos, indicando tecido ósseo maduro, com formação de lamelas.

Figura 27: Lâminas coradas com Stevenel's blue de cúpula com preenchimento de β -TCP: (a) vista geral da cúpula, estrela: cúpula; (b) região basal lateral da cúpula- R3; (c, d, e) região do ápice da cúpula- R2: seta amarela: osteócitos e lamelas ósseas, indicando tecido mineralizado; seta branca: osteoblastos em atividade, formando matriz óssea; seta azul: matriz osteóide.

5.7) Espectroscopia de Energia Dispersiva em Microscópio Eletrônico de Varredura

A espectroscopia de energia dispersiva (EDS) identifica a matriz óssea mineralizada presente no interior da cúpula, preenchida por coágulo, pelos elementos cálcio (Ca) e fósforo (P) (Fig. 28b).

Figura 28: (a) Micrografia obtida por MEV do corte histológico da cúpula de HA, com preenchimento de coágulo, sendo: estrela: cúpula, seta: formação óssea. (b) Mapeamento dos elementos químicos obtidos por EDS no corte histológico. (c) Espectroscopia de energia dispersiva identificando os elementos Ca e P, em função da energia.

A análise por EDS- MEV da cúpula preenchida por composto vitamínico identificou a presença dos íons magnésio (Mg) e silício (Si) e menor quantidade de íons Ca e P, provavelmente pela não formação óssea. Pode-se notar elevado teor dos íons Ca e P na região da cúpula de HÁ, mas não no interior desta. (Fig. 29)

Figura 29: (a) Micrografia obtida por MEV do corte histológico da cúpula de HA, com preenchimento de composto vitamínico, sendo: estrela: cúpula. (b) Mapeamento dos elementos químicos obtidos por EDS no corte histológico. (c) Espectroscopia de energia dispersiva identificando os elementos Ca, P, O, Mg e Si, em função da energia.

A análise por EDS identificou grandes quantidades de elementos cálcio (Ca) e fósforo (P), característicos de tecido ósseo e do preenchimento, no interior da cúpula com β -TCP.(Fig. 30)

Figura 30: (a) Micrografia obtida por MEV do corte histológico da cúpula de HA, com preenchimento de β -TCP, sendo: estrela: cúpula, seta: formação óssea, seta vermelha: partícula de β -TCP. (b) Mapeamento dos elementos químicos obtidos por EDS no corte histológico. (c) Espectroscopia de energia dispersiva identificando os elementos Ca, P e O, em função da energia.

De acordo com os testes realizados, pode-se observar neoformação óssea no interior das cúpulas de hidroxiapatita com preenchimento de coágulo (~7,5% de área), com tecido ósseo organizado, presença de lamelas ósseas, osteócitos, canais vasculares e atividade osteoblástica, com produção de matriz osteóide. O período de maior deposição óssea ocorreu entre 28 e 42 dias, referente ao tempo de administração do marcador calceína. Além da identificação do tecido ósseo neoformado por microscopia de campo claro e de fluorescência, a presença de matriz óssea mineralizada foi confirmada pela identificação dos elementos cálcio e fósforo, através de EDS-MEV.

O composto vitamínico não favoreceu a formação óssea no interior da cúpula, apresentando estruturas circulares e amorfas, nas imagens de microscópio de campo

claro e de fluorescência. Pela técnica de EDS-MEV, pode-se observar que estas estruturas são constituídas de magnésio e silício, com pouca quantidade de cálcio e fósforo, provavelmente constituintes do próprio composto vitamínico, condizentes com a análise por difração de raios X.

O β -TCP apresenta maior quantidade de tecido neoformado (~14,1%), em comparação aos outros preenchimentos, com boa qualidade de tecido ósseo neoformado e intensa atividade osteoblástica. A calceína apresentou maior deposição óssea, no período em que foi administrada. O mapeamento dos elementos químicos obtidos por EDS-MEV identificou maiores quantidades de íons cálcio e fósforo, característicos de tecido ósseo e de β -TCP, não reabsorvido.

