

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA  
CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCO-MAXILO-FACIAIS

EDUARDO BOERO DAUDT

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS CRIADOS EM MAXILA E  
PREENCHIDOS COM HIDROXIAPATITA COM TAXA CA/P MODIFICADA.  
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.**

LINHA DE PESQUISA:

Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia

Porto Alegre

2015

EDUARDO BOERO DAUDT

AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS CRIADOS EM MAXILA E  
PREENCHIDOS COM HIDROXIAPATITA COM TAXA CA/P MODIFICADA.  
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.

LINHA DE PESQUISA:

Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia na Área de Concentração em Clínica Odontológica/Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-faciais.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Deise Ponzoni

Porto Alegre  
2015

### CIP - Catalogação na Publicação

Boero Daudt, Eduardo

AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS CRIADOS EM  
MAXILA E PREENCHIDOS COM HIDROXIAPATITA COM TAXA  
CA/P MODIFICADA. ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS. /  
Eduardo Boero Daudt. -- 2015.

40 f.

Orientador: Deise Ponzoni.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia,  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto  
Alegre, BR-RS, 2015.

1. Substitutos Ósseos. 2. Materiais Biocompatíveis.  
3. Regeneração óssea. 4. Modelos Animais. I. Ponzoni,  
Deise , orient. II. Título.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus queridos pais, Roberto e Sônia Daudt, à minha irmã, Renata Daudt, e a minha namorada Carina Lantmann Cabreira, que sempre deram força e apoiaram todas as minhas decisões. O amor e a confiança em mim depositados foram essenciais para o sucesso dessa jornada. Em especial, à minha mãe, exemplo de profissional na área da educação, com sua dedicação e trabalho muda a vida de muito jovens, é com admiração que me espelho em teus exemplos. É com amor que dedico este trabalho para Vocês.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por proporcionar um ensino de excelência. Espero poder retribuir para a sociedade todo o investimento feito.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por ter oferecido sua estrutura para a pesquisa e para o aprendizado. Em especial aos pacientes, a finalidade de todo nosso trabalho é poder oferecer o melhor a eles.

Ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo comprometimento com um ensino de qualidade, que faz desse um dos programas mais respeitados no Brasil.

Ao Fundo de Incentivo a Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela oportunidade de tornar este trabalho uma realidade.

Ao Instituto do Cérebro da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, em especial ao Biomédico Samuel Greggio e à Farmacêutica Gianina Teribele Venturin, profissionais exemplares em suas áreas, por toda dedicação e entusiasmo com as quais realizaram as análises de MicroCT.

Ao Laboratório Central de Microscopia e Microanálise da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, em especial ao Técnico em Microscopia Eletrônica do LabCemm Wagner Prates, pelo trabalho realizado com todo o cuidado e agilidade necessária.

Ao Laboratório de Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial aos Professores Vicente Castelo Branco Leitune e Fabrício Mezzomo Collares, pelo desenvolvimento dos biomateriais utilizados nesta pesquisa e por todo conhecimento e auxílio na realização da mesma.

À Unidade de Patologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial a Bióloga Flavia Giusti, pela sua disponibilidade e empenho em realizar com perfeição a confecção das amostras histológicas deste trabalho.

À Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial à Enfermeira Marta Justina Giotti Cioato e às Médicas Veterinárias Fabíola Schons Mayer e Tuane Garcez por estarem sempre presentes prestando todo o auxílio, pela dedicação e comprometimento com o nosso trabalho. A alta qualidade dos trabalhos desenvolvidos na Unidade passa por toda a dedicação e carinho com que estas queridas profissionais trabalham. Meus sinceros agradecimentos.

A Professora Fernanda Visioli por ter abraçado esta pesquisa com toda sua dedicação e pelos seus distintos conhecimentos que engrandeceram muito cientificamente este estudo. Meus sinceros agradecimentos por ter aceitado nosso convite para colaborar com este trabalho.

À minha orientadora Professora Deise Ponzoni, por ter acreditado em mim e me dado esta oportunidade. Foi muito enriquecedor poder trabalhar com uma profissional com tamanha dedicação com seus alunos, paciente e orientados. A responsabilidade, o respeito e a dedicação dispensada neste trabalho para torná-lo realidade foi enorme. Com certeza cresci muito profissionalmente e como pessoa seguindo seus exemplos, meu muito obrigado.

À equipe de Professores da Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-faciais: Prof. Angelo Luiz Freddo, Profa. Adriana Corsetti, Prof. Carlos Eduardo Baraldi, Prof. Marcel Fasolo de Paris e Profa. Deise Ponzoni, desde meus primeiros passos na especialidade vocês estiveram presentes com muito conhecimento, profissionalismo e companheirismo. Como verdadeiros exemplos vocês despertaram em mim o interesse nesta área tão nobre da Odontologia, meus sinceros agradecimentos por todo este caminho percorrido juntos. Gostaria de agradecer em especial às Professoras, já aposentadas, Taís Weber Furlanetto Azambuja e Francesca Bercini por todo o carinho e amor empregados no ensino da cirurgia e por terem me incentivado e dado a primeira oportunidade como monitor nesta área. À Profa. Dra. Edela Puricelli, que é uma referência na Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais, que com muita dedicação e trabalho engrandece esta ciência, seus conhecimentos são de valor inestimável e sua luta para fortalecer nossa classe mais ainda.

Ao Prof. Carlos Eduardo Baraldi, regente da disciplina de Exodontia, e aos alunos do ATO 2017/01 por terem dado a oportunidade e o prazer de realizar meu estágio de docência nesta disciplina. Foi uma experiência muito enriquecedora que consolidou minha predileção pela docência, espero ter contribuído para a formação de todos, do mesmo modo que vocês contribuíram para a minha.

Aos meus colegas de Mestrado, Alessandra Cláudia Junges, Caroline Comis Giongo e Estevan Marçal da Silveira Stegues pelos momentos compartilhados nesta jornada. Vocês foram essenciais para minha formação, agregando conhecimentos, exemplos e companheirismo em todos os momentos, meus sinceros agradecimentos.

Ao Serviço de Assessoria Estatística da Faculdade de Matemática da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, em especial ao Professor João Feliz Duarte de Moraes pelo auxílio para interpretar os resultados desse trabalho.

A todos os colegas de Profissão que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho, o meu muito obrigado.

“Far better is it to dare mighty things, to win glorious triumphs, even though checkered by failure... than to rank with those poor spirits who neither enjoy nor suffer much, because they live in a gray twilight that knows not victory nor defeat.”

Theodore Roosevelt

## RESUMO

Estudos prévios sugerem que a modificação da superfície de uma hidroxiapatita sinterizada, através do condicionamento ácido, favorece a interação deste biomaterial com o organismo. Este estudo avaliou o reparo de defeitos ósseos preenchidos por hidroxiapatita sinterizada modificada (HAM), taxa Ca/P = 1.5 e hidroxiapatita sinterizada pura (HA), taxa Ca/P = 1.67, em um modelo experimental *in vivo*. Foram utilizados 52 ratos, submetidos à confecção de defeitos ósseos que promoveram as exposições das raízes mesiais dos primeiros molares superiores, sendo utilizado implante de HAM no lado direito e, como controle, HA no lado esquerdo. Os animais foram distribuídos randomicamente em quatro tempos pós-operatórios (15, 30, 60 e 90 dias). Após a morte dos animais, as peças foram preparadas e avaliadas através de análise histológica, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microtomografia computadorizada (MicroCT). Os resultados mostraram maior neoformação óssea associada à HAM ( $p=0.009$ ). Na análise longitudinal a HAM apresentou neoformação óssea superior no tempo experimental de 90 dias pós-operatório comparado aos tempos de 15 e 30 dias pós-operatórios ( $p=0.014$  e  $p=0.018$  respectivamente). Para os parâmetros atividade osteoclástica e processo inflamatório não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre HAM e HA ( $p=0.446$  e  $p=0.411$ , respectivamente). As avaliações através da MicroCT demonstraram aumento da densidade óssea ao longo dos tempos experimentais para a HAM ( $p=0.0042$ ), mas não para HA ( $p=0.356$ ). A microscopia eletrônica de varredura permitiu a observação das microporosidades associadas à HAM e a incorporação dos biomateriais ao tecido ósseo. Nas condições experimentais desse estudo, a aplicação de HAM resulta em melhor reparo ósseo, quando comparada a HA.

Palavras-chave: Substitutos Ósseos; Materiais Biocompatíveis; Regeneração Óssea; Modelos Animais.

## ABSTRACT

Previous studies suggest that modifying the surface of a sintered hydroxyapatite (HA) through acid-etching favors the interaction between the biomaterial and organism. This study evaluated bone repair of defects filled with a modified sintered hydroxyapatite (HAM; Ca/P ratio = 1.5), and sintered hydroxyapatite (HA; Ca/P ratio = 1.67), in an experimental model *in vivo*. Bone defects were created to promote mesial roots exposure of superior first molars in 52 rats. HAM implant was put into the right side bone defect and HA was used on the left side, as control. Animals were randomized into four postoperative groups (15, 30, 60 and 90 days) and killed, respectively, in each time. Surgical pieces were prepared and assessed by histological analysis, scanning electron microscopy (SEM) and computed microtomography (MicroCT). The results showed increased bone formation associated with HAM ( $p = 0.009$ ). Higher bone formation was related to HAM at 90 days postoperative compared to 15 and 30 days after surgery ( $p = 0.014$  and  $p = 0.018$ , respectively). No statistically significant differences were found between HAM and HA for osteoclastic activity and inflammation ( $p = 0.446$  and  $p = 0.411$ , respectively). MicroCT showed increased bone density throughout the experimental periods for the HAM ( $p = 0.0042$ ), but not for HA ( $p = 0.356$ ). Scanning electron microscopy allowed the observation of microporosities associated with HAM and the incorporation of biomaterials in bone tissue. Under the experimental conditions of this study, the application of HAM results in better bone healing compared to HA.

