

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

MARIA CLARA CORRÊA DE ALMEIDA TEIXEIRA

**NANOBIOMATERIAL NA ENGENHARIA TECIDUAL: AVALIAÇÃO DA
CARBOPATITA NANOMÉTRICA PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA**

**Alfenas/MG
2018**

MARIA CLARA CORRÊA DE ALMEIDA TEIXEIRA

**NANOBIOMATERIAL NA ENGENHARIA TECIDUAL: AVALIAÇÃO DA
CARBOPATITA NANOMÉTRICA PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas - da UNIFAL-MG. Área de concentração: Odontologia.

Orientador: Professor Doutor Tomaz Henrique Araújo

Co-orientador: Professor Doutor Ronaldo Célio Mariano

**Alfenas/MG
2018**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Teixeira, Maria Clara Corrêa de Almeida
T266n Nanobiomaterial na engenharia tecidual: avaliação da carboapatita
nanométrica para regeneração óssea / Maria Clara Corrêa de Almeida Teixeira
– Alfenas/MG, 2018.
101.: il. -

Orientador: Tomaz Henrique Araújo.
Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade Federal
de Alfenas, 2018
Bibliografia.

1. Regeneração Óssea. 2. Engenharia Biomédica. 3. Transplante Ósseo.
4. Tomografia Computadorizada por Raios X. 5. Materiais Biocompatíveis.
I. Araújo, Tomaz Henrique. II. Título.

CDD-617.605



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



MARIA CLARA CORRÊA DE ALMEIDA TEIXEIRA

NANOBIOMATERIAL NA ENGENHARIA TECIDUAL: AVALIAÇÃO DA CARBOA-PATITA NANOMÉTRICA PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA

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

Aprovada em: 06 / 03 / 2018

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

Assinatura:

Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura:

Profa. Dra. Wagner Costa Rossi Júnior
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura:

Dedico este trabalho a Deus, por guiar e iluminar meu caminho. Aos meus familiares pelo apoio incondicional. Aos amigos e professores, por me ensinarem as lições além da ciência.

AGRADECIMENTOS

A DEUS,

Toda honra e glória. A fé e a perseverança me mantiveram firme no meu propósito, mesmo em dias de desânimo, não pestanejei. Cada dia que passa sinto o cuidado de Deus em me colocar aqui, exatamente onde estou, em busca do saber e do entendimento das coisas que Ele mesmo criou. Agradeço pela oportunidade de ter em meu caminho tantas pessoas incríveis. Acredito que não haja coincidência, todos nós cruzamos o caminho uns dos outros com propósitos especiais, e Deus cuidou de cada detalhe para que toda a nossa trajetória fosse repleta de carinho e cumplicidade.

A MINHA FAMÍLIA,

Meus pais, **Francisco e Beatriz**, muito obrigada por abraçarem todos os sonhos comigo. Sem o amor de vocês eu não teria forças para lutar. Obrigada por me ensinarem a querer sempre melhorar, buscar o melhor, com humildade e vontade, lutamos e realizamos.

Minha irmã **Maria Luíza**, obrigada por compartilhar comigo todos os momentos de ansiedade e dúvidas, questionamentos e alegrias.

Ao **Noé**, meu esposo e mestre, maior incentivador para que eu escolhesse este caminho. Obrigada pela parceria em todos os projetos da vida. Você acreditou e me mostrou que eu era capaz. Obrigada pelo apoio incondicional, e por todos os ensinamentos que me fizeram refletir sobre a essência da Odontologia.

Ao **Noah**, razão de tudo. De todos os meus sonhos, você é o maior e melhor presente de Deus.

A todos os **meus familiares**, obrigada pelas orações e desejos de sucesso.

À UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS,

A universidade que me acolheu e me transformou. Aqui conheci pessoas essenciais na minha formação como cirurgiã-dentista, mas sobretudo, pessoas que me mostraram o verdadeiro “SER” humano. Sou eternamente grata por ter sido escolhida por esta universidade, floresci aqui, descobri e estou descobrindo o melhor que eu posso ser. Muito obrigada Unifal-MG!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, Prof. DR. TOMAZ HENRIQUE ARAÚJO,

Obrigada por confiar em mim, acreditar no nosso projeto e me estimular a desenvolver o meu lado docente. É um privilégio enorme ser sua orientada neste mestrado. Nossa parceria contribui muito para que eu evolua no saber científico, e com certeza, ainda tenho muito a aprender e a crescer com o senhor.

Ao meu co-orientador, Prof. DR. RONALDO CÉLIO MARIANO,

Não tenho palavras para expressar o tamanho da minha gratidão. Obrigada por toda a dedicação e disponibilidade em fazer este trabalho acontecer. Sem sua parceria e amizade eu não conseguiria. Obrigada por instigar o meu lado questionador e por me incentivar a amar a pesquisa. É uma honra para mim trabalhar ao lado do senhor, na pesquisa, nas aulas, na clínica. Os seus ensinamentos foram essenciais para a minha completa formação, seja no título de mestre, seja na pessoa “Maria”, afinal, em grandes corações sempre vem grandes lições! Muito obrigada.

À PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ODONTOLÓGICAS,

O meu agradecimento especial a todos os professores e funcionários, tanto conhecimento a ser buscado, tanta informação a ser dividida, tanta amizade e trabalho em nome dos nossos pacientes e do futuro da Odontologia. Sou assertiva em dizer que este Mestrado mudou a minha vida. Mudou o modo como eu enxergo a ciência, como eu vejo a odontologia, como valorizo e respeito os pacientes, como busco o conhecimento. Ingressei uma pessoa, e aos poucos vocês me ensinaram a ser melhor, mais alegre, mais confiante, mais estudiosa, mais paciente. Obrigada de coração!

AO CNPEM, nas pessoas de Rúbia e Bruna,

Pela contribuição na realização das microtomografias.

AO BIOTÉRIO CENTRAL DA UNIFAL-MG,

Obrigada a todos os funcionários pela ajuda e parceria. Em especial, à médica-veterinária **ÉRIKA INCERPI**, sempre disposta a me orientar no manejo com os animais, me auxiliar na metodologia da pesquisa, e sobretudo, à doar carinho àqueles que tiveram suas vidas sublimadas em nome da ciência.

AOS FUNCIONÁRIOS DO LABORATÓRIO DE MORFOLOGIA DO ICB,

Obrigada pela companhia , amizade e auxílio na parte histológica envolvendo minha pesquisa.

À todos da CLÍNICA DE CIRURGIA,

Aos alunos, agradeço a amizade e confiança, fomos grandes parceiros na construção do saber. Meus agradecimentos à Val e Daiana, por todo o carinho compartilhado neste ano. À professora Dra. Marina Reis Oliveira, foram muitos os aprendizados. Agradeço cada minuto de experiência ao seu lado, com sua doçura, gentileza, ternura e profissionalismo aprendi a ser uma pessoa melhor e mais dedicada aos meus sonhos.

À PROFESSORA DOUTORA MIRTA MIR, por confiar em nosso trabalho e se disponibilizar a sempre me esclarecer e me fazer compreender os mecanismos físico-químicos da produção do biomaterial.

À TODOS OS MEUS AMIGOS DO MESTRADO 2016,

Vocês tornaram esta jornada leve, alegre, divertida. Além de me ensinarem o saber científico, se tornaram grandes amigos para as tarefas da vida!

Às amigas Camila, Mayara e Ana Paula, meus sinceros agradecimentos por dividirem comigo momentos de muita alegria neste caminho, a amizade de vocês foi um presente abençoado que eu desejo manter para sempre.

Ao Professor Dr. João Adolfo Costa Hanneman, por ser sempre solícito às minhas necessidades na coleta dos dados microscópicos.

Ao Professor Dr. Denismar Alves Nogueira, pela atenção, disponibilidade e paciência em auxiliar nas análises estatísticas deste trabalho.

À Professora Dra. Juliana Santos pelo auxílio na interpretação histológica.

À Professora Dra. Marta Miyazawa, uma pessoa iluminada que Deus me presenteou nesta jornada.

À CAPES,

Pelo auxílio financeiro para que eu pudesse me dedicar integralmente a este projeto.

A todos que estiveram comigo na realização deste sonho, a minha mais sincera gratidão.

*“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”
Mário Quintana – “As utopias”*

RESUMO

As cirurgias reconstrutivas ósseas em odontologia tem sido amplamente utilizadas com a finalidade de viabilizar as cirurgias implantodônticas, aumentando o volume ósseo, bem como a qualidade óssea. Com o intuito de melhorar a qualidade de vida do paciente no pós-operatório, reduzindo os índices de morbidade devido aos dois atos cirúrgicos que ocorrem em enxertos autógenos, a classe dos biomateriais tem ganhado destaque nas reconstruções ósseas. Principalmente os biomateriais sintéticos, que apresentam propriedades bioativas e não possuem antigenicidade. A área da bioengenharia tecidual busca desenvolver biomateriais que se aproximem cada vez mais dos tecidos biológicos naturais, com o intuito de aprimorar a resposta tecidual na formação de um novo tecido. A presente pesquisa propõe uma análise comparativa da neoformação óssea entre a carboapatita nanométrica (HAPNC) e o osso autógeno, considerado padrão ouro para a enxertia óssea. Foram confeccionados defeitos críticos de 6mm em calvária de ratos para observar o comportamento da neoformação óssea frente ao nanobiomaterial sintético HAPNC, observando a formação de osso das margens do defeito para o centro. Os grupos foram divididos em grupo controle negativo: coágulo (COA), n=8; grupo experimental com enxerto da HAPNC, n=16; e grupo controle positivo com osso autógeno (OA), n=16. Foram realizadas análises microtomográficas (micro-CT) para dados morfométricos; análise histológica com hematoxilina e eosina, picrossírios, para análise histomorfométrica e microscopia eletrônica de varredura (MEV) para caracterização morfológica. A HAPNC demonstrou ser um nanobiomaterial capaz de estimular a neoformação de modo eficaz. De acordo com análise histomorfométrica, a HAPNC no período experimental de 30 dias, mostrou ter resultados muito semelhantes relacionado à formação de novo osso comparada ao OA 60 dias ($p=0,0180$). Pela análise de micro-CT observou-se que a quantidade de tecido mineralizado presente no grupo OA foi superior ao grupo HAPNC ($p < 0,05$). Pela caracterização morfológica e dados estatísticos, a HAPNC demonstrou ser promissora na engenharia tecidual para cirurgias ósseas reconstrutivas.

Palavras-chave: regeneração óssea. engenharia tecidual. enxerto ósseo. microtomografia computadorizada. Biomateriais.

ABSTRACT

Bone reconstructive surgeries in dentistry have been widely used for the purpose of enabling implant surgeries, increasing bone volume as well as bone quality. In order to improve the patient's quality of life in the postoperative period, reducing the morbidity rates due to the two surgical acts that occur in autogenous grafts, the biomaterials class has been highlighted in bone reconstructions. Especially the synthetic biomaterials, which present bioactive properties and do not have antigenicity. The area of tissue bioengineering seeks to develop biomaterials that are increasingly close to natural biological tissues, in order to improve the tissue response in the formation of a new tissue. The present study, proposes a comparative analysis of the new bone formation between the carboapatite nanometric (HAPNC) and the autogenous bone, considered gold standard for bone grafting. Critical defects of 6 mm were made in rat calvaria to observe the behavior of the bone neoformation against the synthetic nanobiomaterial HAPNC, observing the bone formation of the margins of the defect to the center. The groups are divided into negative control group: clot (COA), $n = 8$; experimental group with HAPNC graft, $n = 16$; and positive control group with autogenous bone (OA), $n = 16$. Microtomographic analyzes (micro-CT) were performed for morphometric data; histological analysis with hematoxylin and eosin, picosyri, for histomorphometric analysis and scanning electron microscopy for morphological characterization. HAPNC has been shown to be a nanobiomaterial capable of stimulating neoformation effectively. According to histomorphometric analysis, HAPNC in the 30-day experimental period showed very similar results related to the formation of new bone compared to OA 60 days ($p = 0.0180$). By micro-CT analysis it was observed that the amount of mineralized tissue present in the OA group was higher than the HAPNC group ($p < 0.05$). Through the morphological characterization and statistical data, HAPNC has been shown to be promising in tissue engineering for reconstructive bone surgeries.