CONCLUSÕES

Neste capítulo são apresentadas as principais conclusões deste trabalho.

6) CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos, conclui-se que:

- A cúpula de hidroxiapatita desenvolvida é um bom arcabouço para neoformação óssea, acima da cortical da tíbia de coelhos, com melhores resultados com preenchimento de β -TCP.
- A hidroxiapatita manteve suas características químicas e físicas após a sinterização, confirmadas pela difração de raios X, determinação da densidade e microscopia eletrônica de varredura, e, de acordo com o teste de citotoxicidade, apresenta característica de biocompatibilidade, necessária para utilização como biomaterial.
- A cúpula utilizada apresenta fácil manuseio para sua instalação, durante o ato cirúrgico, e após a remoção do bloco da tíbia, manteve-se íntegra, com boa estabilidade, manutenção do espaço e boa integração ao tecido ósseo. Pode-se prever, que não seria necessária sua remoção cirúrgica, para instalação de implantes odontológicos na região do tecido ósseo neoformado.
- Pelo ensaio *in vivo*, as cúpulas de hidroxiapatita apresentam propriedade de osteocondução, pela observação da neoformação óssea no interior e na superfície da cúpula, principalmente com preenchimento de coágulo, pela migração de células osteogênicas, sem a ação de outro biomaterial.
- A partir da identificação e quantificação da neoformação óssea, no interior da cúpula, pode-se observar os tempos de maturação óssea, durante o período de cicatrização. O preenchimento de β -TCP apresenta maior quantidade de osso neoformado. O preenchimento de coágulo apresenta neoformação moderada e o preenchimento de composto vitamínico não apresenta formação de tecido ósseo, observando-se manutenção deste material no interior das cúpulas. O marcador celular calceína apresenta maior valor de deposição óssea comparado à alizarina e à tetraciclina, indicando maior metabolismo ósseo e processo de reparação mais intenso, durante o período entre 28 e 42 dias.
- A prevalência do marcador calceína pode ser decorrência do quadro inflamatório inicial, que impossibilita a secreção de maior quantidade de matriz orgânica, pelas células ósseas, nos períodos iniciais de reparo. O tecido ósseo primário é formado logo após o trauma cirúrgico, porém é rapidamente reabsorvido e substituído por tecido ósseo secundário, que após um certo período remodela-se em tecido cortical maduro. O marcador alizarina, administrado no período inicial de cicatrização, é reabsorvido em parte para dar lugar à calceína, depositada em maior quantidade. A tetraciclina, último marcador a se depositar, marcou a apatita

numa fase mais estável em que o remodelamento ósseo já se encontrava próximo ao estado basal de transformação óssea, ou em estado de equilíbrio.

- Foi possível observar a qualidade de tecido ósseo neoformado, com áreas de remodelação óssea ativa, com deposição de matriz óssea (atividade osteoblástica), e áreas com características de osso mineralizado, com formação de lamelas ósseas, osteócitos e canais vasculares. O preenchimento com β -TCP apresenta melhor qualidade do tecido ósseo neoformado, pela organização das estruturas ósseas presentes e área de tecido mineralizado no interior da cúpula.

7) ANEXOS

Anexo I: Aprovação do comitê de ética em pesquisa para realização dos testes *in vivo*.

Parecer - Projeto Nº 76/11 - CEUA-IPEN/SP

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa **“AVALIAÇÃO DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA EM COELHOS ATRAVÉS DE CÚPULA DE HIDROXIAPATITA ASSOCIADA A DIFERENTES MATERIAIS”** de responsabilidade da pesquisadora **ANA HELENA DE ALMEIDA BRESSIANI** foi considerado **APROVADO**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados, a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou finais, dependendo da duração do projeto) referentes ao andamento da pesquisa. Após o término da pesquisa, uma cópia do trabalho deve ser encaminhada a este CEUA .