Keywords: Bone Substitutes; Biocompatible materials; Bone Regeneration; Animal models.

## Lista de Abreviaturas

$\mu\text{m}$  – Micrometro(s)

Ca/P – Relação de Cálcio e Fosfato

CaP – Fosfato(s) de cálcio

DCPD – Fosfato bicálcico diidratado

FIPE – Fundo de Investimento

HA – Hidroxiapatita sinterizada

HAM – Hidroxiapatita sinterizada com taxa Ca/P modificada

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

InsCer – Instituto do cérebro

LabCEMM – Laboratório central de microscopia e microanálise

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MicroCT – Microtomografia computadorizada

NFO – Neoformação óssea

SE – Elétrons secundários

TCF – Tecido conjuntivo fibroso

TCP – Fosfato tricálcico

TD – Tecido dentário

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

$\beta$ -TCP – Beta-fosfato tricálcico

## SUMÁRIO

1 Antecedentes e Justificativa .....	11
2 Objetivo Geral .....	16
2.1 Objetivos Específicos .....	16
3 Artigo .....	17
4 Considerações Finais .....	36
Referências .....	37

## 1 Antecedentes e Justificativa

Os enxertos ósseos são o segundo procedimento mais realizado no mundo, só perdendo para as transfusões sanguíneas. Estima-se que aproximadamente 2,2 milhões de procedimentos de enxertia são realizados no mundo anualmente (1). O uso do enxerto ósseo autógeno é considerado o padrão ouro nas reconstruções ósseas, apresentando propriedades de osteocondução, osteoindução e osteogênese, além de ser um método previsível e bem documentado de enxertia do rebordo alveolar. As vantagens deste tipo de enxerto são um menor tempo de cicatrização, maior incorporação do enxerto e custo menor que os substitutos ósseos (2, 3). Contudo, o uso do osso autógeno apresenta desvantagens como a morbidade pós-operatória, a disponibilidade limitada, a necessidade de uma área doadora e a imprevisibilidade da taxa de reabsorção (4-6). Outras técnicas tradicionais para reparo dos defeitos ósseos incluem a utilização de enxertos alógenos, xenógenos e biomateriais (7, 8).

É esperado do biomaterial ideal que o mesmo possua propriedades de biocompatibilidade com os tecidos adjacentes, radiopacidade, facilidade de modelamento, resistência para tolerar impactos, estabilidade ao longo do tempo, capacidade de manter o volume e osteoatividade (9). A osteoatividade é a capacidade do material implantado ser substituído por formação óssea através da osteoindução e osteocondução (10). Há vantagens indiscutivelmente significativas no grupo dos biomateriais: a disponibilidade irrestrita faz com que não seja necessária a abordagem em um segundo sítio cirúrgico, levando a diminuição do tempo cirúrgico, bem como a recuperação pós-operatória. Infelizmente, até o momento, todas as tentativas de sintetizar substitutos ósseos para aplicações clínicas com tolerância fisiológica, biocompatibilidade e estabilidade em um longo prazo tiveram, apenas, um sucesso relativo quando comparado ao padrão ouro (enxerto ósseo autógeno). Isto mostra a superioridade e complexidade das estruturas naturais (11).

Os fosfatos de cálcio (CaP) são utilizados como substitutos ósseos a mais de 119 anos (1, 12). Apresentam diferentes aplicações em todo o corpo. Suas

indicações incluem implantes dentais, uso no tratamento periodontal, tratamento de defeitos ósseos, tratamento de fraturas, substituição total de articulações, na ortopedia e nas reconstruções crânio-maxilo-faciais (11). A hidroxiapatita (HA) é um dos biomateriais a base de fosfato de cálcio mais utilizados, tanto em pesquisas, quanto clinicamente. Sua composição e estrutura são similares ao osso humano (13). São reconhecidas suas capacidades de adesão química diretamente ao osso, bioatividade, osteocondutividade e biocompatibilidade (14-16). Muitos estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a hidroxiapatita favorece a adesão, diferenciação e proliferação de células relacionadas à osteogênese, como osteoblastos e células-tronco mesenquimais (17, 18). Segundo os achados de Neovius *et al.* (2010) as hidroxiapatitas estão relacionadas com um baixo índice de complicações pós-operatórias, sendo considerado um material seguro e previsível para reconstruções alveolares (19).

Geralmente, apatitas utilizadas na Odontologia são preparadas a partir de substâncias químicas puras; contudo, elas também podem ser preparadas de fontes biológicas, como os dentes (20). Devido a sua versatilidade, as apatitas podem ser empregadas em diferentes formulações, configurações e forma (21). Dentre os CaP, a HA é o mais estável em um pH fisiológico de 7,4 e, como já referido, é bioativa e pode, ou não, ser bioreabsorvível. A bioreabsorção dos CaP ocorrem por meio de dissolução e fagocitose (22-26), que dependem de vários parâmetros como cristalinidade, porosidade, pureza química e rugosidade da superfície (11). Uma das propriedades mais importantes dos CaP é sua solubilidade em água, uma vez que o comportamento *in vivo* é dependente, em grande parte da mesma (27). De um modo geral a substituição iônica na rede cristalina de um material provoca um aumento de defeitos estruturais e distorções na rede que culminam na alteração de propriedades como solubilidade, estabilidade térmica e reatividade superficial da hidroxiapatita. Portanto, seu comportamento *in vitro* e *in vivo* é fortemente alterado pelas substituições. Além da substituição iônica a hidroxiapatita apresenta uma facilidade de variações de estequiometria, ou seja, não apresenta uma composição fixa, sendo sua fórmula melhor definida como:  $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x$

(PO<sub>4</sub>)<sub>6-x</sub> (OH)<sub>2-x</sub>, onde x pode variar de 0 a 1, e desta forma a razão molar Ca/P situa-se entre 1.5 a 1.67 (28).

Dentre as propriedades citadas a porosidade parece ser a mais estudada em relação ao processo de reabsorção do material e sua substituição por tecido ósseo. Acredita-se que o tamanho ideal para os poros de um composto de CaP seja semelhante ao do osso esponjoso. Macroporosidade (poros maiores que 50µm) é intencionalmente inserida ao material através da adição de substâncias voláteis, principalmente polímeros, antes do processo de sinterização. Gauthier *et al.* (1999), demonstraram que macroporos de cerca de 560µm são mais favoráveis a neoformação que poros de 300µm (29). Já a microporosidade (poros menores que 10µm) é consequência do processo de sinterização, dependendo da temperatura atingida e do tempo de duração do processo. Já foi demonstrado que a microporosidade permite a circulação de fluídos corporais no interior do material, enquanto a macroporosidade fornece um substrato para a colonização celular osteogênica, sendo ambas as características desejáveis para a formação de tecido ósseo. Poucos materiais disponíveis preservam tanto macro quanto microporosidades (30).

Atualmente, biomateriais fabricados de HA que apresentam alta porosidade e interconectividade dos poros são utilizados clinicamente (11, 15, 31). Contudo, é necessário desenvolver uma forma simples e reproduzível para melhorar a superfície bioativa de HA, modificando a relação Ca/P da sua superfície nanoestruturada. Uma superfície bioativa com uma relação Ca/P menor do que 1 não é adequada para implantação no corpo por causa da sua elevada solubilidade e acidez (11) e, portanto, foi proposto que a camada superficial de HA (relação Ca/P = 1.67) deve ser modificada para mimetizar o de beta-tricalciofosfato (β-TCP; taxa Ca/P = 1.50) (32, 33). Dorozhkin (1997), ilustrou o processo de solubilização, o equilíbrio entre a superfície da HA e as soluções aquosas, e a interação entre os organismos e a superfície da HA (34). Durante o processo de dissolução da HA a composição da superfície muda para Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (fosfato tricálcico, TCP) e CaHPO<sub>4</sub> (fosfato bicálcico diidratado, DCPD).

Bertazzo *et al.* (2010) propuseram que as três fases iniciais da dissolução, que ocorrem antes do equilíbrio, são estabelecidas entre a superfície da HA e fluídos biológicos, formando o composto DCPD na sua superfície (35). Após a realização do equilíbrio na superfície, seguem os passos que iniciam a integração da superfície da HA ao tecido, como a absorção de proteínas e adesão celular. O procedimento de condicionamento ácido proposto pelos autores altera a taxa Ca/P da superfície pela aplicação direta de ácido fosfórico 30% (35), promove a bioatividade da superfície, mimetizando as fases iniciais da reação. A relação entre a velocidade de neoformação óssea e de reabsorção do biomaterial é de extrema importância na obtenção do substituto ósseo ideal. Apesar de haver estudos *in vitro* na literatura demonstrando a melhora das propriedades de adesão celular e taxa de reabsorção da HA após o condicionamento com ácido fosfórico 30% durante 10 minutos (36), não há nenhum estudo que teste estas propriedades utilizando um modelo experimental *in vivo*.