Key words: bone regeneration. tissue engineering. bone graft. X ray
Microtomography. biocompatible materials.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Criação do defeito crítico com broca trefina 6mm e marcações em “L”	51
Figura 2-	Defeito crítico preenchido com HAPNC e AO.....	52
Figura 3 -	Processamento laboratorial padronizado da redução das peças	55
Figura 4-	Exemplo da pontuação descritiva do fechamento do defeito pela avaliação de superfície do registro microtomográfico	57
Figura 5-	Imagem do Software CTan configurando a imagem a ser analisada	58
Figura 6-	Imagem do software Image Pro Plus utilizado para a coleta de dados	60
Figura 7-	Registros microtomográficos utilizados para avaliação por score.....	63
Figura 8-	Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo COA no período experimental de 30 dias	69
Figura 9-	Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo COA no período experimental de 60 dias	69
Figura 10-	Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo HAPNC no período experimental de 30 dias.....	70
Figura 11-	Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo HAPNC no período experimental de 60 dias	71
Figura 12-	Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo OA no período experimental de 30 dias	72
Figura 13-	Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo OA no período experimental de 60 dias.....	72
Figura 14-	Fotomicrografia dos grupos de tratamento no período de 30 dias (Picrosíríos)	73
Figura 15-	Fotomicrografia dos grupos de tratamento no período de 60 dias (Picrosíríos)	74
Figura 16-	Fotomicrografia dos grupos de tratamento e períodos experimentais (HE)...	75
Figura 17-	Fotomicrografia de MEV da carboapatita nanométrica , grupo 30 dias	81
Figura 18-	Fotomicrografia de MEV da carboapatita nanométrica, grupo 30 dias.....	82
Figura 19-	Fotomicrografia de MEV do osso autógeno particulado utilizado para preencher o defeito crítico	83
Figura 20-	Fotomicrografia de MEV do período experimental de 60 dias	84

Gráfico 1–	Gráfico de colunas representando as médias percentuais de tecido mineralizado segundo os grupos e períodos experimentais	68
Gráfico 2–	Gráfico de colunas representando a percentagem de área de osso neoformada segundo os grupos experimentais	79
Gráfico 3–	Gráfico de colunas representando a percentagem da área de osso neoformado segundo os períodos experimentais.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância comparando a área de tecido mineralizado dentro do defeito entre o grupo	64
Tabela 2-	Teste de T a 5% de significância para os grupos experimentais e períodos..	64
Tabela 3-	Análise da variância (ANOVA) das médias percentuais da AON segundo os grupos experimentais	65
Tabela 4-	Análise da variância das médias percentuais de AON segundo os períodos e os tratamentos	65
Tabela 5-	Teste de Tukey a 5% de significância para médias percentuais da AON segundo os tratamentos	65
Tabela 6-	Análise da variância desdobrando o fator tratamento dentro de cada nível de dias	66
Tabela 7-	Teste de Tukey comparando os tratamentos dentro do período de 30 dias.....	66
Tabela 8-	Teste de Tukey comparando os tratamentos dentro do período de 60 dias	64
Tabela 9-	Análise da variância dos períodos experimentais dentro de cada grupo de tratamento	67
Tabela 10-	Teste de Tukey a 5% de significância para as médias percentuais de tecido mineralizado segundo os períodos experimentais do grupo OA	67
Tabela 11-	Teste de Tukey a 5% de significância para as médias percentuais de tecido mineralizado segundo os períodos experimentais do grupo HAPNC	67
Tabela 12-	Teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância comparando as áreas de tecido neoformado entre os grupos e períodos experimentais	77
Tabela 13-	Teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância comparando as percentagens de tecido neoformado entre os grupos e períodos experimentais	77
Tabela 14-	Teste t a 5% de significância para os grupos e períodos experimentais	78
Tabela 15-	Teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância comparando a AON em μm^2 entre os grupos	78
Tabela 16-	Teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância comparando a percentagem AON entre os grupos	78
Tabela 17-	Teste de T a 5% de significância para os grupos experimentais	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm-	Micrômetro
3D –	Três dimensões
ANOVA -	Análise de variância
OA –	Ossó autólogo
BCP –	Fosfato de cálcio bifásico , Bone Ceramic®
BMP –	Proteína morfogenética óssea
BMP-2 –	Proteína morfogenética óssea tipo 2
BMP2copBioCap –	Proteína morfogenética óssea tipo 2 em polímero de fosfatos de cálcio biomimético
BMU –	Unidade óssea metabólica
Ca/P –	Razão cálcio;fosfato
CB-HA –	Hidroxiapatita derivada de “ <i>cuttlefish</i> ”
COA –	Coágulo
CONCEA –	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
EDTA –	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA –	Ensaio imunossorvente da enzima ligada
FA –	Fosfatase alcalina
HA –	Hidroxiapatita estequiométrica
HA1-	Hidroxiapatita nanométrica tipo 1
HA2-	Hidroxiapatita nanométrica tipo 2
HAPNC –	Carboapatita nanométrica
HB-GAM –	Pleiotrofina , fator de crescimento associado à heparina
HE –	Hematoxilina e eosina
IGF-1 –	Fator de crescimento ligado à insulina
INPI –	Instituto Nacional de Propriedade Intelectual
MEV –	Microscopia Eletrônica de Varredura
Micro-CT –	Microtomografia computadorizada
MSC –	Células mesenquimais multipotentes
nHA –	Nano-hidroxiapatita
nm –	Nanômetro
OC –	Osteocalcina
OPG -	Osteoprotegerina

OSF-1 –	Fator de estimulação osteoblástica
Osterix –	Fator de transcrição para o gene Osx
PCR –	Reação em cadeia de polimerase
PMMA -	Polimetilmetacrilato
PTH –	Paratormônio
PVPI –	Polivinilpirrolidona-iodado
RANK –	Receptor do RANKL
RANKL –	Ativador do fator nuclear Kappa-B
Runx2 –	Fator de transcrição para o gene Runx2, sinônimo de Cbfa
SrHA1-	Hidroxiapatita nanométrica enriquecida com estrôncio tipo 1
SrHA2-	Hidroxiapatita nanométrica enriquecida com estrôncio tipo 2
TGFβ –	Fator de crescimento transformador beta
Wnt-	Receptor para fator de crescimento
ZnHA –	Hidroxiapatita com zinco incorporado
αTNF –	Fator de necrose tumoral α
βTCP –	Beta trifosfato de cálcio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	BIOLOGIA BÁSICA DO OSSO.....	20
2.2	MARCADORES DA REMODELAÇÃO ÓSSEA.....	23
2.3	BIOMATERIAIS PARA ENXERTOS ÓSSEOS.....	26
2.4	CARBOAPATITA NANOMÉTRICA.....	43
3	OBJETIVOS	48
4	MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1	MODELO EXPERIMENTAL.....	49
4.1.1	Grupos controle	49
4.1.2	Grupos experimentais	50
4.2	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	50
4.3	EUTANÁSIA.....	54
4.4	PROCESSAMENTO DAS PEÇAS.....	54
4.5	ANÁLISE POR MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA.....	55
4.5.1	Avaliação por “score”	56
4.5.2	Avaliação morfométrica e estatística	57
4.6	ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA.....	58
4.7	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	60
5	RESULTADOS	62
5.1	MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA (MICRO-CT).....	62
5.1.1	Avaliação microtomográfica por “score”	62
5.1.2	Análise morfométrica e estatística	63
5.2	ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA.....	68
5.2.1	Análise histológica qualitativa	68
5.2.1.1	Grupo Coágulo (COA).....	68
5.2.1.2	Grupo Carboapatita Nanométrica (HAPNC).....	69
5.2.1.3	Grupo Osso Autógeno (OA).....	71
5.2.2	Análise histomorfométrica e estatística	75
5.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	80
6	DISCUSSÃO	85
7	CONCLUSÃO	93

REFERÊNCIAS.....	94
ANEXOS.....	100

1 INTRODUÇÃO

O histórico da odontologia é marcado por uma ciência mutiladora, caracterizando-se pela ampla extração de órgãos dentais. Estes indivíduos, outrora mutilados, no decorrer do tempo, necessitaram da reabilitação protética para tentar restabelecer as funções adequadas do sistema estomatognático, interagindo-o com as demais estruturas faciais.

O aumento da expectativa de vida do homem, como consequência dos avanços da medicina, da maior preocupação com a alimentação e do conforto gerado pela assim denominada “vida moderna”, tem resultado no aumento da população de idosos e, conseqüentemente, das doenças relacionadas à velhice. Dentre os diversos males que afetam a estrutura óssea, a osteoporose e a perda de massa óssea têm sido intensamente estudados devido a seus efeitos devastadores na qualidade de vida das pessoas. Os problemas de estrutura óssea não são apenas “doença de velhos”, eles também atingem indivíduos jovens em sua fase mais produtiva, em decorrência de acidentes, notadamente os automobilísticos e os de trabalho. A magnitude destes problemas de saúde junto à população tem levado pesquisadores, principalmente dos países mais desenvolvidos, à procura de materiais que possam substituir de forma apropriada os ossos danificados (KAWACHI et al., 2000).

Com o advento da implantodontia, a área de pesquisa dos biomateriais vem sendo explorada cada vez mais, pois os indivíduos que necessitam de reabilitações do sistema estomatognático, muitas vezes, precisam de cirurgias reconstrutivas ósseas, e conseqüentemente a execução de uma reabilitação protética viável, assegurando qualidade técnica e biologicamente possível no tratamento com implantes, bem como resultados esteticamente satisfatórios, do ponto de vista do profissional e também do paciente.

As pesquisas acerca dos enxertos ósseos apresentam várias categorias de onde podemos optar por substitutos ósseos. Misch (2009), descreve o osso autógeno como o padrão ouro nos enxertos ósseos, devido aos mecanismos biológicos presentes para a neoformação óssea, sendo osteogênese, osteoindução e osteocondução, os mecanismos orientadores para a formação óssea no local do enxerto. O enxerto alógeno, descrito pelo autor, evidencia a possibilidade de se obter o material para o enxerto de outro indivíduo da mesma espécie, através do

banco de ossos, muitas vezes oportuno pela ausência da opção de remoção de osso autógeno, seja por complicações cirúrgicas ou ausência de volume ósseo nas regiões doadoras. Os enxertos alógenos tem a vantagem de serem disponíveis em grandes quantidades, porém, a literatura discute o potencial antigênico destes enxertos (KRUSE et al., 2011; LINDHE, 2010; PELEGRINE et al., 2009). Os enxertos xenógenos, são obtidos de outra espécie, e o osso passa por processos criteriosos de desproteinização, desengorduramento e esterilização até chegar ao ponto de ser comercializado para humanos. Mas, mediante à necessidade das cirurgias reconstrutivas ósseas ser cada vez maior, alternativas de enxertos aloplásticos (sintéticos ou inorgânicos) tem se destacado nas pesquisas odontológicas como substitutos ósseos. Uma vez que os produtos sintéticos não possuem potencial antigênico, e podem ser adquiridos em grandes quantidades, a sua utilização vem sendo preconizada na literatura, em associação a outros biomateriais, ao osso autógeno, e também à concentrados plaquetários.