São Paulo, 03 de MARÇO de 2011

Profa. Dra. Nanci do Nascimento
Coordenadora do CEUA-IPEN

IPEN-CNEN/SP
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL
Av Prof Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária - CEP 05508-000 - São Paulo - SP
Telefone: (011) 3133-9698 - Fax (011) 3133-9709
E-mail: nnascime@ipen.br

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. RATNER, B. D. *et al.* **Biomaterials Science: an introduction to materials in Medicine**. 2. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004.
2. RONCAGLIA, T. **I-DENT: a história da prótese**. at <<http://www.ident.com.br/tatiana/artigo/240-historia-da-protese>>
3. RIBEIRO, C. **Processamento e caracterização de cerâmicas à base de hidroxiapatita e fosfato-tricálcico**. São Paulo: Dissertação (Mestrado)- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 2003.
4. BORELLI, V. **Pesquisa e desenvolvimento de biomateriais: estudo das inter-relações científicas, tecnológicas e normativas**. São Paulo: Dissertação (Mestrado)- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 2011.
5. BRÄNEMARK P.I. BREINE U., HANSSON B.O., LINDSTRÖM J., OHLSSON A., A. R. Intra-osseous anchorage of dental protheses. I. Experimental studies. **Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery**, v. 3, n. 2, p. 81-100, 1969.
6. ALBREKTSSON, T. *et al.* Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. **Acta orthopaedica Scandinavica**, v. 52, n. 2, p. 155-70, jan. 1981.
7. BUSER, D.; MARTIN, W.; BELSER, U. C. Optimizing esthetics for implant restorations in the anterior maxilla: anatomic and surgical considerations. **The International journal of oral & maxillofacial implants**, v. 19 Suppl, p. 43-61, jan. 2004.
8. JENSEN, S. S.; TERHEYDEN, H. Bone augmentation procedures in localized defects in the alveolar ridge: clinical results with different bone grafts and bone-substitute materials. **The International journal of oral & maxillofacial implants**, v. 24 Suppl, p. 218-36, jan. 2009.
9. MCALLISTER, B. S.; HAGHIGHAT, K. Bone augmentation techniques. **Journal of periodontology**, v. 78, n. 3, p. 377-96, mar. 2007.
10. ZIMMERMANN, G.; MOGHADDAM, A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. **Injury**, v. 42 Suppl 2, p. S16-21, set. 2011.
11. MELLONIG, J. T.; PREWETT, A. B.; MOYER, M. P. HIV inactivation in a bone allograft. **Journal of periodontology**, v. 63, n. 12, p. 979-83, dez. 1992.
12. BECKER, W.; BECKER, B. E.; CAFFESSE, R. A comparison of demineralized freeze-dried bone and autologous bone to induce bone formation in human extraction sockets. **Journal of periodontology**, v. 65, n. 12, p. 1128-33, dez. 1994.

13. GIANNOUDIS, P. V; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: an update. **Injury**, v. 36 Suppl 3, p. S20-7, nov. 2005.
14. STEVENSON, S. Biology of bone grafts. **The Orthopedic clinics of North America**, v. 30, n. 4, p. 543-52, out. 1999.
15. NASR, H. F.; AICHELMANN-REIDY, M. E.; YUKNA, R. A. Bone and bone substitutes. **Periodontology 2000**, v. 19, p. 74-86, fev. 1999.
16. ZAFIROPOULOS, G.-G. K. *et al.* Treatment of intrabony defects using guided tissue regeneration and autogenous spongiosa alone or combined with hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate bone substitute or bovine-derived xenograft. **Journal of periodontology**, v. 78, n. 11, p. 2216-25, nov. 2007.
17. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
18. ROBERTS, W.; GARETTO, L. P. Fisiologia e metabolismos ósseos. *In: Implantes Dentários Contemporâneos*. São Paulo: Livraria Santos Editora, 2000. p. 225-237.
19. GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em cores**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
20. BARRÈRE, F.; BLITTERSWIJK, C. A. VAN; GROOT, K. DE. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. **International journal of nanomedicine**, v. 1, n. 3, p. 317-32, jan. 2006.
21. BOGLIOLO, L.; BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006.
22. GARTNER, L. P.; HIATT, J. L.; NARCISO, M. S. **Atlas colorido de histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
23. PÉREZ-SÁNCHEZ, M.-J. *et al.* Biomaterials for bone regeneration. **Medicina oral, patología oral y cirugía bucal**, v. 15, n. 3, p. e517-22, maio. 2010.
24. ALLEGRINI, S. J. **Atuação da proteína morfogenética óssea bovina ou complexo polivitamínico, associado a hidroxiapatita natural, no processo de osteointegração em diferentes superfícies de implantes de titânio**. . São Paulo: Tese (Doutorado)- Instituto de Ciências Biomédicas Universidade de São Paulo, 2003.
25. ROBBINS, S. L. *et al.* **Fundamentos de Robbins Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