Diversas formas de HA já foram estudadas em relação as suas propriedades, sendo evidenciado que as formas densas apresentam lenta degradação ao longo do tempo. Também é estabelecido que porosidade, cristalinidade, tamanho e forma das partículas são fatores que alteram a velocidade de degradação deste biomaterial (37, 38). Em um estudo conduzido por Modenfeld *et al.* (2010), foram realizados procedimentos cirúrgicos de implantação de hidroxiapatita bovina para aumento do volume ósseo em seios maxilares. Biópsias para analisar o material foram realizadas aos seis meses e onze anos de acompanhamento com o objetivo de compara o tamanho das partículas do biomaterial implantado. O resultado encontrado demonstrou que as partículas mantiveram sua estabilidade dimensional (39). Outro estudo realizado por Hong *et al.* (2014), em cachorros, onde foram realizadas preservações de alvéolos pós-extrações com diferentes tipos de biomateriais à base de CaP, em um acompanhamento de 8 semanas demonstrou mais uma vez a estabilidade dimensional da hidroxiapatita ao longo do tempo experimental. Nesse estudo o  $\beta$ -tricálciofosfato foi quase totalmente reabsorvido ao longo do tempo e o fosfato de cálcio bifásico permaneceu em uma posição intermediária (40). Biomateriais

de rápida reabsorção tem se demonstrado ineficientes em manter o volume ósseo desejado no processo de reparo ósseo (41), contudo, biomateriais de baixa reabsorção retardam o processo de reparo ósseo atrasando a neoformação óssea (42, 43).

A hidroxiapatita tem se demonstrado um biomaterial de grande relevância para reconstruções ósseas e a busca por uma melhor performance clínica deste material é objeto de muitos estudos. Diversas características deste material têm sido alteradas na busca desta melhora, como a taxa Ca/P, a cristalinidade e a porosidade. Estudos associam a HA com outros biomateriais objetivando favorecer as propriedades de osteoindução (44-46). Apesar do grande progresso, ainda há potencial para grandes avanços nas pesquisas que avaliam os fosfatos de cálcio, especialmente no que se refere: a melhora do desempenho mecânico das biocerâmicas; o reforço da bioatividade baseado em mecanismos de engenharia tecidual; a aplicação como carreadores de agentes biológicos; o desenvolvimento de biomateriais mimetizando os tecidos orgânicos. Além disso, ainda há necessidade de se compreender melhor seus efeitos nos sistemas biológicos (11).

Um modelo animal adequado para testar biomateriais deve oferecer facilidade de manuseio tanto no preparo quanto no controle pós-operatório. O tamanho dos animais deve permitir a realização de defeitos ósseos de dimensões adequadas para serem preenchidos com biomaterial (47, 48). Os tecidos bucais apresentam resposta específica(49, 50) e poucos estudos na literatura testam a resposta de biomateriais nas estruturas bucais, utilizando o rato como modelo animal (48, 50).

Com a finalidade de contribuir para o desenvolvimento de substitutos ósseos que apresentem propriedades semelhantes ao enxerto autógeno e superem suas limitações, este estudo avalia o comportamento de duas hidroxiapatitas com diferentes taxas de Ca/P frente a estimulação do reparo ósseo *in vivo*, em um modelo experimental animal.

## **2 Objetivo Geral**

Comparar o reparo ósseo de defeitos criados em maxila preenchidos com uma hidroxiapatita com taxa Ca/P modificada em quatro diferentes tempos experimentais (15, 30, 60 e 90 dias pós-operatórios), utilizando um modelo *in vivo*. Hidroxiapatita sinterizada foi utilizada como controle.

### **2.1 Objetivos Específicos**

- 1) Avaliar o reparo ósseo associado a aplicação dos biomateriais através da análise histológica semi-quantitativa.
- 2) Quantificar o volume ósseo e densidade óssea através de MicroCT.
- 3) Caracterizar o material através da MEV.

### **3 Artigo**

O artigo foi formatado para ser submetido no periódico *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*.

AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS CRIADOS EM MAXILA E  
PREENCHIDOS COM HIDROXIAPATITA COM TAXA CA/P MODIFICADA.  
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.

**Resumo**

Estudos prévios, *in vitro*, sugerem que a modificação da superfície bioativa de uma hidroxiapatita sinterizada (HA) pela alteração de sua taxa de cálcio/fosfato (Ca/P) poderia favorecer o processo de reparo ósseo. Este estudo testou uma hidroxiapatita com taxa Ca/P modificada (HAM) pelo tratamento ácido de sua superfície em um modelo experimental *in vivo*. Os 52 ratos foram submetidos a confecção de defeitos ósseos em maxila, sendo utilizado um implante de HAM no lado direito e, como controle, uma HA no lado esquerdo. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 tempos pós-cirúrgicos (15, 30, 60 e 90 dias), sendo mortos nos respectivos tempos. Avaliou-se através de análise histológica, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microtomografia computadorizada (MicroCT). Na análise histológica, o grupo da HAM apresentou maior neoformação óssea que o grupo da HA ( $p = 0.009$ ). A análise de densidade óssea por meio de MicroCT mostrou um aumento na densidade óssea ao longo do tempo experimental para o grupo da HAM ( $p = 0.0042$ ), não observado no grupo da HA. Na MEV verificou-se o aumento da microporosidade da HAM. A alteração da taxa Ca/P através do condicionamento ácido da hidroxiapatita influenciou positivamente o reparo com uma maior neoformação óssea ao longo do tempo.

Palavras-chave: Substitutos Ósseos; Materiais Biomcompatíveis; Regeneração Óssea; Modelos Animais.

## Introdução

A hidroxiapatita (HA) é um dos biomateriais a base de fosfato de cálcio (CaP) mais utilizados para procedimentos de ganho de volume ósseo, tanto em pesquisas, quanto clinicamente. Devido a sua versatilidade na Odontologia, as apatitas podem ser utilizadas em diferentes formulações, configurações e forma (1). Dentre os fosfatos de cálcio, a HA é o mais estável em um pH fisiológico. A sua reabsorção ocorre por meio de dissolução e fagocitose (2-6), e dependem de vários parâmetros como cristalinidade, porosidade, pureza química e rugosidade da superfície (7).

Atualmente, biomateriais fabricados de HA que apresentam alta porosidade e interconectividade dos poros são utilizados clinicamente (7-9). Contudo, é necessário desenvolver uma forma simples e reproduzível para melhorar a superfície bioativa da HA, modificando a relação Ca/P da sua superfície. Uma superfície com uma relação Ca/P menor do que 1 não é adequada para implantação no corpo por causa da sua elevada solubilidade e acidez (7) e, portanto, foi proposto que a camada superficial de HA (relação Ca/P = 1.67) deva ser modificada para mimetizar o de fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) (relação Ca/P = 1.50) (10, 11).

O procedimento de condicionamento, alterando a taxa Ca/P da superfície, pela aplicação direta de ácido fosfórico 30%, foi proposta por Bertazzo *et al.* (12). A modificação favorece a bioatividade da superfície, mimetizando as fases iniciais da reação de dissolução da HA em fluídos biológicos.

O objetivo deste estudo é avaliar o reparo ósseo em defeitos cirurgicamente criados em osso alveolar associados às raízes mesiais dos primeiros molares superiores preenchidos por HA sinterizada modificada (taxa Ca/P = 1.5) e HA sinterizada pura (taxa Ca/P = 1.67), baseado na análise histológica, microtomografia computadorizada (MicroCT) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

## **Materiais e Métodos**

### **Animais**

A amostra foi de 52 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Cepa Wistar), adultos, com peso médio 500 gramas e 6 meses de idade. O número amostral foi calculado através do software Winpepi versão 11.25, com um nível de significância de 5%, poder da amostra de 80%. Os animais foram separados aleatoriamente em 4 grupos, com 13 animais em cada, de acordo com os tempos pós-operatórios de 15, 30, 60, e 90 dias (Fluxograma 1). Todos os animais receberam ração comercial e água *ad libitum* ao longo do experimento. Foram alojados sob iluminação 12h claro/ 12h escuro. Condições de temperatura e umidade em ambiente de clima controlado.

### **Hidroxiapatitas**

Foram utilizadas neste estudo hidroxiapatitas sinterizadas obtidas de acordo com a técnica de aspensão em chamas (13). A hidroxiapatita sinterizada pura (HA) apresentava taxa Ca/P = 1.67 e a hidroxiapatita sinterizada modificada exibiu taxa Ca/P = 1.5. Essa última, condicionada com ácido fosfórico 30% por dez minutos, conforme protocolo de Abe *et al.*(14).

### **Protocolo Cirúrgico**

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal com cloridrato de ketamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilazina (25 mg/kg). A anestesia geral foi mantida com isoflurano 1-2V% vaporizado em oxigênio 100%. O animal foi colocado em decúbito dorsal sobre uma mesa pré-aquecida. A cavidade bucal foi preparada com solução de digluconato de clorexidina 0,12% e realizada infiltração local de anestésico cloridrato de lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000. Foi realizada uma incisão intrasulcular, na região palatina do primeiro molar superior esquerdo estendendo-se para porção anterior do rebordo alveolar, seguida da sindesmotomia. Com auxílio de uma broca esférica de aço inoxidável nº3 ativada por um motor elétrico em baixa rotação, sob irrigação constante, foi confeccionada um defeito ósseo que promoveu a exposição da raiz mesial do primeiro molar superior, conforme protocolo de Paris (2003) (15). O preenchimento do defeito ósseo foi realizado com HA. A sutura foi realizada com fio de polipropileno 6-0. O mesmo procedimento foi empregado para

implantação da HAM no lado direito (Figura 1). Os animais receberam analgesia pós-operatória com morfina (5 mg/kg). Procedimentos perioperatórios foram realizados por um médico veterinário. Os autores realizaram as intervenções cirúrgicas.