A grande questão relacionada à disseminação do uso de biomateriais sintéticos é sobre os mecanismos biológicos envolvidos no processo de neoformação óssea, uma vez que eles possuem o potencial osteocondutor, formando um arcabouço que será povoado por células osteogênicas que formarão novo osso pelo processo de substituição. As crescentes pesquisas no campo da nanobiotecnologia tentam aprimorar as características bioativas de superfície dos nanobiomateriais, com a finalidade de potencializar o mecanismo osteocondutor, e porque não, agregar o mecanismo osteoindutor, que é a capacidade de induzir a diferenciação de células osteoprogenitoras, e promover uma interação biomolecular, que resulta em uma série de fenômenos intercelulares com a finalidade de promover a regeneração tecidual.

Segundo Misch (2009), no processo de enxerto ósseo, a vascularização inicial no sítio receptor é um fator determinante para o sucesso cirúrgico e conseqüentemente, para a neoformação óssea, relacionado à qualquer tipo de enxerto. Sendo assim, as características nanométricas dos biomateriais tem a finalidade de facilitar a angiogênese e a adesão celular via proteínas de membrana, o que aumenta a interação célula-biomaterial, facilitando o processo de neoformação óssea.

No desenvolvimento da carboapatita nanométrica como alternativa de biomaterial sintético para enxertos ósseos, a característica de superfície nanométrica tem a finalidade de facilitar a angiogênese inicial no momento do enxerto, e

conseqüentemente, a migração e proliferação de células osteogênicas e povoamento osteoblástico no local do enxerto devido a adsorção proteica (MAVROPOULOS et al., 2013). Isso resulta em melhoria no recrutamento celular, podendo demonstrar melhoras na qualidade do osso neoformado, e também maior velocidade de formação do tecido ósseo.

A carboapatita nanométrica foi desenvolvida nos laboratórios da UNIFAL-MG, apresentando propriedades químicas e físicas distintas daquelas comercializadas atualmente, e já foi registrada no INPI, com registro de patente nacional BR2016/050112, e registro de patente internacional (WIPO): WO/2016/187685. Esta carboapatita (HAPNC) já apresentou resultados promissores em fíbula de ratos, possibilitando a regeneração de defeitos críticos com perda de 20% do comprimento de ossos (PEREIRA et al., 2013). A superfície nanométrica facilita o povoamento das células osteoprogenitoras que, por sua vez, resulta em uma formação óssea por substituição devido ao íntimo contato celular com o biomaterial, facilitada pelo processo de adesão protéica e quimiotaxia de células osteoprogenitoras. Sendo assim, buscou-se a compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos no processo de regeneração óssea utilizando o nanobiomaterial HAPNC.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica encontra-se dividida em tópicos para melhor didática e compreensão dos temas relacionados à pesquisa.

2.1 BIOLOGIA BÁSICA DO OSSO

O osso é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea (JUNQUEIRA, 2008). Bioquimicamente é definido por uma mistura especial de matriz orgânica (35%) e elementos inorgânicos (65%). O componente inorgânico, hidroxiapatita de cálcio $[Ca_{10}(PO_4)_6OH_2]$, é o mineral que confere força e resistência aos ossos, sendo o armazém de 99% do cálcio, 85% do fósforo e 65% do sódio e magnésio corporais (HERNÁNDEZ-GIL et al., 2006).

A parte inorgânica do osso é constituída basicamente de cristais de hidroxiapatita e íons impregnados na matriz óssea, tais como Ca^{+2} e PO_4^{3-} , Mg^{+2} , CO_3^- , K^+ , Na^+ . A formação e crescimento dos cristais de hidroxiapatita dependem de todos esses componentes iônicos, e por isso a constituição química da hidroxiapatita pode ser alterada de acordo com os estágios da produção deste componente mineral (COSTA et al., 2016; KAWACHI et al., 2000).

No osso maduro, a matriz orgânica contém 85% de colágeno do tipo I, que atua como uma malha na qual minúsculos cristais de hidroxiapatita são embutidos e o restante é composto de moléculas não colágenas e líquido intersticial. Os minerais não estão diretamente ligados ao colágeno, e sim ligados às moléculas (proteínas) não colágenas. As moléculas não colágenas constituem aproximadamente de 3 a 5% do osso, e são as responsáveis pela promoção de sítios ativos para a biomineralização e para a adesão celular. Alguns exemplos de moléculas não colágenas são: fosfoproteínas, GLA-proteínas (osteocalcina), glicoproteínas ácidas (osteonectina), osteopontina, sialoproteína óssea, proteoglicanas/glicosaminoglicanas (principalmente decorina, biglicana, osteoaderina e lumican), proteínas séricas e alguns lipídios. Outro importante constituinte da matriz do tecido ósseo é o grupo das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), relacionadas à superfamília dos fatores de crescimento (TGF- β), que são encontradas durante o desenvolvimento de vários órgãos, inclusive do esqueleto (KATCHBURIAN &

ARANA, 2004).

Lindhe (2010), descreve o tecido ósseo como um tecido conjuntivo mineralizado, constituído por uma matriz orgânica colágena e não colágena, e no interior desta matriz, temos íons cálcio e fosfato, entre outros, organizados na forma de hidroxiapatita. As células ósseas deste tecido são chamadas de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, células estas que participam intensamente do processo metabólico ósseo, tanto na modelação óssea quanto na remodelação.

Histologicamente, o osso pode ser dividido em osso imaturo e osso lamelar. O osso imaturo caracteriza-se por possuir uma pouca organização das lamelas, e a fibra colágena possui um tamanho aproximado de 0,1 μ m. O osso lamelar possui uma arquitetura mais organizada, e os ramos de fibras colágenas medem de 2 a 3 μ M. Na porção inorgânica do osso existem os cristais de hidroxiapatita de dimensão 5x20x40nm. A organização da estrutura óssea depende do substrato em que está sendo formada. Primeiramente, através da adsorção iônica, seguido de nucleação e fusão dos cristais de hidroxiapatita, no seu maturamento. Portanto, em um substrato mineral, a neoformação encontra-se mais amorfa, e ao decorrer dos eventos celulares e formação de uma matriz colagenosa, a arquitetura óssea se torna mais organizada (APARECIDA et al., 2006).

Os osteoblastos são conhecidos como células formadoras de osso, e sintetizam a parte orgânica da matriz, como proteoglicanos, glicosaminoglicanos, glicoproteínas e colágeno tipo I. São capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando do processo de mineralização da matriz. São responsáveis pela síntese de BMP (proteína óssea morfogenética), que ficará alojada na matriz extracelular. Os osteoblastos se diferenciam em osteócitos após serem aprisionados dentro das lacunas no interior da matriz mineralizada produzida por eles. Sua diferenciação envolve a participação de dois fatores de transcrição: Cbfa1/Runx2 e osterix (NANCI, 2013).

As células formadoras de osso que foram englobadas pela matriz óssea são chamadas de osteócitos, possuem pouca atividade sintética, mas são importantes na manutenção da matriz óssea, pois estão envolvidas no processo de percepção de cargas funcionais sobre osso, e por se intercomunicarem através de canaliculos, há uma troca metabólica entre os osteócitos. A morte desta célula resulta em reabsorção óssea (JUNQUEIRA, 2008). Os osteócitos são as células aprisionadas no interior da matriz óssea mineralizada, ocupando as lacunas das quais partem

canalículos. Cada lacuna contém apenas um osteócito. Dentro dos canalículos os prolongamentos dos osteócitos estabelecem contatos através de junções comunicantes, por onde podem passar pequenas moléculas e íons de um osteócito para o outro. Esse arranjo permite aos osteócitos (1) participar na regulação da homeostasia do cálcio sanguíneo e (2) perceber a carga mecânica e transmitir essa informação às outras células dentro do osso. Os osteócitos são células com a forma estrelada, achatadas, que exibem pequena quantidade de retículo endoplasmático rugoso, aparelho de Golgi pouco desenvolvido e núcleo com cromatina condensada (JUNQUEIRA,2008; LINDHE, 2010).

Os osteoclastos estão envolvidos no processo de reparo ósseo, principalmente quando utiliza-se enxertos ósseos para reconstrução, e o papel destas células nos mecanismos de enxertos resultará na resposta tecidual positiva, fazendo com que o enxerto, de qualquer natureza, passe a pertencer biologicamente ao hospedeiro. Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas, localizadas nas lacunas de Howship, móveis e responsáveis pela reabsorção óssea. Junto com o osteoblasto formam a unidade óssea metabólica (BMU), responsáveis pelo processo de remodelação óssea (LINDHE, 2010; PELEGRINE et al., 2009).

A atividade de formação óssea está consistentemente associada à reabsorção óssea que é iniciada e mantida pelos osteoclastos. Os osteoclastos são células móveis, gigantes, multinucleadas e extensamente ramificadas, observadas nas superfícies ósseas que se originam da fusão de células da linhagem monócito-fagocítica dos tecidos hematopoiéticos (KATCHBURIAN; ARANA, 2004; LINDHE, 2010). Os osteoclastos possuem citoplasma granuloso, algumas vezes com vacúolos, fracamente basófilo nos osteoclastos jovens e acidófilos nos maduros. A zona clara é um local de adesão do osteoclasto com a matriz óssea e cria um microambiente fechado, onde tem lugar a reabsorção óssea. Os osteoclastos secretam para dentro desse microambiente fechado, ácido, colagenase e outras hidrolases que atuam localmente digerindo a matriz orgânica e dissolvendo os cristais de sais de cálcio. A atividade dos osteoclastos é coordenada por citocinas e por hormônios como a calcitonina, produzida pela glândula tireóide, e o paratormônio, secretado pelas glândulas paratireóides (HERNÁNDEZ-GIL et al., 2006; JUNQUEIRA, 2008).

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

sanguíneos. A modelação óssea corresponde a qualquer transformação ou alteração na forma ou tamanho do osso, mediante um processo anabólico ou catabólico, por exemplo na osseointegração, onde ocorre uma formação óssea sem ser precedida de reabsorção. Na remodelação, temos ações conjuntas e sequenciais de osteoclastos e osteoblastos, na reabsorção de osso velho e substituição por novo osso. Na remodelação óssea, a BMU é o local onde a ação conjunta das células presente numa mesma interface concretiza o processo de remodelação fisiológico sem perda de massa óssea (PELEGRINE et al., 2009).

Os processos de modelação e remodelação são controlados por uma interação de sinais mecânicos e metabólicos. Os sinais mecânicos são sobrecarga patológica, hipertrofia fisiológica, atrofia por desuso; os sinais metabólicos incluem os sinais endócrinos: através do paratormônio (PTH), calcitonina, estrogênio, testosterona, vitamina D, hormônio de crescimento; e de sinais autócrinos/parácrinos: prostaglandinas, interleucinas (LINDHE, 2010; MISCH, 2009; PELEGRINE et al., 2009).

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

Doenças sistêmicas metabólicas como o diabetes influenciam nos eventos celulares, seja na resposta imunológica, seja na modulação da atividade osteoclástica e osteoblástica, na vascularização dos tecidos corporais e chegada de glicose na célula; o fumo também contribui para a deficiência das respostas celulares nos mecanismos de renovação e reparação, tanto pelas substâncias tóxicas, como pela dificuldade de oxigenação celular. Vários estudos constataram que as células osteogênicas pré-osteoblásticas provém do tecido perivascular adjacente, isso confirma o princípio cirúrgico de que o suprimento sanguíneo é essencial (MISCH, 2009).