26. ORÉFICE, R. **Biomateriais: Fundamentos e Aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.
27. WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5897-909, out. 2009.
28. VALENTE, M. C. **Síntese de hidroxiapatita e sua aplicação como biomaterial**. São Paulo: Tese (Doutorado)- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 1999.
29. WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, n. 20, p. 2941-53, jul. 2008.
30. HENCH, L. L. **An Introduction to Bioceramics (Advanced Series in Bioceramics)**. World Scientific Pub Co Inc, 1993. p. 386
31. LINDHE J; KARRING T; LANG NP. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2005.
32. ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **European spine journal: official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society**, v. 10 Suppl 2, p. S96-101, out. 2001.
33. CALLISTER JR, W. D. **Ciência e engenharia de materiais: uma introdução**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2002..
34. HENCH, L. L. Bioceramics: From Concept to Clinic. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 74, n. 7, p. 1487-1510, 1991.
35. HENCH, L. L. Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials**, v. 19, n. 16, p. 1419-1423, 1998.
36. HENCH, L. L. Bioceramics. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 81, n. 7, p. 1705-1728, 1998.
37. JENSEN, S. S. *et al.* Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. **Clinical oral implants research**, v. 17, n. 3, p. 237-43, jun. 2006.
38. HANNINK, G.; ARTS, J. J. C. Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: what is optimal for bone regeneration? **Injury**, v. 42 Suppl 2, p. S22-5, set. 2011.
39. LEMONS MISCH, F.D., J. E. Biomateriais utilizados em implantes dentários. *In*: SANTOS, L. (Ed.). **Implantes dentários contemporâneos**. São Paulo: [s.n.]. p. 271-302.

40. LEGEROS, R. Z. **Calcium phosphates in oral biology and medicine**. 15. ed. New York: Monographs in oral science, 1991..
41. TENHUISEN, K. S.; BROWN, P. W. Formation of calcium-deficient hydroxyapatite from alpha-tricalcium phosphate. **Biomaterials**, v. 19, n. 23, p. 2209-17, dez. 1998.
42. NAGAHARA K SHIBATA K, MEENAGHAN MA, I. M. Osteogenesis of hydroxyapatite and tricalcium phosphate used as a bone substitute. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, v. 7, p. 72-79, 1992.
43. CRUZ ACC DAHER JB, SILVA JCZ, PILATTI GL, SANTOS FA, P. M. T. Physico-chemical characterization and biocompatibility evaluation of hydroxyapatites. **Journal of Oral Science**, v. 48 (4), p. 219-226, 2006.
44. SANTOS FA MARTINS MC, ZENÓBIO EG, SPOLIDORO LC, MARCANTONIO JR E, P. M. T. Comparison of biomaterial implants in the dental socket: histological analysis in dogs. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 12(1), p. 18-25, 2010.
45. KLEIN, C. P. *et al.* Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 17, n. 5, p. 769-784, 1983.
46. COIMBRA ME YOSHIMOTO M, ALLEGRI JR. S, FANCIO E, HIGA O, SUZUKI M, COELHO PG, S. M. B. Physico/Chemical Characterization, In Vitro, and In Vivo Evaluation of Hydroxyapatite/PLGA Composite and Tricalcium Phosphate Particulate Grafting Materials. **Titanium**, v. 1, p. 16-28, 2009.
47. KNABE, C. *et al.* The effect of different titanium and hydroxyapatite-coated dental implant surfaces on phenotypic expression of human bone-derived cells. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 71, n. 1, p. 98-107, 1 out. 2004.
48. ROSA, A. L.; SHAREEF, M. Y.; NOORT, R. VAN. Efeito das condições de preparação e sinterização sobre a porosidade da hidroxiapatita. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 14, n. 3, p. 273-277, 2000.
49. HORCH, H.-H. *et al.* Synthetic, pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 35, n. 8, p. 708-13, ago. 2006.
50. ZERBO, I. R. *et al.* Localisation of osteogenic and osteoclastic cells in porous beta-tricalcium phosphate particles used for human maxillary sinus floor elevation. **Biomaterials**, v. 26, n. 12, p. 1445-51, maio. 2005.