### **Morte**

Após 15, 30, 60 e 90 dias, os animais foram mortos por sobredose anestésica de isoflurano até atingir efeito de parada cardiorrespiratória, confirmada por veterinário (16). Em seguida foi realizada a ressecção da maxila que foi fixada em formalina neutra tamponada 10% por 48h para conservação da peça.

### **Análise Histológica**

A descalcificação foi feita em ácido nítrico 5%, com trocas diárias. Uma vez descalcificadas, as maxilas foram divididas sagitalmente até alcançar a parte mais central dos defeitos cirurgicamente criados. Após, foi realizado o processamento e a inclusão em parafina. Os cortes foram de 4 µm de espessura e as lâminas coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE).

A análise semi-quantitativa foi realizada por um patologista cego e calibrado para as condições experimentais. O sistema de escore utilizado apresentasse na tabela 1.

### **Microtomografia Computadorizada (MicroCT)**

Cinco animais do grupo experimental de 90 dias foram utilizados para as análises longitudinais (15, 30, 60 e 90 dias pós-operatórios). Para a obtenção de imagens, os animais foram anestesiados com inalação de isoflurano (indução: 2,5-4%; manutenção: 1,5-2,5%). Os animais anestesiados foram colocados em decúbito ventral. A duração do exame foi de 15 minutos em média, e o tempo total necessário desde a indução anestésica até o retorno à gaiola foi de 30 minutos.

O crânio de cada animal foi posicionado no centro do campo de visão e escaneado pelo equipamento de MicroCT Triumph II XOCT® (TriFoil Imaging, Chatsworth, CA), observando os seguintes parâmetros de aquisição: voltagem no tubo de 80 kVp, tamanho de ponto focal de 50µm, campo de visão de 80mm, binning 2x2 e tamanho de imagem de 1184x1120, ampliação 1.6x, número de projeção foi de 512. As imagens foram reconstruídas através de um software Triumph XOCT® (TriFoil Imaging, Chatsworth, CA) em todas as dimensões espaciais.

A análise do comportamento dos biomateriais foi baseada nas sequências de imagens de MicroCT, obtidas com espaçamento de 0,16mm no formato DICOM nos três planos (sagital, coronal e transversal) ao longo do eixo axial dos indivíduos (0,160 pixel size). As imagens foram processadas no software Mimics® para a identificação e renderização das estruturas em 3D, bem como para a tomada de medidas de volume e densidade (Hounsfield units, HU).

### **Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

As peças foram fixadas, desidratadas e secas. Seguiu-se a metalização em ouro para a aquisição das imagens. Foram utilizadas quatro peças (uma de cada tempo: 15, 30, 60, 90 dias pós-operatórios). O equipamento empregado foi um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), modelo XL 30 – Philips em uma tensão de 20 kV. Obtiveram-se imagens de superfície das amostras, usando o método de detecção de elétrons secundários (SE).

### **Análise Estatística**

Para análise estatística dos resultados foi utilizado o software SPSS versão 18. A análise dos resultados histológicos foi realizada através de um modelo de Equações de Estimativas Generalizadas (GEE) para observar diferenças entre os grupos HAM e HA. Para avaliar diferenças dos grupos individualmente ao longo do tempo foi realizado o teste de Análise de Variância (ANOVA) com *post-hoc* de Tuckey para uma significância de 5%. Para a análise intragrupos da MicroCT aplicou-se o teste de Friedman com nível de significância de 5%. Para avaliação do peso dos animais ao longo do experimento foi utilizado ANOVA com significância de 5%.

## **Resultados**

### **Análise Histológica**

A avaliação histológica foi feita por escores para três critérios avaliados: neoformação óssea, atividade osteoclástica e processo inflamatório (Tabela 1). A análise intergrupos foi feita a partir de agrupamento dicotômico dos escores obtidos. Os critérios neoformação óssea e atividade osteoclástica foram agrupados da seguinte maneira: escores 0 e 1, sendo considerados uma resposta insatisfatória ao

tratamento, e escores 2 e 3 como respostas satisfatórias ao tratamento proposto. O critério inflamação foi categorizado como presença ou ausência de inflamação.

O parâmetro neoformação óssea apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p = 0.009$ ) para os materiais utilizados, demonstrando superioridade da HAM para o critério avaliado. Entretanto, para os parâmetros atividade osteoclástica e inflamação não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0.05$ ) entre os diferentes materiais (Figura 3).

Na análise longitudinal intragrupos a HAM apresentou diferença estatisticamente significativa para o parâmetro neoformação óssea, sendo o tempo experimental de 90 dias superior aos tempos de 15 ( $p = 0.014$ ) e 30 dias ( $p = 0.018$ ) para o critério avaliado. Os parâmetros atividade osteoclástica e processo inflamatório não apresentaram diferenças ( $p > 0.05$ ). A HA não apresentou diferença para os parâmetros histológicos avaliados ao longo dos tempos experimentais (Tabela 2).

### **Microtomografia Computadorizada**

O grupo da hidroxiapatita com taxa Ca/P modificada apresentou um aumento crescente na densidade óssea ao longo do estudo, sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $p = 0.042$ ) (Tabela 3). Já para o parâmetro volume não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ao longo do tempo (Figura 4). Para o grupo da HA não houve diferença em nenhum dos parâmetros avaliados. Na avaliação intergrupos não foram encontradas diferenças para os critérios avaliados.

### **Microscopia Eletrônica de Varredura**

Através da análise de MEV observou-se maior porosidade da HAM quando comparada com a HA. As partículas de HA e HAM preencheram adequadamente os defeitos ósseos ao longo dos tempos experimentais (Figura 5).

### **Discussão**

Os estudos pré-clínicos, utilizando modelos animais, proporcionam uma avaliação *in vivo* que favorece e antecede a aplicação de biomateriais em seres humanos.

Características como cálculo amostral, randomização, grupos de comparação e cegamento dos pesquisadores foram observadas nesse estudo e constituem exigências no que se refere às pesquisas envolvendo animais na atualidade. O rato foi empregado como modelo animal, assim como referenciado em outros estudos (17-19), por oferecer facilidade de manuseio tanto no preparo quanto no controle pós-operatório. O tamanho dos animais permitiu a realização de defeitos ósseos associados à estrutura dentária, além da avaliação longitudinal através da MicroCT, condição essa que agregou mais um tipo de análise sem aumento da amostra. Todos os animais mantiveram comportamento e hábitos compatíveis com a normalidade nos períodos experimentais, sendo observado discreto aumento de peso ao longo do estudo. Esse fato demonstra a adaptação dos animais com relação ao procedimento cirúrgico intrabucal realizado. A aplicação da metodologia proposta por Paris (15), permitiu a avaliação do biomaterial na cavidade bucal. Os estudos utilizando implantes em fêmur (20) e calvária (17, 21), não permitem comparação dos resultados, pois o comportamento dos tecidos bucais é diferente de outras áreas do corpo, apresentando mucosa, dentes, ligamento periodontal, esforço mastigatório constante sobre a área operada, além de ser um ambiente potencialmente contaminado. Apesar da dificuldade em delimitar o defeito ósseo devido a anatomia maxilar e dentária os defeitos foram cuidadosamente realizados com broca esférica número 3 para que mantivessem a padronização dimensional.

A HAM mostrou-se um material com maior facilidade de manuseio quando comparada com a HA. A HA com partículas maiores e mais rígidas não permitiu a adequada compactação nos defeitos ósseos de pequenas dimensões e na anatomia da maxila (7), ao contrário dos estudos que utilizam o biomaterial em defeitos ósseos de maiores dimensões, como os realizados em calvária e fêmur (17, 20, 21). Em muitos defeitos ósseos preenchidos com HA foi observada a perda do material, possivelmente deslocado durante os movimentos e incidência de forças mastigatórias na área.

A análise histológica demonstrou o favorecimento da neoformação óssea na presença da HAM quando comparada a HA. Esse achado deve-se possivelmente, à superfície bioativa do material que libera íons que favoreceram o aporte de células osteoprogenitoras, como proposto no estudo de Bertazzo *et al.* (12), garantindo propriedades de osteoindução e osteocondução a esse biomaterial (7, 8). Como nos

achados de Ebina *et al.* (2009), no tempo pós-operatório de 90 dias, observou-se a reestruturação dos tecidos periodontais ao redor do implante de HAM, com reestabelecimento da arquitetura local (17). A observação da tendência de maior atividade osteoclástica, a partir de 30 dias pós-operatórios, para HAM e HA, representa a tentativa das células clásticas em fazer a reabsorção do biomaterial, para posterior substituição do mesmo por tecido ósseo. A não reabsorção das partículas dos dois biomateriais e neoformação óssea associada, após o período de 90 dias, permitiu a manutenção de volume da área reconstruída, situação esta imprevisível quando utilizado o enxerto ósseo autógeno (22, 23). Pouca reação inflamatória foi encontrada, condição já esperada, uma vez que os biomateriais utilizados são biocompatíveis (7, 12, 14, 24). Apesar das limitações do processamento histológico associadas às características dos biomateriais utilizados, o método ainda é o mais empregado para pesquisa e comparação de estudos experimentais *in vivo* (18, 25).