2.2 MARCADORES DA REMODELAÇÃO ÓSSEA

Todo o processo de remodelação óssea é gerido pelos componentes celulares do osso. Tanto as células osteoblásticas quanto as osteoclásticas interagem entre si através de quimiocinas, proteínas ligantes, fatores de transcrição, receptores celulares e íons, que podem estar presentes na matriz óssea ou serem liberados pelas mesmas. Essa comunicação celular é responsável por regular ou modular o processo de remodelação óssea, bem como a neoformação óssea através dos enxertos. Para compreender melhor essa interação celular, faz-se necessário discorrer sobre os principais biomarcadores da remodelação óssea, os quais também representam a atividade celular na unidade óssea metabólica (JUNQUEIRA, 2008; LINDHE, 2010).

O tecido ósseo é um tecido que possui capacidade de regeneração tecidual frente a uma lesão, porém, esta regeneração possui limitações relacionadas ao tamanho do defeito gerado. Defeitos ósseos críticos são defeitos que apresentam a neoformação óssea das margens do defeito para o centro, portanto o tecido ósseo por si só não regenera. Os mecanismos osteocondutores potencializados pela utilização local da carboapatita nanométrica visam facilitar a migração de células osteoblásticas uma vez que a hidroxiapatita é um componente natural do tecido ósseo e representa 30 a 70% da massa óssea, e a adição de íons carbonato à sua estrutura química é capaz de melhorar a adesão celular sobre a nanopartícula do biomaterial (MAVROPOULOS et al., 2013). Além do mais, a estrutura nanométrica facilita o processo de angiogênese no local, bem como a migração e proliferação de células osteoblásticas, o que acelera o processo de neoformação óssea por substituição (GENG et al., 2017; PANG et al., 2015).

A fosfatase alcalina (FA) é medida através de sua atividade e corresponde à uma das diversas isoformas presentes no soro. É o marcador de formação óssea mais frequentemente utilizado. Os fenômenos ósseos associados a elevação de fosfatase alcalina necessitam ser de grande intensidade, como ocorre nas fraturas, lesões de furca ou defeitos críticos, pois quando se busca maior sensibilidade e especificidade, a fosfatase alcalina óssea é a mais indicada (SARAIVA; CASTRO, 2002).

A osteocalcina (OC) é a proteína não colágena mais abundante no osso e dentina, sabe-se que é sintetizada predominantemente pelos osteoblastos diferenciados, incorporada à matriz óssea extracelular e relacionada à mineralização da matriz osteóide. Possui em sua estrutura três ácidos glutâmicos que lhe conferem

a capacidade de ligar-se ao cálcio e isto pode ser importante no processo de mineralização da matriz óssea já formada. Os fragmentos de pró-colágeno produzidos durante o processo de maturação do colágeno são liberados para a circulação e também podem ser dosados por ensaios específicos, representando a formação óssea, é um marcador bastante específico da atividade osteoblástica (DATTA et al., 2008).

Outros marcadores da atividade osteoblástica na neoformação óssea podem ser observados através de análise imunoistoquímica e método PCR (reação em cadeia de polimerase), e correspondem a atividades específicas da osteogênese. O fator de estimulação osteoblástico (OSF-1), também conhecido como pleiotrofina ou HB-GAM, é um fator quimiotático para as células osteoprogenitoras e estimula a atividade do osteoblasto maduro. Outros fatores como a PTH, prostaglandinas e IGF-1 (fator de crescimento ligado a insulina-1) possuem efeitos mais marcantes por afetarem a renovação das células mesenquimais multipotentes (MSC) e por estimularem a diferenciação osteogênica através da proteína morfogenética do osso (BMP). O processo de diferenciação osteoblástica parece ser particularmente dependente das interações entre WNT/catenina e TGF- β e BMP mediado por diferentes vias de sinalização. A expressão de Runx2, um fator de transcrição associado à diferenciação osteoblástica, é requerida para as células multipotentes se diferenciarem na linhagem osteoblástica. O Runx2 inibe também a diferenciação de células mesenquimais em adipócitos e em linhagem de condrócitos. De maneira geral, as vias BMP2 e WNT, em conjunto, promovem a expressão de Runx2, que por sua vez promove a diferenciação osteoblástica (DATTA et al., 2008).

A interação dos osteoblastos e osteoclastos na BMU pode ser avaliada através de marcadores específicos de membrana que sinalizam a atividade celular no metabolismo ósseo. Uma das citocinas expressas pelos osteoblastos essenciais para a diferenciação de osteoclastos é o ativador do fator nuclear Kappa-B (RANKL). RANKL é uma citocina que está ligada à proteína de membrana de uma variedade de células como os osteoblastos, fibroblastos e células T, e é um mediador do processo de formação dos osteoclastos. Seu receptor é RANK, e a ligação RANK-RANKL na superfície de pré-osteoclastos ativa o fator nuclear Kappa B que leva a diferenciação dessas células. Ou seja, a ligação RANK-RANKL é o sinal que determina a diferenciação de células progenitoras de osteoclastos em osteoclastos totalmente diferenciados. RANK é o receptor nos osteoclastos e seus precursores,

que interage com RANKL, o qual é sintetizado pelos osteoblastos como uma proteína transmembrana. No osso, a expressão de RANKL pelos osteoblastos permite a diferenciação, maturação e ativação dos osteoclastos por ligação ao seu receptor, RANK, presente na superfície de pré-osteoclastos. Os osteoblastos produzem também a osteoprotegerina (OPG), assim fica estabelecido um equilíbrio entre a produção de RANKL, a qual ativa a osteoclastogênese, e de OPG, que inibe esta atividade. A OPG é secretada pelos osteoblastos e exerce um efeito protetor no osso; é um membro da superfamília de receptores α TNF (Fator de Necrose Tumoral α) e, embora expressa em vários tecidos, tem um papel muito importante no sistema esquelético atuando como um receptor solúvel que se liga ao RANKL com alta especificidade, indisponibilizando-o para RANK e, assim, impede a diferenciação e ativação de osteoclastos (SILVA, 2015).

A marcação imunoistoquímica para RANKL/OPG é capaz de descrever a atividade metabólica para neoformação óssea em casos de enxertos ósseos, especialmente aloplásticos, onde, na maioria das vezes, ocorre a neoformação óssea pelo processo de substituição, sendo necessária a reabsorção por parte do osteoclasto e a formação de novo osso por parte do osteoblasto.

2.3 BIOMATERIAIS PARA ENXERTOS ÓSSEOS

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

Estes princípios fundamentais da engenharia de tecidos devem ser respeitados. Por exemplo, para ocorrer regeneração tecidual é necessária a presença de células capazes de formar novo tecido ósseo (osteogênese), sendo igualmente importante que estas consigam aderir, crescer e atravessar todo o material (osteocondução) e que estejam presentes fatores que estimulem a sua

diferenciação fenotípica em osteoblastos (osteoindução) (GUTIERRES et al., 2006). Exemplos de materiais osteocondutivos são os cerâmicos e materiais baseados em fosfato de cálcio (HA, biocompósitos, fosfato tricálcico).

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

Considerado como o padrão ouro para os enxertos ósseos pela literatura, o enxerto autógeno ou autoenxerto é o único que apresenta o mecanismo de osteogênese. Pois, durante a remoção do osso da área doadora, células ósseas são transplantadas para o sítio receptor. O osso autógeno também contribui para o crescimento do osso com BMP (proteína morfogenética óssea), e outros fatores de crescimento que são liberados durante a incorporação do enxerto. Os enxertos autógenos são aqueles obtidos do próprio paciente. Geralmente indicados como a primeira escolha, são os biomateriais que apresentam melhor previsibilidade, por possuírem propriedades osteogênicas, osteocondutoras e osteoindutoras, além de evitar incompatibilidades imunológicas. Sua eficácia baseia-se no transplante da matriz óssea autógena contendo células ósseas vivas para a região receptora. Podem ser de osso cortical ou medular ou da associação de ambos. O medular é o material mais eficiente na reconstrução de defeitos ósseos, pois fornece uma maior quantidade de células osteogênicas (MISCH, 2009).

São utilizados na forma de blocos ou particulados quer seja de sítios doadores intra ou extra-orais. Os intra-orais comumente utilizados são a tuberosidade maxilar, o ramo mandibular, exostoses, e a sínfise mandibular, e os extra-orais são a crista ilíaca, a calota craniana e a tíbia (MISCH, 2009). Com relação à escolha do sítio doador, isso dependerá da quantidade em volume, e do tipo de enxerto desejado para a cirurgia proposta. Entretanto, a morbidade pós-operatória relacionada à necessidade de coleta de uma área doadora, e eventuais aumento de tempo e custos de tratamento devido a procedimentos realizados em ambiente hospitalar, têm sido vistos com alguma resistência por parte dos pacientes e por isso tem sua indicação redimensionada (PELEGRINE et al., 2009).

Os enxertos alógenos são assim chamados por ocorrerem entre indivíduos diferentes de uma mesma espécie. Encontramos o osso congelado, seco e desmineralizado ou não desmineralizado. Misch (2009), relata que o osso

desmineralizado tem potencial osteoindutor maior, devido à rápida exposição das BMPs, enquanto o osso não desmineralizado tem sua característica mais osteocondutora, pelo tempo de reabsorção da porção mineral do osso. Os resultados com estes enxertos são conflitantes, pois muitos são os questionamentos quanto à antigenicidade e à osteoindução desses enxertos.

Com o advento da implantodontia, novas alternativas cirúrgicas reconstrutivas tem sido discutidas no campo dos enxertos ósseos, pois a amplitude de biomateriais disponíveis, associados ou não à concentrados plaquetários, tem mostrado eficácia e resultados positivos nas reconstruções ósseas prévias ao tratamento com implantes (OLIVEIRA et al., 2015).

Tem-se destacado então, os biomateriais, sintéticos, naturais ou xenógenos, como alternativas viáveis para substituição óssea, a fim de reduzir as taxas de morbidade das cirurgias de enxerto, bem como menor tempo de exposição cirúrgica e facilitação da técnica. Os biomateriais foram assim definidos: “Qualquer substância (outra que não droga) ou combinação de substâncias, sintética ou natural em origem, que possa ser usada por um período de tempo, completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo” (HELMUS E TWEDEN, 1995). Independentemente da origem ou métodos de produção, os materiais utilizados para enxerto ósseo devem respeitar certos critérios e características adequadas para os princípios de enxerto. O material utilizado para enxerto deve ser seguro e biocompatível para evitar o risco de transmissão de doenças ou respostas imunes. Os biomateriais para enxertia óssea são caracterizados por seu potencial osteocondutor. A osteocondução é caracterizada pela substituição do biomaterial enxertado pelo osso neoformado, através da manutenção do arcabouço pelo enxerto. Os materiais osteocondutores são biocompatíveis, e demonstram a formação óssea por substituição e aposição de tecido mole adjacente sem nenhuma reação tóxica (BUSER, 2010).

Os materiais osteocondutores mais comumente utilizados na implantodontia são os alógenos mineralizados, os xenógenos e os aloplásticos. A variedade de biomateriais aloplásticos é grande, destacando-se entre as cerâmicas, os polímeros e os compósitos. As cerâmicas mais utilizadas são as cerâmicas bioativas, incluem os fosfatos de cálcio e seus produtos, tais como a hidroxiapatita sintética e matriz orgânica óssea bovina, fosfatos tricálcicos, e carbonatos de cálcio (KAWACHI et al., 2000; PEREIRA et al., 2013).

Muitas são as características dos biomateriais, relacionadas ao aumento ou manutenção de tecido duro. Segundo Misch (2009), podem ser classificados em reabsorvíveis e não-reabsorvíveis, densos ou porosos, cristalinos ou amorfos. Por conseguinte, são essas características de superfície e forma que irão guiar as indicações de cada biomaterial. As formas mais densas, apresentam-se mais duras, similar a dentina, são dificilmente reabsorvidas, portanto seu objetivo maior é preencherem espaço e manter contorno, como nos casos em que desejamos aumentar suporte para próteses totais. Formas mais cristalinas, principalmente das hidroxiapatitas, são mais resistentes à destruição celular que as amorfas, porém, podem sim ser reabsorvidas, num processo mais lento, dependendo do pH do meio, e da porosidade da estrutura. As formas mais porosas e amorfas de materiais osteocondutores, são reabsorvidas mais rapidamente pelas células osteoclásticas, processo similar à remodelação óssea natural (JUNQUEIRA, 2008; LINDHE, 2010; PELEGRINE et al., 2009).