51. MANJUBALA, I. *et al.* Bioactivity and osseointegration study of calcium phosphate ceramic of different chemical composition. **Journal of biomedical materials research**, v. 63, n. 2, p. 200-8, jan. 2002.
52. KAMITAKAHARA, M.; OHTSUKI, C.; MIYAZAKI, T. Review paper: behavior of ceramic biomaterials derived from tricalcium phosphate in physiological condition. **Journal of biomaterials applications**, v. 23, n. 3, p. 197-212, nov. 2008.
53. SALLES, M. B. **Micro-elementos funcionais alterando a biocompatibilidade do polímero de poliuretana de mamona (poliol) em enxertos ósseos: estudo desenvolvido em cães.** São Paulo: Dissertação (Mestrado em Ciências - Anatomia) - Departamento de Anatomia Funcional Estrutura e Ultraestrutura do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2001.
54. SALLES, M. B. **Avaliação do estresse oxidativo agudo após trauma cirúrgico realizado em tecido ósseo de ratos Wistar.** São Paulo : Tese (Doutorado) Instituto de Ciências Biomédicas Universidade de São Paulo, 2007.
55. BEOLCHI, R. S. **Adição de complexo vitamínico em duas biocerâmicas e seu efeito na regeneração óssea.** São Paulo: Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares , 2009.
56. MELLONIG, J. T. N. M. . **Implantoterapia abordagens clínicas e evidência de sucesso.** São Paulo: Quintessence, 2003.
57. DAVARPANAH, M. . M. H. . K. M. . T. J. F. **Manual de implantodontia clínica.** Porto Alegre: Artmed, 2006.
58. NEVES, J. B. **Estética em implantologia- uma abordagem dos tecidos moles e duros.** São Paulo: Quintessence Editora Ltda, 2006
59. STEENBERGHE, D. VAN *et al.* Bone augmentation by means of a stiff occlusive titanium barrier. **Clinical oral implants research**, v. 14, n. 1, p. 63-71, fev. 2003.
60. MARÉCHAL, M. *et al.* Bone augmentation with autologous periosteal cells and two different calcium phosphate scaffolds under an occlusive titanium barrier: an experimental study in rabbits. **Journal of periodontology**, v. 79, n. 5, p. 896-904, maio. 2008.
61. ALMASRI, M.; ALTALIBI, M. Efficacy of reconstruction of alveolar bone using an alloplastic hydroxyapatite tricalcium phosphate graft under biodegradable chambers. **The British journal of oral & maxillofacial surgery**, v. 49, n. 6, p. 469-73, set. 2011.