Na análise por MicroCT observou-se um aumento da densidade da HAM ao longo dos tempos experimentais quando comparada à HA. A descalcificação da HAM, decorrente do processo de condicionamento ácido, acelerou a interação do biomaterial com os tecidos, favorecendo a remineralização e consequente aumento de densidade. O volume dos biomateriais não foi alterado significativamente, uma vez que os biomateriais não foram reabsorvidos totalmente.

A análise por MEV mostrou as diferenças de porosidade entre os biomateriais. A microporosidade da HAM, resultante do condicionamento, conforme sugerido por Abe *et al.* (14), favoreceu a adesão celular e consequente neoformação óssea.

As diferentes metodologias de análise empregadas nesta pesquisa permitem concluir que aplicação de HAM (taxa Ca/P = 1.5) resulta em melhor reparo em defeitos ósseos cirurgicamente criados na maxila de ratos, quando comparada a HA sinterizada pura (taxa Ca/P = 1.67). Estudos ainda são necessários para compreender a influência do processo de condicionamento ácido dos fosfatos de cálcio sobre os tecidos vivos. Os resultados aqui apresentados são animadores e contribuem para a continuidade das pesquisas com esses biomateriais.

## **Financiamento**

Esta pesquisa foi financiada pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre(FIPE/HCPA), Porto Alegre, RS, Brasil.

**Conflito de Interesses:** Não

### **Aprovações Éticas**

Este estudo foi aprovado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (GPPG/HCPA) pelo Comitê de Ética Experimental com o número 14-0361. Todos os procedimentos do estudo foram conduzidos de acordo com os Princípios Éticos Brasileiros de Pesquisa Experimental Animal, conforme estabelecido pela Lei 11794 de 8 de Outubro de 2008 (Ato Arouca), e pelos Princípios Éticos de Pesquisa Experimental descritos pelo Laboratório de Ciência Animal (antigo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Foram feitos todos os esforços para minimizar o sofrimento dos animais ao longo do estudo, bem como para usar apenas o número de animais que era essencial para a produção de dados científicos.

### **Agradecimentos:**

Agradecemos às médicas veterinárias Fabíola Schons Meyer e Tuane Garcez, Enfermeira Marta Justina Cioato (HCPA/UFRGS); Samuel Greggio e Gianina Venturim (InsCer/PUCRS); Wagner Prates (LabCEMM/PUCRS).

## Referências

1. Dorozhkin SV. Calcium orthophosphates in dentistry. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2013;24(6):1335-63.
2. Fujita Y, Yamamuro T, Nakamura T, Kotani S, Ohtsuki C, Kokubo T. The bonding behavior of calcite to bone. *Journal of biomedical materials research*. 1991;25(8):991-1003.
3. Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clinical orthopaedics and related research*. 1981(157):259-78.
4. Kotani S, Fujita Y, Kitsugi T, Nakamura T, Yamamuro T, Ohtsuki C, et al. Bone bonding mechanism of beta-tricalcium phosphate. *Journal of biomedical materials research*. 1991;25(10):1303-15.
5. Bhaskar SN, Brady JM, Getter L, Grower MF, Driskell T. Biodegradable ceramic implants in bone. Electron and light microscopic analysis. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1971;32(2):336-46.
6. Walker MM, Katz JL. Evaluation of bonding of bone to inorganic crystal surfaces. *Bulletin of the Hospital for Joint Diseases Orthopaedic Institute*. 1983;43(2):103-8.
7. Dorozhkin SV. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials*. 2010;31(7):1465-85.
8. Hoppe A, Guldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*. 2011;32(11):2757-74.
9. Morita K, Doi K, Kubo T, Takeshita R, Kato S, Shiba T, et al. Enhanced initial bone regeneration with inorganic polyphosphate-adsorbed hydroxyapatite. *Acta biomaterialia*. 2010;6(7):2808-15.
10. Meng S, Zhang Z, Rouabhia M. Accelerated osteoblast mineralization on a conductive substrate by multiple electrical stimulation. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2011;29(5):535-44.
11. Olton D, Li J, Wilson ME, Rogers T, Close J, Huang L, et al. Nanostructured calcium phosphates (NanoCaPs) for non-viral gene delivery: influence of the synthesis parameters on transfection efficiency. *Biomaterials*. 2007;28(6):1267-79.
12. Bertazzo S, Zambuzzi WF, Campos DD, Ogeda TL, Ferreira CV, Bertran CA. Hydroxyapatite surface solubility and effect on cell adhesion. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2010;78(2):177-84.
13. Trommer RMS, L.A.; Bergmann, C.P. Nanostructured hydroxyapatite powders produced by a flame-based technique. *Materials Science and Engineering: C*. 2009;29(6):1770-5.
14. Abe Y, Okazaki Y, Hiasa K, Yasuda K, Nogami K, Mizumachi W, et al. Bioactive surface modification of hydroxyapatite. *BioMed research international*. 2013;2013:626452.
15. PARIS MFO, M. G. ; PURICELLI, E. ; RAMALHO, L. P. Reconstrução de osso alveolar, em área dentada, com uso de hidroxapatita, análise histológica: estudo experimental. *Revista Odonto Ciência*. 2003;18(39):89-98.
16. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. 2013:102.
17. Ebina H, Hatakeyama J, Onodera M, Honma T, Kamakura S, Shimauchi H, et al. Micro-CT analysis of alveolar bone healing using a rat experimental model of critical-size defects. *Oral diseases*. 2009;15(4):273-80.
18. Zecha PJ, Schortinghuis J, van der Wal JE, Nagursky H, van den Broek KC, Sauerbier S, et al. Applicability of equine hydroxyapatite collagen (eHAC) bone blocks

for lateral augmentation of the alveolar crest. A histological and histomorphometric analysis in rats. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2011;40(5):533-42.

19. Oginuma T, Sato S, Udagawa A, Saito Y, Arai Y, Ito K. Autogenous bone with or without hydroxyapatite bone substitute augmentation in rat calvarium within a plastic cap. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*. 2012;114(5 Suppl):S107-13.

20. Renno AC, van de Watering FC, Nejadnik MR, Crovace MC, Zanotto ED, Wolke JG, et al. Incorporation of bioactive glass in calcium phosphate cement: An evaluation. *Acta biomaterialia*. 2013;9(3):5728-39.

21. Bae SY, Park JC, Shin HS, Lee YK, Choi SH, Jung UW. Tomographic and histometric analysis of autogenous bone block and synthetic hydroxyapatite block grafts without rigid fixation on rabbit calvaria. *J Periodontal Implant Sci*. 2014;44(5):251-8.

22. Cosso MG, de Brito RB, Jr., Piattelli A, Shibli JA, Zenobio EG. Volumetric dimensional changes of autogenous bone and the mixture of hydroxyapatite and autogenous bone graft in humans maxillary sinus augmentation. A multislice tomographic study. *Clinical oral implants research*. 2014;25(11):1251-6.

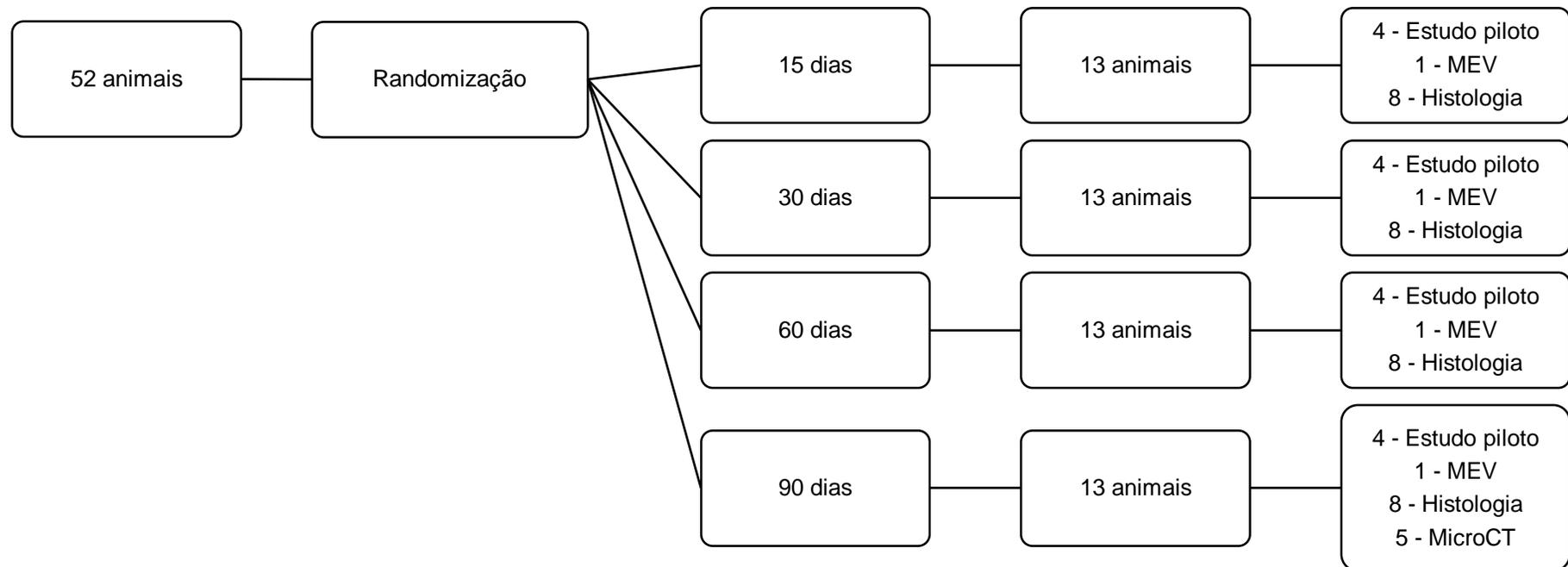
23. Gosain AK, Riordan PA, Song L, Amarante MT, Kalantarian B, Nagy PG, et al. A 1-year study of hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: III. Comparison with autogenous bone graft for facial augmentation. *Plastic and reconstructive surgery*. 2005;116(4):1044-52.