À medida que o campo da implantodontia avança nas pesquisas, muito tem-se pesquisado e evoluído nesta classe de biomateriais, que visam proporcionar a preservação da anatomia do rebordo alveolar após a perda dos dentes. Esses materiais são a hidroxiapatita, fosfato beta-tricálcico, porções inorgânicas de osso xenógeno ou combinações deles (GENG et al., 2017; WANG et al., 2016).

Na terapia reconstrutiva óssea, a velocidade de reabsorção do biomaterial é um fator determinante para a seleção e indicação de cada biomaterial, de acordo com a finalidade cirúrgica. A reabsorção ocorre principalmente por meio de dois mecanismos distintos: mediada por células ou por dissolução. A reabsorção por dissolução é dependente do pH circundante, e ocorre em biomateriais mais mineralizados, mais inorgânicos. Este tipo de reabsorção é mais lento, comparado com a reabsorção mediada por células, onde ocorre a fagocitose de maneira rápida pelos osteoclastos ou células fagocíticas. A taxa de reabsorção é afetada pelo tamanho da partícula, pela porosidade e pela composição do material. O leito receptor também interfere na velocidade de reabsorção, seguindo a sua atividade metabólica de remodelação (LINDHE, 2010; MISCH, 2009).

Sendo assim, as características geométricas do material devem favorecer a invaginação dos vasos sanguíneos, cruciais para a formação óssea dentro do biomaterial. Isto significa que a porosidade é importante, mas também a interconexão entre os macroporos. As características superficiais dos substitutos

ósseos são determinadas pela composição química, microporosidade, rugosidade superficial, cristalinidade e tamanho do cristal. A fase inicial da neoformação óssea se relaciona diretamente com tais características, pois elas determinam a resposta tecidual do hospedeiro como adsorção proteica inicial, adesão de osteoblastos e osteoclastos, e deposição de osteóide para a aposição direta do osso recém-formado na superfície do material (BUSER, 2010).

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

Os biomateriais aloplásticos vem como grande promessa no campo das cirurgias reconstrutivas, por serem de origem sintética há a possibilidade de individualizar o material de acordo com a necessidade clínica de cada paciente. Todas as características podem ser controladas no laboratório, como a interconectividade dos poros, o tamanho dos poros, a forma cristalina ou amorfa, e morfologia dos blocos e grânulos; além de não possuir antigenicidade, e ser disponibilizado em grandes quantidades, de acordo com a indicação (GENG et al., 2017; KAWACHI, et al., 2000; MAVROPOULOS et al., 2013).

Muitos pesquisadores tem idealizado o biomaterial perfeito, que apresente adsorção inicial de proteínas e outras macromoléculas séricas para a adesão de células osteogênicas e a reprodução de um material macroporoso com rugosidade superficial que simule o mineral ósseo natural (GUDA et al., 2012).

Lindhe (2010), relata que os mais comumente usados em odontologia são os fosfatos de cálcio: hidroxiapatita e beta trifosfato de cálcio, a principal característica que os diferencia é a velocidade de reabsorção, onde a mais lenta é da HA. A reabsorção ocorre por dois processos, ou o material é reabsorvido por células fagocíticas, que ocorre rapidamente, ou é dissolvido pela influência do meio (ph), que ocorre mais lentamente. O que caracteriza a escolha do material é justamente a aplicabilidade clínica, onde áreas que buscamos melhor recontorno ósseo com

manutenção da arquitetura óssea por mais tempo, utilizamos os reabsorvidos mais lentamente; áreas em que desejamos a reparação óssea com objetivo de instalar implantes sem perda de volume pela remodelação, usamos materiais com reabsorção adequadamente mais rápida.

A biocompatibilidade dos biomateriais está intimamente relacionada ao comportamento celular no contato e particularmente na adesão celular a sua superfície. Para isso é importante uma apropriada topografia, química e energia de superfície. Assim, a aproximação, a adesão e o “espraiamento” que ocorrem na primeira fase da interação entre a célula e o biomaterial, e a qualidade desta primeira fase influenciará a capacidade celular para proliferar e se diferenciar em contato com o material enxertado. Isto é essencial para a eficácia dos enxertos no sentido de se estabelecer uma interface mecanicamente sólida com completa fusão entre a superfície do material e o tecido ósseo sem a presença de uma interface fibrosa (ANSELME, 2000).

A investigação por biomateriais que desencadeiem funções celulares mais efetivas tem aumentado no campo da nanobiotecnologia. Estudos têm demonstrado que quando os materiais nanoestruturados são colocados em contato com superfícies celulares que possuam propriedades favoráveis, podem promover um aumento das interações com proteínas específicas, produzindo, assim, um estímulo mais eficiente relacionado ao crescimento de novo tecido ósseo, em relação aos materiais convencionais (WEBSTER, 2000a; WEBSTER et al., 2000b). Este pode ser um dos mecanismos subjacentes que explicam o porque dos nanomateriais aparentarem ser mais eficazes do que os materiais convencionais, em relação ao crescimento tecidual. As superfícies bioativas dos nanomateriais mimetizam as do osso natural, promovendo, deste modo, a existência de uma maior quantidade de proteínas de adsorção e estímulos mais eficientes na formação óssea, em relação aos materiais convencionais (ZHANG; WEBSTER, 2009).

Kawachi et al., (2000), descreveram que dentre as cerâmicas de fosfato de cálcio, a hidroxiapatita com razão Ca/P igual a 1,67, por ser o principal componente presente na fase mineral dos ossos é, sem dúvida, a mais estudada e a mais utilizada para as finalidades clínicas. A hidroxiapatita biológica se diferencia da hidroxiapatita sintética por sua menor cristalinidade e também pela presença de substitutos iônicos em sua estrutura, considerando-se que estas particularidades desempenham um papel importante no comportamento biológico. O uso clínico da

hidroxiapatita, por outro lado, é limitado devido a sua lenta biodegradação. Estudos efetuados por longos períodos de tempo têm mostrado que a hidroxiapatita começa a ser reabsorvida gradualmente após 4 ou 5 anos de implante. A reabsorção é uma característica desejada para um biomaterial em alguns tipos de implantes, nos quais o processo de degradação é concomitante com a reposição do osso em formação. Sendo assim, a adição de carbonato à composição da apatita diminui a sua cristalinidade, favorecendo um aumento na velocidade de reabsorção, o que se torna viável e ideal para reconstruções ósseas com objetivo de reabilitação com implantes osseointegrados.

A hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) é a molécula predominante no osso mineralizado. A HA natural não apresenta a sua formulação estequiométrica pura, pois contém também muitos componentes minoritários, tais como carbonato, citrato, magnésio, flúor e estrôncio, que estão incorporados na rede cristalina ou são adsorvidos na superfície do cristal. A HA do osso pode ser sintetizada a partir destes cristais e, assim, torna-se mais solúvel do que a HA na sua forma geológica natural, permitindo que o osso possa ser novamente solubilizado e que liberte os seus íons de fosfato de cálcio, magnésio ou outros íons no líquido extracelular. Deste modo, o osso funciona também como uma reserva de íons minerais que responde às necessidades homeostáticas do organismo. As substâncias que possuem afinidade óssea podem ser facilmente incorporadas na sua matriz, ocorrendo o processo de mineralização. Estas substâncias, geralmente, incluem tetraciclinas, polifosfatos, bisfosfonatos e moléculas com afinidade para radionuclídeos (XIAO-MAN; WEBSTER, 2005).

Os sítios iônicos no interior da estrutura cristalina da hidroxiapatita podem ser substituídos. No caso da hidroxiapatita, os elementos Ca^{2+} , PO_4^{3-} e OH^- são substituídos por outros íons com cargas de mesmo sinal. É o caso, por exemplo, do grupo carbonato CO_3^{2-} que pode tanto ocupar a posição estrutural do OH^- (substituição do tipo A) como ocupar a posição do íon PO_4^{3-} (substituição do tipo B). O íon carbonato é capaz de causar uma tensão na rede cristalina da HA fazendo com que a taxa de dissolução do material aumente. Isso ocorre inclusive nos ossos que, por sua vez, têm muitos elementos substituídos em sua estrutura cristalina (BONADIO, 2014).

Uma das vantagens das biocerâmicas à base de fosfato de cálcio, utilizadas como enxertos ósseos, é que tanto os íons cálcio quanto os íons fosfato não

interferem na função celular e fisiológica dos tecidos adjacentes, proporcionando uma resposta tecidual favorável ao tratamento. A liberação de cálcio e fosfato, por parte das biocerâmicas, pode participar, dentro de certos limites, como estimuladores da formação óssea, bem como na reprecipitação de uma camada de apatita carbonatada sobre a superfície do biomaterial estabelecendo uma ligação química com o osso neoformado (LEGEROS, 2002).

Um estudo avaliando o recobrimento de superfície de implantes com hidroxiapatita demonstrou que esta aumenta a fixação bioativa no período de osseointegração devido ao crescimento da camada densa, em escala nanométrica, de aglomerados de cristais de hidroxiapatita carbonatada (HENCH, 1998).

Misch (2009), preconiza que para os procedimentos reconstrutivos para colocação de implantes, idealmente a utilização simultânea dos biomateriais com características diferentes levaria a resultados melhores, como uma variação da técnica.

Os biovidros tem sido uma classe muito descrita de biomateriais sintéticos a base de sílica, formando compósitos altamente bioativos, com adição de íons cálcio e fosfato nos vidros de silicato, relatados primeiramente no trabalho clássico de Hench, nos Estados Unidos, pós segunda Guerra Mundial, mas sua aplicação tem se direcionado para cirurgias ortopédicas (BONADIO, 2014).

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

Kim et al., (2014) avaliaram a resposta tecidual comparando os grânulos de HA derivados de “cuttlefish” (CB-HAp) com uma hidroxiapatita sintética, como biomateriais para enxertos ósseos. Neste estudo, os grânulos de HA foram preparados a partir do tecido mineral do animal usando uma reação hidrotermal. A formação de HA derivada de “cuttlefish” foi confirmada por microscopia eletrônica de varredura e análise de difração de raios-x. A bioatividade dos grânulos de CB-HAp foi avaliada *in vitro*, em cultura de células, e *in vivo*, em defeitos críticos de 10mm, em calvária de ratos. As análises *in vitro* foram feitas através do exame ELISA,

avaliando a atividade de FA e proliferação celular. Os defeitos críticos ósseos foram analisados por meio das análises histológicas e microtomográficas. Os resultados mostram que o CB-HAp não é tóxico e que os grânulos de CB-HAp suportaram adesão, proliferação e diferenciação celular melhoradas em comparação com grânulos de HA sintéticos estequiométricos. Além disso, as experiências de cicatrização de defeito ósseo *in vivo* mostram que a formação de osso com CB-HAp é maior do que a HA pura. Esses resultados mostram que os grânulos de CB-HAp possuem excelente potencial de uso como matéria de enxerto ósseo.