62. SASKA, S. *et al.* Adesivos de cianocrilato para fixação de xenoenxertos. **Revista de cirurgia e traumatologia buco-maxilo-facial** , v. 9, n. 1, p. 93-102, 2008.
63. SHERMAK, M. A. *et al.* Fixation of the craniofacial skeleton with butyl-2-cyanoacrylate and its effects on histotoxicity and healing. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 102, n. 2, p. 309-18, ago. 1998.
64. SASKA, S. *et al.* Fixation of autogenous bone grafts with ethyl-cyanoacrylate glue or titanium screws in the calvaria of rabbits. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 38, n. 2, p. 180-6, fev. 2009.
65. DEDAVID, B. A. . G. C. I. . M. G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores.** (2007).at <<http://www.pucrs.br/edipucrs/online/microscopia.pdf>>
66. INTERNATIONAL STANDARD ISO 10993-5 **Biological evaluation of medical devices- Parts 5: Tests for in vitro cytotoxicity.** (Geneva: International Organization for Standardization: 2009).
67. INTERNATIONAL STANDARD ISO 10993-12 **Biological evaluation of medical devices -- Part 12: Sample preparation and reference materials.** (Geneva: International Organization for Standardization: 2012).
68. FONSECA, N. M. . G. S.; GOMES. P. O. . DE P. L. C. A. Anestesia em coelhos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 11, n. 2, p. 82-104, 1996.
69. NISHIMURA, I.; SHIMIZU, Y.; OOYA, K. Effects of cortical bone perforation on experimental guided bone regeneration. **Clinical oral implants research**, v. 15, n. 3, p. 293-300, jun. 2004.
70. BECK, T. J. **Avaliação da interface implante/osso de implantes de uso odontológico em tíbias de coelhos.** São Paulo: Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1997.
71. O'BRIEN, F. J.; TAYLOR, D.; LEE, T. C. An improved labelling technique for monitoring microcrack growth in compact bone. **Journal of biomechanics**, v. 35, n. 4, p. 523-6, abr. 2002.
72. KÖNIG JÚNIOR, B.; CARVALHO LOPES, C. DE. Bone remodeling analysis after placement of dental implants using polyfluorochrome sequential labeling. **Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft**, v. 184, n. 3, p. 241-4, maio. 2002.
73. YOSHIMOTO, M. *et al.* Bone healing after the inferior alveolar nerve lateralization: a histologic study in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 62, n. 9 Suppl 2, p. 131-5, set. 2004

74. ALLEGRINI, S. *et al.* Hydroxyapatite grafting promotes new bone formation and osseointegration of smooth titanium implants. **Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger: official organ of the Anatomische Gesellschaft**, v. 188, n. 2, p. 143-51, mar. 2006.
75. DONATH, K.; BREUNER, G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique. **Journal of oral pathology**, v. 11, n. 4, p. 318-26, ago. 1982.
76. GAALEN, S. M. VAN *et al.* Use of fluorochrome labels in in vivo bone tissue engineering research. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 16, n. 2, p. 209-17, abr. 2010.
77. LICHTMAN, J. W.; CONCHELLO, J.-A. Fluorescence microscopy. **Nature methods**, v. 2, n. 12, p. 910-9, dez. 2005.
78. SRIDHARAN, G.; SHANKAR, A. A. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. **Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP**, v. 16, n. 2, p. 251-5, maio. 2012.
79. MANIATOPOULOS, C. *et al.* An improved method for preparing histological sections of metallic implants. **The International journal of oral & maxillofacial implants**, v. 1, n. 1, p. 31-7, jan. 1986.
80. MALISKA, A. M. **Microscopia eletrônica de varredura e microanálise**. (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC, 2013).at <http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV_Apostila.pdf>
81. ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v. 21, n. 7, p. 667-81, abr. 2000.
82. LOPES, C. C. **Análise do remodelamento ósseo após a inserção de implantes dentais de diferentes superfícies em tíbias de coelhos**. São Paulo: Tese (Doutorado)- Instituto de Ciências Biomédicas Universidade de São Paulo, 2003.
83. SUN, T. C. *et al.* Do different fluorochrome labels give equivalent histomorphometric information? **Bone**, v. 13, n. 6, p. 443-6, jan. 1992