24. Dorozhkin SV. Calcium orthophosphates: occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic applications. *Biomatter*. 2011;1(2):121-64.

25. Yang C, Unursaikhan O, Lee JS, Jung UW, Kim CS, Choi SH. Osteoconductivity and biodegradation of synthetic bone substitutes with different tricalcium phosphate contents in rabbits. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2014;102(1):80-8.

26. Oliveira A, Collares M, Galia C, Edelweiss M, Pinto R, Kneibel L. Comparison between autogenous, deep-frozen homologous, and lyophilized homologous bone grafts in an experimental model of cranioplasty. *Rev Soc Bras Cir Craniomaxilofac* 2007;10(4):7.

Fluxograma 1: Descrição da amostra quanto aos tempos experimentais e os testes realizados.



Fonte: Dados da pesquisa.

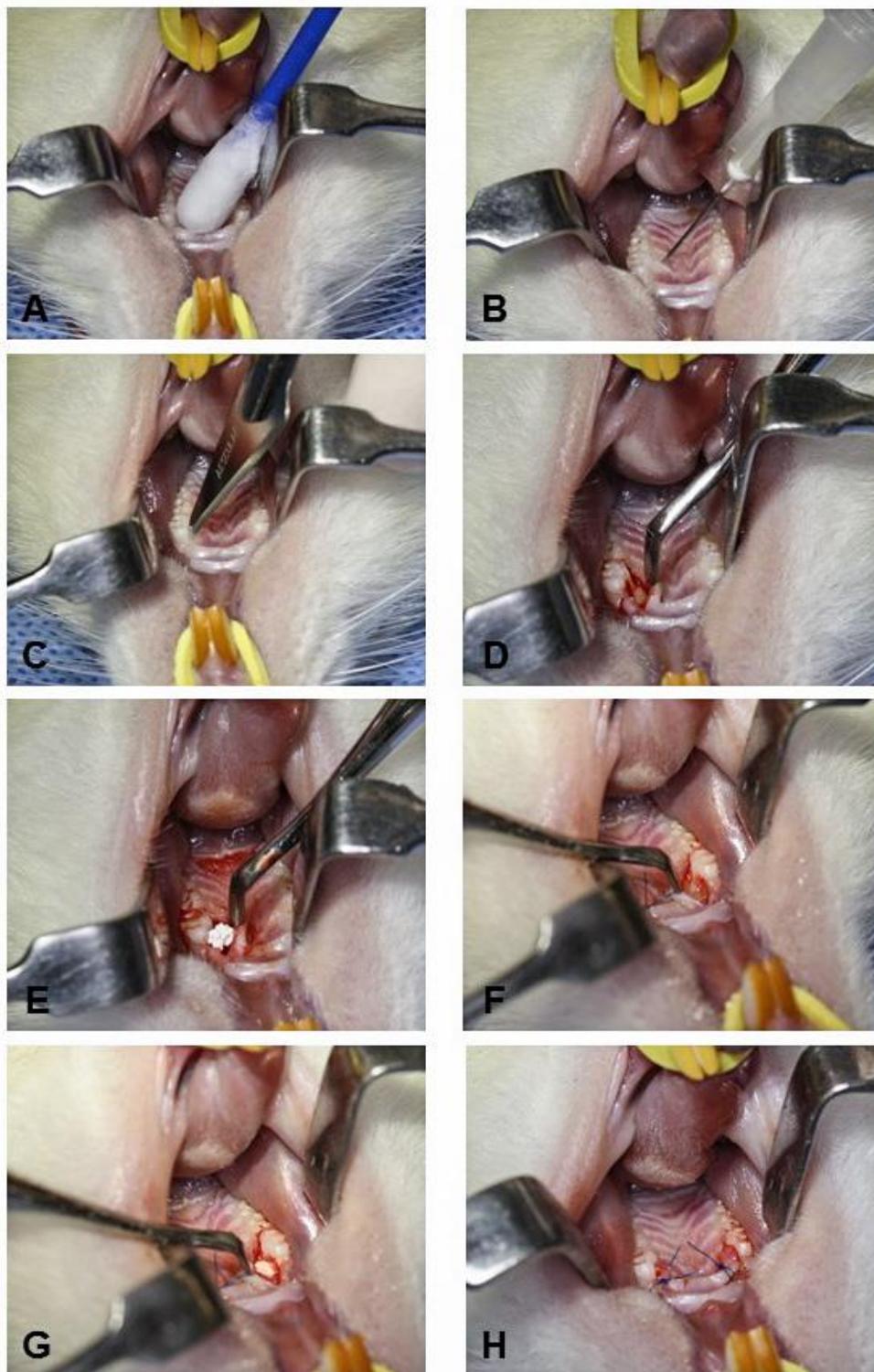


Figura 1. Sequência de procedimentos cirúrgicos. (A) Antissepsia intrabucal; (B) Infiltração com anestésico local na região do primeiro molar superior; (C) Incisão com bisturi montado com lâmina nº11; (D) Defeito ósseo e exposição da raiz mesial do primeiro molar superior esquerdo; (E) Preenchimento do defeito ósseo com HA; (F) Defeito ósseo e exposição da raiz mesial do primeiro molar superior direito; (H) Preenchimento do defeito ósseo com HAM; (H) Aspecto final.

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 1. Sistema de escores semi-quantitativos utilizados para avaliação das lâminas histológicas.

<i>Escore</i>	<i>Neoformação óssea</i>
0	ausência de neoformação óssea
1	reparo ósseo de até 30% do defeito ósseo
2	reparo ósseo de 30% a 70% do defeito ósseo
3	reparo ósseo de 70% a 100% do defeito ósseo

<i>Escore</i>	<i>Atividade osteoclástica</i>
0	Ausência de atividade osteoclástica
1	Presença de osteoclastos em até 30% do material de enxerto
2	Presença de osteoclastos em 30% a 70% do material de enxerto
3	Presença de osteoclastos em 70% a 100% do material de enxerto

<i>Escore</i>	<i>Processo inflamatório</i>
0	Ausência de processo inflamatório
1	Processo inflamatório leve
2	Processo inflamatório moderado
3	Processo inflamatório intenso

Fonte: Adaptado de Oliveira *et al.* (26)

Tabela 2. Análise histopatológica dos defeitos ósseos com os diferentes biomateriais empregados.

	<b>HA</b>			<b>HAM</b>		
	Mediana	(Min-Máx)	n	Mediana	(Min-Máx)	n
<b>Neoformação Óssea</b>						
15 dias	1	(0-2)	3	1a	(1-2)	6
30 dias	2		1	2a	(0-3)	7
60 dias	1	(0-1)	4	2ab	(1-3)	8
90 dias	1	(1-1)	2	3b	(1-3)	7
<b>Atividade Osteoclástica</b>						
15 dias	1	(0-1)	3	1	(1-2)	6
30 dias	2		1	2	(1-3)	7
60 dias	1,5	(1-2)	4	1,5	(1-2)	8
90 dias	2	(1-3)	2	2	(1-2)	7
<b>Processo Inflamatório</b>						
15 dias	0	(0-1)	3	0	(0-1)	6
30 dias	2		1	1	(0-2)	7
60 dias	0	(0-1)	4	0	(0-2)	8
90 dias	0	(0-0)	2	1	(0-3)	7

a b: diferentes letras indicam diferença significativa no teste de ANOVA, seguido por *post-hoc* de Tuckey considerando uma significância de 5%.  
 Fonte: Dados da pesquisa.