Para as reconstruções ósseas, Misch (2009) utilizou da abordagem em camadas como uma técnica que visava agregar todas as características e princípios biológicos de enxertia óssea a fim de promover melhor velocidade na neoformação óssea, qualidade óssea, e proteção através de membranas. Esta abordagem salienta a utilização do enxerto autógeno, em bloco, para aumento volumétrico, seguido da utilização de enxerto alógeno particulado junto aos biomateriais, de origem xenógena e sintética, aumentando consideravelmente a osteocondução com a finalidade de manter o volume ósseo adequado. Após a colocação de todo o material de enxertia óssea, uma membrana envolve-os para protegê-los da invaginação de tecido mole, e também, tratando-se de membrana autógena, liberar gradativamente os fatores de crescimento sobre o enxerto.

Estudos *in vitro* sobre o mecanismo do crescimento ósseo cristalino, realizado utilizando-se microscopia eletrônica de alta resolução, nos quais os cristalitos foram analisados em diferentes estágios de desenvolvimento, mostraram um modelo de desenvolvimento em quatro estágios. O primeiro e segundo estágios da formação cristalina compreendem a adsorção iônica sobre a superfície do substrato, a qual leva à nucleação e formação de partículas nanométricas. Grupos iônicos individuais difundem-se randomicamente através da solução, formando “*clusters*” estáveis no terceiro estágio. Os núcleos estáveis aparecem e, então, desenvolvem-se por deposição iônica adicional. A morfologia dos cristais formados é equivalente à morfologia dos cristais no tecido ósseo de um humano adulto. A desorientação dos cristais indica que o substrato no qual ocorreu o crescimento cristalino é orgânico. Um precursor mineral atua como substrato guiado para a formação de cristais mais orientados. O último estágio observado para o crescimento ósseo cristalino é uma fusão lateral pelas faces dos cristais, mediado por um alto ângulo de ligação. (CUISINIER, 1996).

As análises de recobrimento biomimético de implantes de titânio com hidroxiapatita combinada a diferentes íons revelaram que os íons magnésio e carbonato favoreceram o crescimento de fosfato de cálcio amorfo, precursor dos cristais de hidroxiapatita e outros fosfatos de cálcio presentes no tecido ósseo. As análises mostraram que mesmo em soluções que não apresentavam íons carbonato, houve a produção de apatita carbonatada pelas células no estágio final de formação óssea (APARECIDA et al., 2006)

Muitos métodos são utilizados para sintetizar a hidroxiapatita. O mais convencional é a precipitação em meio aquoso utilizando como matéria-prima o nitrato de cálcio $[Ca(NO_3)_2]$ e o diamônio fosfato $[(NH_4)_2HPO_4]$. No entanto a síntese de uma hidroxiapatita pura por este método requer um controle de vários parâmetros tais como: o pH da reação, o tempo, a temperatura, e a estequiometria da matéria prima. Uma discreta variação destes parâmetros pode gerar drásticas variações na composição do produto final (HORNEZ et al., 2007).

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

Mavropoulos et al., (2013), verificou que a adição de íons de zinco à fórmula da hidroxiapatita resultou em melhoras tanto nas propriedades químicas da hidroxiapatita quanto na topografia de superfície nanoestruturada. As propriedades físico-químicas da hidroxiapatita podem ser moduladas pela incorporação ou substituição dos íons carbonato, magnésio, sílica, estrôncio, zinco, entre outros. A alteração destes íons modifica a cristalinidade da hidroxiapatita. Quanto mais cristalina for a sua estrutura, maior será o tempo para ser reabsorvida. A incorporação do íon zinco à hidroxiapatita se baseou na premissa de que este íon é essencial para o metabolismo do organismo, e por isso poderia ter influência direta na remodelação óssea, além de ser um componente da parte mineral do tecido ósseo. Tem sido reportado na literatura que o zinco tem potencial estimulador da

mineralização óssea, produção de colágeno, diferenciação e proliferação dos osteoblastos, modulação da atividade osteoclástica, e também relacionado a expressão do transportador de vitamina C dependente de sódio II, o que envolve a diferenciação do osteoclasto. Além do mais o zinco age no co-fator da síntese de fosfatase alcalina. O estudo avaliou a modulação da interação entre célula-biomaterial *in vitro*, observando a superfície de contato com proteínas e peptídeos envolvidos na adesão e proliferação celular.

A avaliação morfológica através da microscopia eletrônica de varredura demonstrou que a incorporação de zinco à estrutura de hidroxiapatita melhorava consideravelmente a adsorção proteica no início da neoformação óssea, o que resulta em um favorecimento para diferenciação osteoblástica no local do enxerto. Havia um maior número de células na interface com o biomaterial ZnHA, e as células encontravam-se mais “*flat shape*” em relação a hidroxiapatita sozinha. É importante ressaltar que a topografia nanométrica é um parâmetro de influência direta sobre a adesão celular e mobilidade. Tal benefício acarreta em uma melhoria na velocidade da neoformação óssea, como também na qualidade do osso neoformado, que pode ser avaliada através das proteínas ósseas presentes no local do enxerto, como a osteocalcina, fosfatase alcalina, osteopontina e osteoprotegerina (MAVROPOULOS et al., 2013).

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

O que necessita ser melhor compreendido é seu potencial osteoindutor, principalmente com o advento da nanobiotecnologia. Biomateriais em escalas nanométricas devem desempenhar uma reação molecular através de sua interação com as células presentes no local de enxerto. Essa interação ocorre primeiramente devido a angiogênese no local do enxerto, em que a proliferação de vasos sanguíneos promove nutrição ao tecido e favorece a migração e proliferação celular. E segundo, devido ao tamanho da partícula do biomaterial que estabelece íntimo contato com a membrana celular. Portanto, as nano-hidroxiapatitas (nHA) tem sido desenvolvidas para facilitar e acelerar o processo de neoformação óssea através de

sua superfície de contato nanométrica e interação dos elementos químicos com as células. No entanto o processo de síntese, temperatura, pressão e tamanho em nanômetros também influenciam nas propriedades biológicas e químicas da hidroxiapatita (PANG et al., 2015).

Através da injeção subcutânea de partículas de hidroxiapatita e β TCP, foi possível analisar a capacidade osteogênica destes biomateriais. Comparados ao controle positivo, células de osteossarcoma, através dos métodos de análises de cintilografia e histológicos, foi comprovado que estes biomateriais analisados na pesquisa não são capazes de induzir a produção de tecidos minerais em sítios ectópicos. Ao contrário das células de osteossarcoma que induziram a formação de um tecido mineralizado que aumentou ao decorrer do período de análise, o biomaterial β TCP até apresentou uma região mineralizada no período de duas semanas, mas que não se consolidou em tecido, nos períodos subsequentes de 4 e 6 semanas. Sendo assim, a capacidade osteoindutora e osteogênica de biomateriais sintéticos ainda precisa ser melhor estudada (NAKAYAMA; AWASE; OGAMI, 2010).

A hidroxiapatita desempenha também um papel de carreador de indutores de crescimento ósseo. Em um estudo foi descrito o emprego da hidroxiapatita (HA) associada ou não a proteína óssea morfogenética (BMP) em defeitos de tamanho crítico em calvária. Vinte ratos “*wistar*” machos foram divididos em quatro grupos de cinco animais cada: controle, HA, BMP e HA/BMP. Um defeito de tamanho crítico foi realizado com uma trefina de 4 mm no osso calvária e em seguida foi aplicado os diferentes biomateriais de acordo com cada grupo. Os defeitos foram avaliados radiograficamente e histologicamente usando “*software ImageJ*” 4 semanas após a cirurgia. A maior radiopacidade foi observada no misto HA/BMP, seguida pela HA, BMP e, por último, o grupo de controle. Na análise histológica a maior taxa de osteogênese foi no grupo HA/BMP, seguido por BMP, HA e, por último, o grupo controle. No período de quatro semanas, a mistura HA/BMP mostrou o maior nível de indução óssea, especialmente em comparação ao grupo de BMP. Isto revela a necessidade de um carreador cerâmico para a BMP. A associação da HA a indutores ósseos tem um efeito positivo sobre a osteogênese em defeitos críticos (NOTODIHARDJO et al., 2012).

A avaliação do desempenho da BMP2 associada ao fosfato de cálcio bifásico foi reportada por Wang et al., (2016a) em um experimento *in vivo*, com defeitos críticos em calvária de ratos de 8mm. A intenção foi avaliar o mecanismo osteoindutor da

BMP2 em pequenas doses, associadas ao biomaterial a base de fosfato de cálcio, e comparar a neoformação óssea com enxerto de osso autógeno. Sabemos que o potencial osteoindutor é capaz de promover a diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos, e subsequente neoformação óssea. Porém, há a necessidade de se manter o arcaçouço para a neoformação óssea a fim de se conseguir maior volume de osso neoformado. A associação de BMPs com biomateriais sintéticos a base de fosfato de cálcio tem resultados promissores, pois através da osteocondução temos uma neoformação óssea contínua ao remanescente e, através da BMP conseguimos sítios de neoformação óssea no centro do defeito crítico, uma vez que, em defeitos críticos de calvária, a neoformação óssea é centrípeta, partindo da borda do remanescente ósseo (PATEL et al., 2008).

O grupo testado: BMP2copBioCaP (proteína osseomorfo genética em um polímero de fosfato de cálcio biomimético) + BCP (fosfato de cálcio bifásico: Bone Ceramic ^R) demonstrou uma neoformação óssea muito semelhante ao grupo preenchido por osso autógeno, através das análises de micro-CT e histomorfometria. Este estudo também demonstrou que para se conseguir uma neoformação óssea de qualidade, não basta o biomaterial ser osteoindutor, pois é necessário um biomaterial que tenha carga para guiar a estrutura neoformada. O grupo de BMP2 sozinha apresentou volume ósseo neoformado menor do que quando foi associada ao BCP. Em suma, os grupos controle que não receberam BMP2 ou osso autógeno, tiveram uma discreta neoformação óssea, apenas por osteocondução, seguindo as margens do defeito. Este tipo de neoformação por osteocondução não demonstrou aumento com o tempo superior a 4 semanas, devido a degradação do biomaterial. No entanto, quando há a associação entre BMP2copBioCap e o BCP, encontramos sítios de neoformação óssea no centro do defeito crítico, decorrente da osteoindução, e ao decorrer do tempo, essa quantidade tende a aumentar, nos períodos de 4 e 12 semanas. Através das análises estatísticas, concluiu-se que o grupo testado foi tão efetivo para neoformação óssea quanto o grupo controle positivo, osso autógeno, provando que a associação entre BMPs e biomateriais aloplásticos tem resultados satisfatórios para reconstruções ósseas, e a associação deles apresenta melhores resultados do que utilizados isoladamente (WANG et al., 2016a).

A adição de íons na estrutura química de um biomaterial também já foi

relatada no β TCP. O íon bivalente magnésio, é conhecido por fazer parte do processo inicial da osteogênese, e por ser um fator chave para a ativação de reações enzimáticas. A sua incorporação no trifosfato de cálcio aumenta a sua estabilidade química e reduz a sua solubilidade na interface célula-biomaterial, conferindo um maior tempo para reabsorção, e com isso mantendo a arquitetura para neoformação óssea por mais tempo. A adição de magnésio ao β TCP também conferiu melhoras no recrutamento osteoblástico e diferenciação celular, além de ter um efeito inibidor da atividade osteoclástica. A neoformação óssea observada em defeitos críticos de calvária de ratos comparando os dois tipos de trifosfato de cálcio foi significativamente melhor no grupo com adição de magnésio, onde áreas de neoformação óssea foram detectadas no centro do defeito crítico, enquanto os demais grupos controle tiveram a neoformação óssea seguindo apenas a borda óssea do defeito (COSTA et al., 2016).

Um estudo avaliando as propriedades biológicas da nano-hidroxiapatita *in vivo* envolvendo três modelos experimentais em ratos, demonstrou que em defeitos críticos de calvária de ratos, de 8mm de diâmetro, houve mais formação óssea no grupo com hidroxiapatita nanométrica que o grupo com a hidroxiapatita convencional, segundo análise histomorfométrica e micro-tomográfica. Este estudo também investigou o comportamento tecidual frente a enxertia ectópica do biomaterial nanométrico no tecido muscular da coxa dos ratos. A análise imunohistoquímica confirmou a presença de proteínas osteoprogenitoras, como a osteopontina, osteonectina, osteocalcina, no local de enxerto, elucidando o potencial osteoindutor da hidroxiapatita em nanoescala. E em uma terceira etapa do estudo, os autores avaliaram a osseointegração de implantes de titânio com a superfície tratada com a nano-hidroxiapatita e sem tratamento de superfície. Os implantes foram instalados em tíbias de coelhos, bilateralmente. O estudo avaliou por microscopia de força atômica a interface osso-implante e a área de osso neoformado, e na remoção dos implantes, foi observada o torque para extração após 8 semanas. Os resultados concluíram que a osseointegração foi acelerada pelo revestimento de nano-hidroxiapatita na superfície do implante (PANG et al., 2015).

A regeneração óssea utilizando nano-hidroxiapatita foi avaliada no modelo de defeito ósseo crítico em calvária de coelhos. A regeneração óssea foi avaliada por micro-CT e análise histomorfométrica após 4 e 8 semanas. Todas as variáveis medidas através da análise de micro-CT foram significativamente melhores nos

grupos enxertados com nHA do que nos grupos controle não preenchidos, tanto para 4 e 8 semanas. Considerando a rápida cicatrização de defeito ósseo e a boa disponibilidade a nHA, o estudo sugere que esse biomaterial pode ser um bom substituto ósseo (KWEON et al., 2011).

Na tentativa de minimizar as sequelas ósseas, seja por anomalias congênitas, cirurgias ressectivas, traumas, atrofia do rebordo alveolar, as pesquisas também tem se direcionado a desenvolver biomateriais osteocondutores impregnados em uma matriz proteica porosa, chamada “*scaffold*”, que além de possibilitar um maior volume de biomaterial, também pode desencadear reações teciduais que favorecem a regeneração (GUDA et al., 2012).

A engenharia tecidual tem buscado alternativas para enxertos através de biocompósitos de hidrogel. Com a utilização da nanoescala, alguns autores relatam que as propriedades mecânicas da microestrutura de hidroxiapatita podem ser alteradas, diminuindo a sua eficiência. No entanto, quando se trata de biocompósitos, a associação do hidrogel de pectina (proteína natural do organismo humano) foi melhor com a nano-hidroxiapatita, comparada a hidroxiapatita de partículas micrométricas, segundo as análises de caracterização por espectrofotometria. A composição química, tamanho das partículas, microestrutura, área superficial e solubilidade considerados neste trabalho afetaram os aspectos cinéticos e estabilidade do biocompósito. Os pós nanométricos de hidroxiapatita mostraram grande potencial para o desenvolvimento de hidrogéis, mimetizando a estrutura biológica do osso, que podem ser propostos como sistemas de recrutamento celular e “*drug-delivery*” (MUNARIN et al., 2015).

Guda et al., (2012), tentaram mimetizar a arquitetura óssea ao sintetizarem uma bicamada de poliuretano em forma de esponja com cristais de hidroxiapatita, especialmente para preenchimentos alveolares. A esponja era composta por uma porção exterior menos porosa (200 micrômetros – 250 micrômetros), a fim de se imitar a cortical óssea. E uma porção mais interior, com poros maiores, simulando o osso trabecular (340-450 micrômetros). Foram testados seis grupos deste “*scaffold*” com diferentes porosidades e volumes, e através da análise de microtomografia computadorizada, foram analisados nove parâmetros relativos à microarquitetura óssea, dentre eles: densidade, microestrutura, espaço entre as trabéculas, número de trabéculas, superfície do biomaterial, anisotropia, entre outros. Foi possível concluir que o compósito mimetizou a microarquitetura óssea, especialmente quando

os poros foram 200 e 450 micrômetros para cortical e trabecular, respectivamente. Além do mais, foi possível identificar o módulo de elasticidade semelhante ao do tecido ósseo, sugerindo um baixo risco ao estresse, e conseqüentemente reabsorção patológica.

Seguindo a linha das terapias de regeneração em 3D, Okawa et al., (2016) estudaram o mecanismo de osteoindução baseado em culturas de células transplantadas em “*scaffold*” à base de fibrina. Fibroblastos gengivais derivados de corpos embrionários foram semeados em cultura com meio indutor osteogênico. Formou-se então uma massa celular desestruturada e tecido ósseo, porção mineralizada correspondente à hidroxiapatita. Estas células e estruturas mineralizadas permeadas pelo “*scaffold*” a base de fibrina foram transplantadas na região subcutânea do dorso de camundongos imunodeficientes. Em um prazo de 4 semanas, a região foi processada para avaliação histológica, onde detectou-se formação óssea ectópica e a presença de fatores de transcrição osteoindutores, Runx2 e osterix, pelo método PCR. Estes resultados sugerem que as células pluripotentes podem facilitar as reconstruções ósseas 3D, onde a região mineral servirá como um arcabouço e as células como guias da osteoindução no processo de neoformação óssea.

Nanotubos de titânio foram revestidos com hidroxiapatita carbonatada a fim de se verificar as melhoras químicas e biológicas que as trocas iônicas e a nanoescala podem trazer aos biomateriais para neoformação óssea. A osteocondutividade, biocompatibilidade e bioatividade dos fosfatos de cálcio e do metal titânio fazem com que a nanotecnologia nas áreas ortopédica e odontológica aprimorem os mecanismos de produção de biomateriais e revestimentos de implantes. Além do embricamento mecânico, devemos requerer trocas e interações iônicas e também, reações moleculares, a fim de melhorar a interação entre os biomateriais e os tecidos vivos. A substituição dos íons fosfato pelos íons carbonato alcaliniza o meio, por ação das hidroxilas, deixando o ambiente mais fisiológico para a reparação óssea. Além do mais, os íons carbonato diminuem o conteúdo iônico da molécula, reduzindo a cristalinidade, portanto, aumenta a velocidade de reabsorção da partícula, e conseqüente substituição por novo tecido ósseo (UTKU et al., 2014).

Tanto a implantodontia como a periodontia, e demais áreas médicas que se interessam por reconstituições ósseas, tem se interessado pela engenharia tecidual, com a finalidade de utilizar biomateriais sintéticos para aplicações biomédicas,

principalmente devido à biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade. A semelhança química da hidroxiapatita sintética com a natural facilita a sua indicação para a enxertia, porém, com o avanço da engenharia tecidual, tem sido relatado que a introdução ou substituição de íons na fórmula química das biocerâmicas em geral, tem melhorado suas performances biológicas. Assim como o biomaterial de escala nanométrica aumenta a sua bioatividade devido a sua alta energia de superfície, aumentando a migração e proliferação de células osteogênicas. Portanto, aprimorar a estrutura química da hidroxiapatita utilizando destas duas possibilidades pode ser um caminho para desenvolver um biomaterial bastante efetivo (COSTA et al., 2016; GENG et al., 2017; PANG et al., 2015).

Diferentes biomateriais sintéticos foram comparados ao osso autógeno e alógeno em distúrbios degenerativos de espinha vertebral em humanos. Os enxertos sintéticos utilizados foram β TCP, HA, sulfato de cálcio e PMMA (polimetilmetacrilato), e foram avaliados por métodos radiográficos relativos à neoformação óssea na região do defeito espinhal com acompanhamento de mais de um ano. Todos os biomateriais sintéticos demonstraram boa capacidade para reparar o tecido ósseo, similar ao osso autógeno, com exceção do PMMA. Os resultados estatísticos mais próximos ao resultado do osso autógeno foram β TCP, HA e sulfato de cálcio, respectivamente. Conclui-se que o objetivo de reduzir a morbidade pós-operatória relativa ao enxerto autógeno e minimizar riscos de antigenicidade relativos ao enxerto alógeno, pode ser conseguido com o desenvolvimento de biomateriais sintéticos efetivos para neoformação óssea (BUSER et al., 2016).

Um estudo comparativo entre nano-hidroxiapatita e β TCP foi realizado em tratamentos de defeitos periodontais infra-ósseos. Foram selecionados 12 pacientes, os quais 6 pacientes para cada grupo foram divididos aleatoriamente. Os defeitos periodontais verticais em região de molares inferiores foram tratados com nano-hidroxiapatita e β TCP através da cirurgia a retalho. Após 3 e 6 meses foram avaliados os seguintes parâmetros clínicos: recessão gengival, profundidade de sondagem, nível de inserção clínica. Os dois biomateriais melhoraram o tratamento dos defeitos ósseos associados à cirurgia a retalho. Os parâmetros clínicos observados três meses após a cirurgia mostraram que a utilização da nano-hidroxiapatita resultou em melhoras mais significativas comparada ao grupo β TCP. Porém, aos seis meses houve equivalência estatística dos resultados (JAIN, 2014).

Geng et al., (2017), compararam diferentes hidroxiapatitas nanométricas enriquecidas com estrôncio em suas composições com um grupo controle de hidroxiapatitas nanométricas sem o íon bivalente. As nano-hidroxiapatitas passaram por processos de síntese diferentes entre si, o que resultou em nanopartículas de diferentes tamanhos. A SrHA-2, foi a hidroxiapatita que apresentou o “*nanorod*” morfológico, ou seja, muito similar ao tecido ósseo humano. Os outros três grupos de hidroxiapatita : HA-1, HA-2 e SrHA-1 apresentaram os “*nanorods*” bem menores que o tecido ósseo natural. Isto demonstra que o desempenho biológico das hidroxiapatitas nanométricas dependem da nanoescala semelhante à estrutura óssea, ou seja, não basta ser nanométrico, o “*nanorod*” precisa ser similar às estruturas ósseas. A análise do comportamento celular frente a estes diferentes grupos de hidroxiapatita foi realizado em cultura de células de osteossarcoma. Através da análise imunistoquímica, foi observada uma intensa proliferação celular no grupo SrHA-2, comparado aos demais, bem como a atividade da enzima fosfatase alcalina. Pelo método PCR, foi analisado a expressão de genes relacionados à osteogênese, como Runx2, FA e OC, não havendo diferenças estatísticas significantes entre os grupos, porém, os autores relataram que nas nano-hidroxiapatitas enriquecidas com estrôncio, a expressão destes genes foi maior comparada as nano-hidroxiapatitas convencionais.

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

2.4 CARBOAPATITA NANOMÉTRICA

A HA nanoestruturada é o principal componente inorgânico do osso. Atualmente muitas metodologias de produção de HA micro e nanoestruturada têm sido descritas, e tem sido amplamente utilizadas em diversas aplicações clínicas de

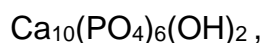
diversas formas (pós, grânulos, blocos porosos ou densos, filmes espessos e finos). Sendo assim, com o advento da nanotecnologia, a HA nanométrica tem sido preparada e estudada com o intuito de poder melhorar as propriedades biológicas da HA (por exemplo, adsorção, configuração e bioatividade). Portanto, modulando a estrutura da HA é possível melhorar a adesão dos osteoblastos e posteriormente alcança-se uma funcionalidade superior a longo prazo (CARMO, 2012). Webster (2000a), descobriu que o melhoramento das funções dos osteoblastos, induzido pela estrutura nanométrica da HA, se verifica essencialmente na adesão e proliferação celulares, bem como na síntese de fosfatase alcalina e deposição de cálcio. A topografia das partículas nanométricas e a molhabilidade são propriedades dos nanocerâmicos que não só promovem o aumento seletivo da adsorção da vitronectina (uma proteína que promove a adesão dos osteoblastos) como afetam também as conformações que melhoram as funções dos osteoblastos (GENG et al., 2017; PANG et al., 2015). Além disso, um aumento considerável nas funções celulares de osteoclastos de ratos “*wistar*” (como a síntese de TRAP e a formação de lacunas de reabsorção) tem sido observado em superfícies nanoestruturadas em relação às superfícies convencionais (WEBSTER, 2000a).