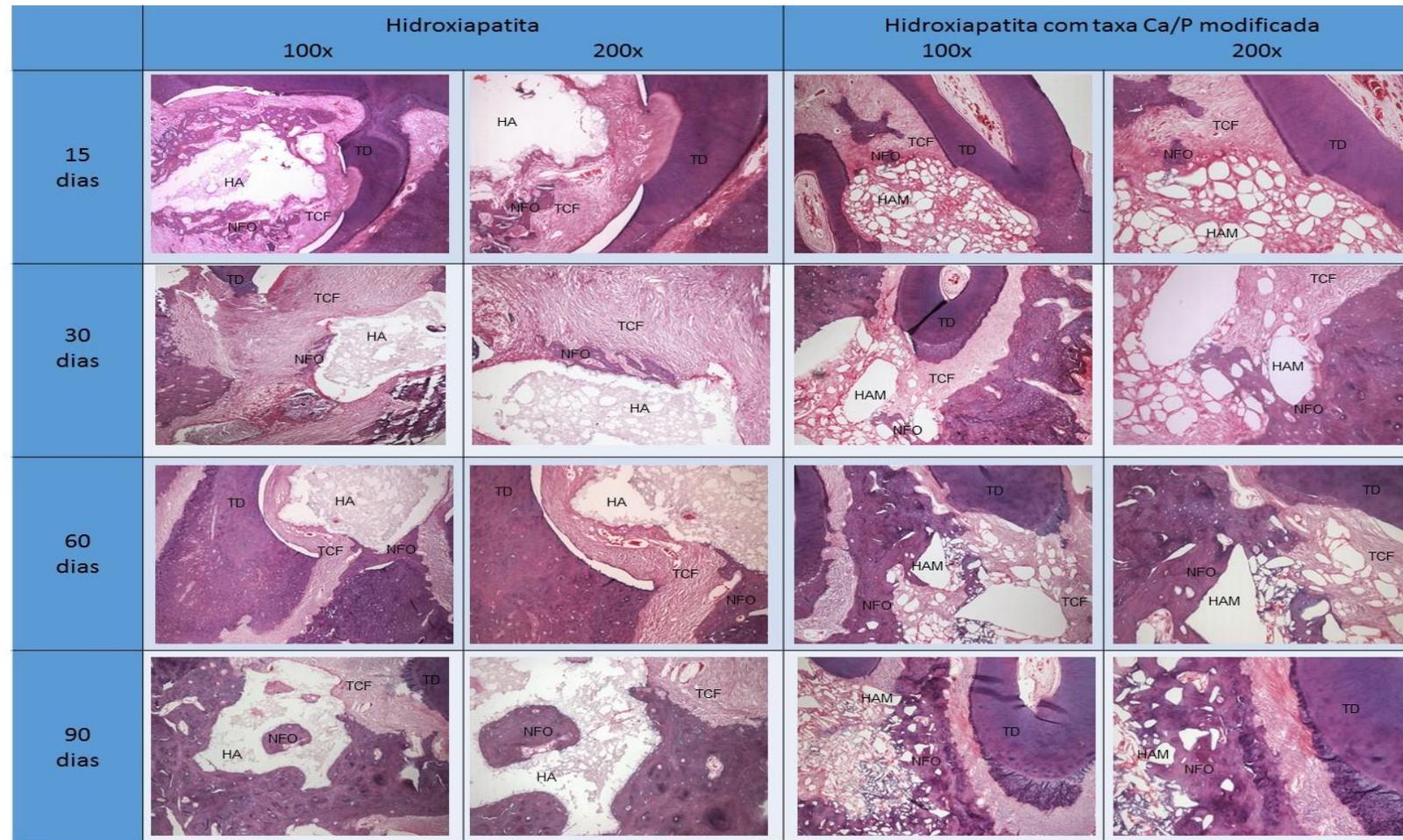


Figura 3. Imagens histológicas coradas por Hematoxilina e Eosina (HE), em aumento de 100x e 200x, de acordo com tempo experimental e preenchimento das cavidades.

Nota: HA: Hidroxiapatita taxa Ca/P 1.67; HAM: Hidroxiapatita com taxa Ca/P 1.5; NFO: Neoformação óssea; TCF: Tecido conjuntivo fibroso; TD: Tecido dentário.

Tabela 3. Comparação das médias (+- desvio padrão) de densidades dos preenchimentos.

<i>Densidade óssea</i>	<i>HA</i>	<i>HAM</i>
<i>15 dias</i>	214589 ( $\pm$ 48479)	214595 ( $\pm$ 18107)
<i>30 dias</i>	230018 ( $\pm$ 33304)	217918 ( $\pm$ 36570)
<i>60 dias</i>	226404 ( $\pm$ 28472)	240024 ( $\pm$ 14813)
<i>90 dias</i>	236462 ( $\pm$ 22030)	259347 ( $\pm$ 17457)
<i>p</i>	0,356	0,042

Nota. Comparação das médias com teste de Friedmann para uma significância de 5%.

Fonte: Dados da pesquisa

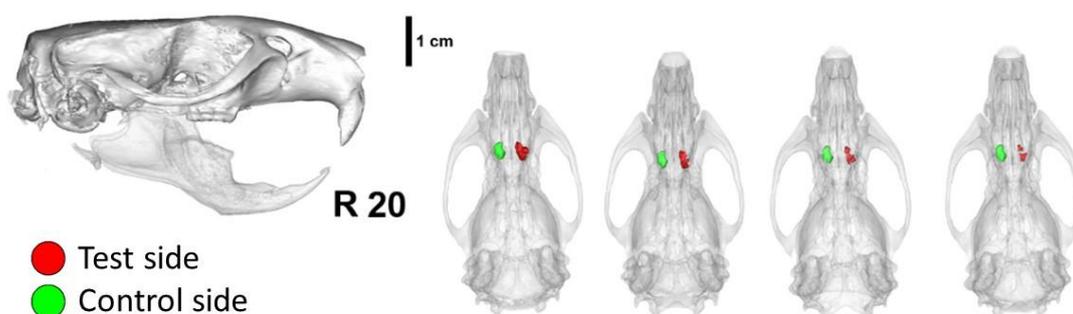


Figura 4. Reconstrução 3D com a representação do volume do preenchimento dos defeitos ósseos no animal com sua evolução temporal (15, 30, 60 e 90 dias pós-operatórios, respectivamente da esquerda para a direita). As cores vermelho e verde representam a HAM e a HA, respectivamente.

Fonte: dados da pesquisa.

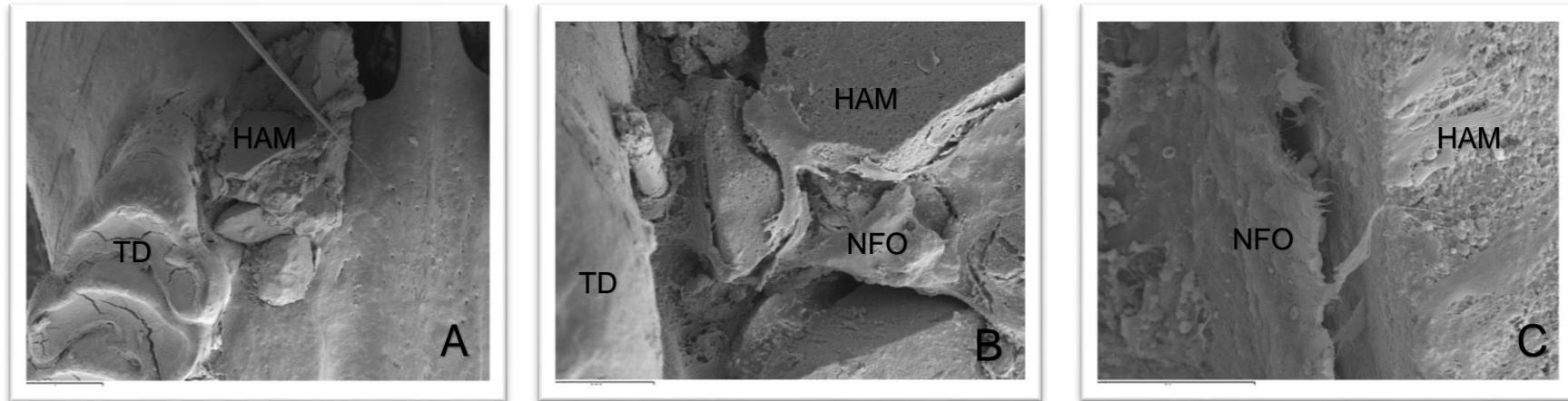


Figura 5. MEV, método de detecção de elétrons secundários (SE) mostrando cavidade preenchida com HAM em animal do grupo de 90 dias em 3 diferentes aumentos (A: 40x; B: 200x; C: 1600x).

Nota: HAM: Hidroxiapatita com taxa Ca/P modificada; TD: Tecido dentário; NFO: Neoformação óssea

Fonte: Dados da Pesquisa

#### 4 Considerações Finais

O grupo dos fosfafos de cálcio apresentam diversas propriedades que encorajam seu uso como substitutos ósseos. Contudo, clinicamente esses biomateriais apresentam limitações, que são motivadoras de pesquisas que objetivam a melhora dos seus resultados clínicos.

A HAM (taxa Ca/P = 1.5) analisada neste estudo mostrou propriedades de osteoindução e osteocondução. A não reabsorção do biomaterial ao longo dos tempos experimentais não prejudicou a evolução do reparo ósseo e favoreceu a manutenção do volume na área reconstruída. Em 15 dias já foi possível visualizar uma discreta neoformação óssea em torno dos cristais de HA e HAM. No grupo da HA, a quantidade de neoformação óssea continuou estável ao longo do tempo, demonstrando limitada capacidade de osteoindução e osteocondução do biomaterial. No grupo da HAM a deposição de matriz óssea continuou a ocorrer. Aos 90 dias a presença de matriz óssea já era detectada em torno dos cristais ao longo de todo o defeito ósseo, confirmando uma maior propriedade de neoformação óssea.

A biocompatibilidade dos materiais foi observada, com baixos escores de processo inflamatório, a partir do tempo de 30 dias pós-operatórios. A análise de MicroCT confirmou os achados histológicos obtidos, mostrando esse ser um bom método para analisar densidade e volume de forma longitudinal. A impossibilidade de padronização do defeito ósseo cirúrgico, bem como a topografia da maxila, nesse estudo, dificultou a análise de MEV.

Os achados encontrados nesse estudo permitem concluir que a HAM apresenta melhores resultados no que se refere a neoformação e densidade ósseas quando comparada a HA. Estudos pré-clínicos ainda são necessários para avaliar os efeitos da modificação da taxa Ca/P a longo prazo nos tecidos vivos.

## Referências

1. Mamidwar SS. Preface: bone graft materials. *Journal of long-term effects of medical implants*. 2010;20(4):269.
2. Misch CM. Maxillary autogenous bone grafting. *Dental clinics of North America*. 2011;55(4):697-713.
3. 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*. 2001;10 Suppl 2:S96-101.
4. Kurz LT, Garfin SR, Booth RE, Jr. Harvesting autogenous iliac bone grafts. A review of complications and techniques. *Spine*. 1989;14(12):1324-31.
5. Hibi H, Yamada Y, Ueda M, Endo Y. Alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered osteogenic material. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2006;35(6):551-5.
6. Johansson B, Grepe A, Wannfors K, Aberg P, Hirsch JM. Volumetry of simulated bone grafts in the edentulous maxilla by computed tomography: an experimental study. *Dento maxillo facial radiology*. 2001;30(3):153-6.
7. Dai KR, Xu XL, Tang TT, Zhu ZA, Yu CF, Lou JR, et al. Repairing of goat tibial bone defects with BMP-2 gene-modified tissue-engineered bone. *Calcified tissue international*. 2005;77(1):55-61.
8. Mussano F, Ciccone G, Ceccarelli M, Baldi I, Bassi F. Bone morphogenetic proteins and bone defects: a systematic review. *Spine*. 2007;32(7):824-30.
9. Gosain AK, Persing JA. Biomaterials in the face: benefits and risks. *The Journal of craniofacial surgery*. 1999;10(5):404-14.
10. Gosain AK, Riordan PA, Song L, Amarante MT, Kalantarian B, Nagy PG, et al. A 1-year study of hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: III. Comparison with autogenous bone graft for facial augmentation. *Plastic and reconstructive surgery*. 2005;116(4):1044-52.
11. Dorozhkin SV. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials*. 2010;31(7):1465-85.
12. Day RM. Bioactive glass stimulates the secretion of angiogenic growth factors and angiogenesis in vitro. *Tissue engineering*. 2005;11(5-6):768-77.
13. Wang H, Li Y, Zuo Y, Li J, Ma S, Cheng L. Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2007;28(22):3338-48.
14. Dujovny M, Aviles A, Anger C. An innovative approach for cranioplasty using hydroxyapatite cement. *Surgical neurology*. 1997;48(3):294-7.
15. Hoppe A, Guldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*. 2011;32(11):2757-74.
16. Jackson IT, Yavuzer R. Hydroxyapatite cement: an alternative for craniofacial skeletal contour refinements. *British journal of plastic surgery*. 2000;53(1):24-9.
17. Ogata K, Imazato S, Ehara A, Ebisu S, Kinomoto Y, Nakano T, et al. Comparison of osteoblast responses to hydroxyapatite and hydroxyapatite/soluble calcium phosphate composites. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2005;72(2):127-35.

18. Annaz B, Hing KA, Kayser M, Buckland T, Di Silvio L. Porosity variation in hydroxyapatite and osteoblast morphology: a scanning electron microscopy study. *Journal of microscopy*. 2004;215(Pt 1):100-10.
19. Neovius E, Engstrand T. Craniofacial reconstruction with bone and biomaterials: review over the last 11 years. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS*. 2010;63(10):1615-23.
20. Lim KT, Suh JD, Kim J, Choung PH, Chung JH. Calcium phosphate bioceramics fabricated from extracted human teeth for tooth tissue engineering. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2011;99(2):399-411.
21. Dorozhkin SV. Calcium orthophosphates in dentistry. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2013;24(6):1335-63.
22. Fujita Y, Yamamuro T, Nakamura T, Kotani S, Ohtsuki C, Kokubo T. The bonding behavior of calcite to bone. *Journal of biomedical materials research*. 1991;25(8):991-1003.
23. Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clinical orthopaedics and related research*. 1981(157):259-78.
24. Kotani S, Fujita Y, Kitsugi T, Nakamura T, Yamamuro T, Ohtsuki C, et al. Bone bonding mechanism of beta-tricalcium phosphate. *Journal of biomedical materials research*. 1991;25(10):1303-15.
25. Bhaskar SN, Brady JM, Getter L, Grower MF, Driskell T. Biodegradable ceramic implants in bone. Electron and light microscopic analysis. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1971;32(2):336-46.
26. Walker MM, Katz JL. Evaluation of bonding of bone to inorganic crystal surfaces. *Bulletin of the Hospital for Joint Diseases Orthopaedic Institute*. 1983;43(2):103-8.
27. Dorozhkin SV, Epple M. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angewandte Chemie*. 2002;41(17):3130-46.
28. Martin RI, Brown PW. Aqueous formation of hydroxyapatite. *Journal of biomedical materials research*. 1997;35(3):299-308.
29. Gauthier O, Bouler JM, Weiss P, Bosco J, Daculsi G, Aguado E. Kinetic study of bone ingrowth and ceramic resorption associated with the implantation of different injectable calcium-phosphate bone substitutes. *Journal of biomedical materials research*. 1999;47(1):28-35.
30. Le Guehennec L, Layrolle P, Daculsi G. A review of bioceramics and fibrin sealant. *European cells & materials*. 2004;8:1-10; discussion -1.
31. Morita K, Doi K, Kubo T, Takeshita R, Kato S, Shiba T, et al. Enhanced initial bone regeneration with inorganic polyphosphate-adsorbed hydroxyapatite. *Acta biomaterialia*. 2010;6(7):2808-15.
32. Meng S, Zhang Z, Rouabhia M. Accelerated osteoblast mineralization on a conductive substrate by multiple electrical stimulation. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2011;29(5):535-44.
33. Olton D, Li J, Wilson ME, Rogers T, Close J, Huang L, et al. Nanostructured calcium phosphates (NanoCaPs) for non-viral gene delivery: influence of the synthesis parameters on transfection efficiency. *Biomaterials*. 2007;28(6):1267-79.
34. Dorozhkin SV. Surface Reactions of Apatite Dissolution. *Journal of colloid and interface science*. 1997;191(2):489-97.

35. Bertazzo S, Zambuzzi WF, Campos DD, Ogeda TL, Ferreira CV, Bertran CA. Hydroxyapatite surface solubility and effect on cell adhesion. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2010;78(2):177-84.
36. Abe Y, Okazaki Y, Hiasa K, Yasuda K, Nogami K, Mizumachi W, et al. Bioactive surface modification of hydroxyapatite. *BioMed research international*. 2013;2013:626452.
37. Gosain AK, Riordan PA, Song L, Amarante MT, Kalantarian B, Nagy PG, et al. A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part II. Bioengineering implants to optimize bone replacement in reconstruction of cranial defects. *Plastic and reconstructive surgery*. 2004;114(5):1155-63; discussion 64-5.
38. Klein CP, Driessen AA, de Groot K. Relationship between the degradation behaviour of calcium phosphate ceramics and their physical-chemical characteristics and ultrastructural geometry. *Biomaterials*. 1984;5(3):157-60.
39. Mordenfeld A, Hallman M, Johansson CB, Albrektsson T. Histological and histomorphometrical analyses of biopsies harvested 11 years after maxillary sinus floor augmentation with deproteinized bovine and autogenous bone. *Clinical oral implants research*. 2010;21(9):961-70.
40. Hong JY, Lee JS, Pang EK, Jung UW, Choi SH, Kim CK. Impact of different synthetic bone fillers on healing of extraction sockets: an experimental study in dogs. *Clinical oral implants research*. 2014;25(2):e30-7.
41. Araujo MG, Lindhe J. Socket grafting with the use of autologous bone: an experimental study in the dog. *Clinical oral implants research*. 2011;22(1):9-13.
42. Araujo M, Linder E, Wennstrom J, Lindhe J. The influence of Bio-Oss Collagen on healing of an extraction socket: an experimental study in the dog. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2008;28(2):123-35.
43. Carmagnola D, Adriaens P, Berglundh T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss. *Clinical oral implants research*. 2003;14(2):137-43.
44. Kim BS, Yang SS, Yoon JH, Lee J. Enhanced bone regeneration by silicon-substituted hydroxyapatite derived from cuttlefish bone. *Clinical oral implants research*. 2015.
45. Santana RB, Santana CM. A clinical comparison of guided bone regeneration with platelet-derived growth factor-enhanced bone ceramic versus autogenous bone block grafting. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2015;30(3):700-6.
46. Lim HC, Song KH, You H, Lee JS, Jung UW, Kim SY, et al. Effectiveness of biphasic calcium phosphate block bone substitutes processed using a modified extrusion method in rabbit calvarial defects. *J Periodontal Implant Sci*. 2015;45(2):46-55.
47. Sun J, Xu Y, Chen Z. Establishment of a rat model for alveolar cleft with bone wax. *J Oral Maxillofac Surg*. 2015;73(4):733 e1-10.
48. PARIS MFO, M. G. ; PURICELLI, E. ; RAMALHO, L. P. Reconstrução de osso alveolar, em área dentada, com uso de hidroxiapatita, análise histológica: estudo experimental. *Revista Odonto Ciência*. 2003;18(39):89-98.
49. Maia LP, Reino DM, Muglia VA, Almeida AL, Nanci A, Wazen RM, et al. Influence of periodontal tissue thickness on buccal plate remodelling on immediate implants with xenograft. *Journal of clinical periodontology*. 2015;42(6):590-8.

50. Yang Y, Rossi FM, Putnins EE. Periodontal regeneration using engineered bone marrow mesenchymal stromal cells. *Biomaterials*. 2010;31(33):8574-82.