A engenharia de tecidos tem utilizado “*scaffolds*” bioativos com constituintes cerâmicos e sinalizadores da osteogênese para reconstruções ósseas. Utilizar da cerâmica em nanoescala resulta em um aumento da relação superfície/volume, melhorando assim a solubilidade, a atividade catalítica de superfície e condutividade elétrica. Verificou-se que as nanocerâmicas são capazes de induzir a osteocondução, osteointegração, osteogênese e osteoindução. As nanocerâmicas são capazes de recrutar fatores osteogênicos para a sua superfície, regulando positivamente a nucleação de cálcio e fosfato, e proliferação e diferenciação. Com isso, os níveis de marcadores de neoformação óssea como OC, OPG, BMPs e Runx2 são bastante evidentes nas análises imunoistoquímicas. Além do mais, o aumento da área de superfície de contato aumenta a lixiviação de íons cálcio que promovem a expressão de angiopoietina-1, que influencia na osteogênese, e na produção e mineralização do tecido ósseo através de OC e FA (SAI NIEVETHITHA et al., 2017).

Descrição do biomaterial conforme o documento de registro de patente internacional: (WO2016187685) CARBOAPATITA NANOMÉTRICA COM ESPECIFICIDADE PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA (**ANEXO A**):

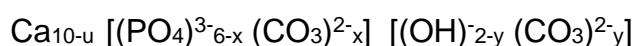
A estrutura óssea mineral é constituída em sua maioria por cristais de hidroxiapatita, e para a sua formação são requeridas trocas iônicas que partem inicialmente da combinação de cálcio e fosfato, formando várias biocerâmicas de fosfato de cálcio com diferentes características físicas e químicas que resultam em diferentes propriedades biológicas. Para a utilização de biomateriais sintéticos com o objetivo de estimular o reparo ou regeneração óssea, estes biomateriais precisam ter características físico-químicas específicas, capazes de produzir uma reação celular. Isto pode ser conseguido através de íons, moléculas adicionadas ou substituindo outros componentes na estrutura química, ou também através da nanobiotecnologia, que possibilita uma interação molecular com as células do organismo, melhorando ou regulando as suas atividades.

Na fórmula química da hidroxiapatita, temos:



A adição ou substituição de íons é possível, tanto cátions quanto ânions, por exemplo: íons magnésio, zinco, cobre, etc.

Modificando a estequiometria da hidroxiapatita, mudamos sua disposição tridimensional, e com isso alteramos a sua cristalinidade. A cristalinidade de um biomaterial para enxerto ósseo é de suma importância para desempenhar uma resposta celular adequada. O íon carbonato (CO_3^{2-}) pode ocupar duas posições na fórmula da hidroxiapatita: ocupando o lugar da hidroxila, numa ligação livre e espontânea, ou ocupando o lugar do fosfato, em uma ligação mais estável. Para desempenhar uma função biológica melhor, o ideal é que o carbonato substitua o fosfato, e assim teremos uma conformação tridimensional mais eficiente para a resposta biológica, visto que, o carbono ocupa o lugar do fosfato, a estrutura fica mais porosa, com menor cristalinidade, melhorando o desempenho das reações celulares.



Dentre os fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita carbonatada $\{\text{Ca}_x [(\text{PO}_4)_{6-x} (\text{CO}_3)_x] (\text{OH})_{2-x}\}$ tem sido estudada e aplicada como enxerto ósseo, sendo considerado um dos materiais mais promissores para a reintegração óssea. Isso pode ser compreendido devido a sua elevada similaridade química com a subunidade inorgânica de ossos e dentes (que apresentam até 8% de carbonato) além de não ser um material tóxico nem carcinogênico. É conhecido que suas superfícies bioativas propiciam ligações químicas fortes com os ossos em contato.

Esta propriedade tem sido explorada para a rápida recuperação óssea após traumas ou cirurgias permitindo o acompanhamento periódico por meio de exames. Apesar das hidroxiapatitas estequiométricas poderem ser constituídas por partículas pequenas, os biomateriais comerciais à base delas, após o processo de fabricação, são tratados a elevadas temperaturas e apresentam como formato final, para uso clínico, partículas maiores que 100 nm, na maioria das vezes, formada por duas fases cristalinas. Este processo de sinterização pode melhorar as propriedades mecânicas do material, mas inviabiliza suas características nanoestruturadas diminuindo a atividade química do material e suas propriedades de reabsorção no meio biológico.

A hidroxiapatita pura é uma estrutura muito cristalina. Sabendo que a cristalinidade interfere na resposta celular, diminuindo a cristalinidade, aumentamos a velocidade de resposta celular. Os íons carbonatos possibilitam essa diminuição da cristalinidade e com isso, provocam o aumento da porosidade da estrutura, facilitando a angiogênese e migração de células osteoprogenitoras.

Quando reduzimos a cristalinidade da hidroxiapatita, ela torna-se nanométrica, devido ao tamanho dos cristalitos sintetizados a altas temperaturas, pela adição de carbonato. A cristalinidade da HAPNC está entre 40 a 60 *angstroms* (Å).

O tecido ósseo tem a sua cristalinidade na ordem de 60 a 80 *angstroms* (10^{-10}). Para ser categorizado como nanométrico, um material precisa ter sua cristalinidade em nanômetros = 10^{-9} , portanto, a cristalinidade óssea, bem como a cristalinidade da carboapatita estão na classificação de ordem nanométrica. Muitos dos biomateriais comercializados para enxerto ósseo possuem a cristalinidade entre 1.500 a 4.000 *angstroms*, portanto não são nanométricos. Nanopartículas com diâmetro de 1 a 100 nm possuem características físico-químicas únicas que implicam em melhorias nas respostas biológicas. Nanopartículas de HA são capazes de internalizar células mesenquimais e desencadear respostas moleculares para a diferenciação destas células (CHEN et al., 2011).

Quando colocamos um biomaterial a base de fosfato de cálcio (HA ou TCP), ou quaisquer das outras biocerâmicas utilizadas para neoformação óssea, este biomaterial necessita ser reabsorvido pelos osteoclastos e desencadear uma resposta osteoblástica para a neoformação óssea. Essa reabsorção é lenta, devido a diferença de cristalinidade entre o osso e o biomaterial. O TCP é um fosfato de

cálcio amorfo, e para ser reabsorvido e substituído por novo osso, por exemplo, ele necessita ser hidroxilado. Portanto, a neoformação óssea acontece às custas de várias reações químicas, para que a resposta tecidual ocorra de forma apropriada.

Os nanobiomateriais podem ser associados para realizar funções celulares diferentes. Através da interação eletrostática, o óxido de grafeno foi utilizado como veículo de BMP2 em albumina sérica, a fim de servir com “*drug delivery*”. Em “*scaffolds*” de hidroxiapatita e beta trifosfato de cálcio, o nanobiocompósito promoveu melhor ancoragem de células mesenquimais e diferenciação em osteoblastos e, portanto, maior neoformação óssea comparado aos grupos controle. Isso mostra que as nanoestruturas facilitam a conexão com as células multipotentes (XIE et al., 2017).

A carboapatita nanométrica foi desenvolvida com o seguinte intuito: gerar uma resposta para neoformação óssea mais rápida, diminuindo a cristalinidade, deixando-a mais próxima a do osso natural, e sendo nanométrica, a resposta celular frente ao biomaterial é mais acelerada. Sendo assim, todo o processo de formação da hidroxiapatita natural do organismo é encurtado, pois a HAPNC já é a matéria-prima final.

A incorporação de CO_3^{2-} na estrutura química, deixa as moléculas mais desorganizadas, e com isso a apatita fica mais porosa. Aumentando a porosidade, facilitamos a angiogênese, e com isso a chegada de células osteoprogenitoras, fatores de crescimento e sinalizadores químicos para iniciar o processo de formação óssea.

Novas estratégias terapêuticas vem sendo utilizadas através de “*scaffolds*” de nanobiocompósitos. Zhang et al., (2017) utilizaram nanobiocompósito HA/PLGA (poli-lactídeo co-glicosídeo) para carrear células mesenquimais e BMP2 em defeitos ósseos críticos e área ectópica intramuscular. Além de detectarem maior neoformação óssea, identificaram maior área mineralizada na região ectópica, o que corrobora com os estudos sobre capacidade osteoindutora das nano-hidroxiapatitas.

3 OBJETIVOS

O presente estudo objetiva avaliar a resposta tecidual aos mecanismos biológicos para regeneração óssea com a utilização da HAPNC, bem como a viabilidade de sua utilização. Identificar e quantificar, através da análise histológica e histomorfométrica, as áreas de tecido ósseo neoformado nos períodos experimentais de 30 e 60 dias, e comparar os resultados obtidos ao grupo osso autógeno. Através da análise morfométrica por microtomografia computadorizada, pretendeu-se identificar a presença de HAPNC ao longo do defeito cirúrgico, durante os períodos experimentais de 30 e 60 dias, e avaliar quantitativamente a presença de conteúdo mineral no centro do defeito crítico, simulando o corte histológico, e comparar estes resultados ao grupo controle positivo: osso autógeno.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

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

4.1 MODELO EXPERIMENTAL

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG pelo número 029/2016 (**ANEXO B**). Para o presente trabalho foram utilizados 46 ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*), machos, com peso entre 400 e 550 gramas (Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG). Os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura entre 22 e 24°C, com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e com consumo de ração sólida e água *ad libitum* durante todo período experimental. Os animais foram aleatoriamente divididos em 3 grupos para análises histomorfométricas e morfométricas: Controle negativo coágulo (COA) com 8 animais; grupo tratado com HAPNC (HAPNC) com 16 animais, controle positivo osso autógeno (OA) com 16 animais; e um grupo específico para microscopia eletrônica de varredura foi criado, com 4 animais tratados e 2 animais controle positivo. Os animais foram eutanasiados após 30 e 60 dias pós-operatórios. Os grupos estão descritos abaixo.

4.1.1 Grupos controles:

COA: coágulo: controle negativo:

4 animais eutanasiados após 30 dias;

4 animais eutanasiados após 60 dias.

OA: osso autógeno: controle positivo:

8 animais eutanasiados após 30 dias;

8 animais eutanasiados após 60 dias.

4.1.2 Grupo experimental:

HAPNC: carboapatita nanométrica:

8 animais eutanasiados após 30 dias;

8 animais eutanasiados após 60 dias.

4.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de cloridrato de xilazina (10mg/kg) (Rompum®, Bayer, Brasil) e cloridrato de quetamina (90mg/kg) (Dopalen®, Vetbrands, Brasil). Os animais receberam anestesia local via subcutânea com lidocaína 2% e epinefrina (1:100.000). Foi realizada a tricotomia na região fronto-parietal da calvária dos animais e antissepsia com polivinilpirrolidona-iodado (PVPI) a 10% com 1% de iodo ativo (Riodeine®, Rioquímica Ltda, São José do Rio Preto, SP, Brasil). Uma incisão em “U” foi realizada com base caudal na calvária do rato com lâmina de bisturi 15c e um retalho de espessura total descolado em direção posterior. Foi confeccionado um defeito de tamanho crítico na calvária do rato, conforme mostrado na Figura 1. Para isso utilizamos broca trefina de 6 mm de diâmetro (Neodent, Curitiba, Brasil) acoplada em motor elétrico NSK, rotação 1200 rpm, e sob refrigeração abundante com soro fisiológico estéril (Fisiológico 0,9%, Equiplax®, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil).

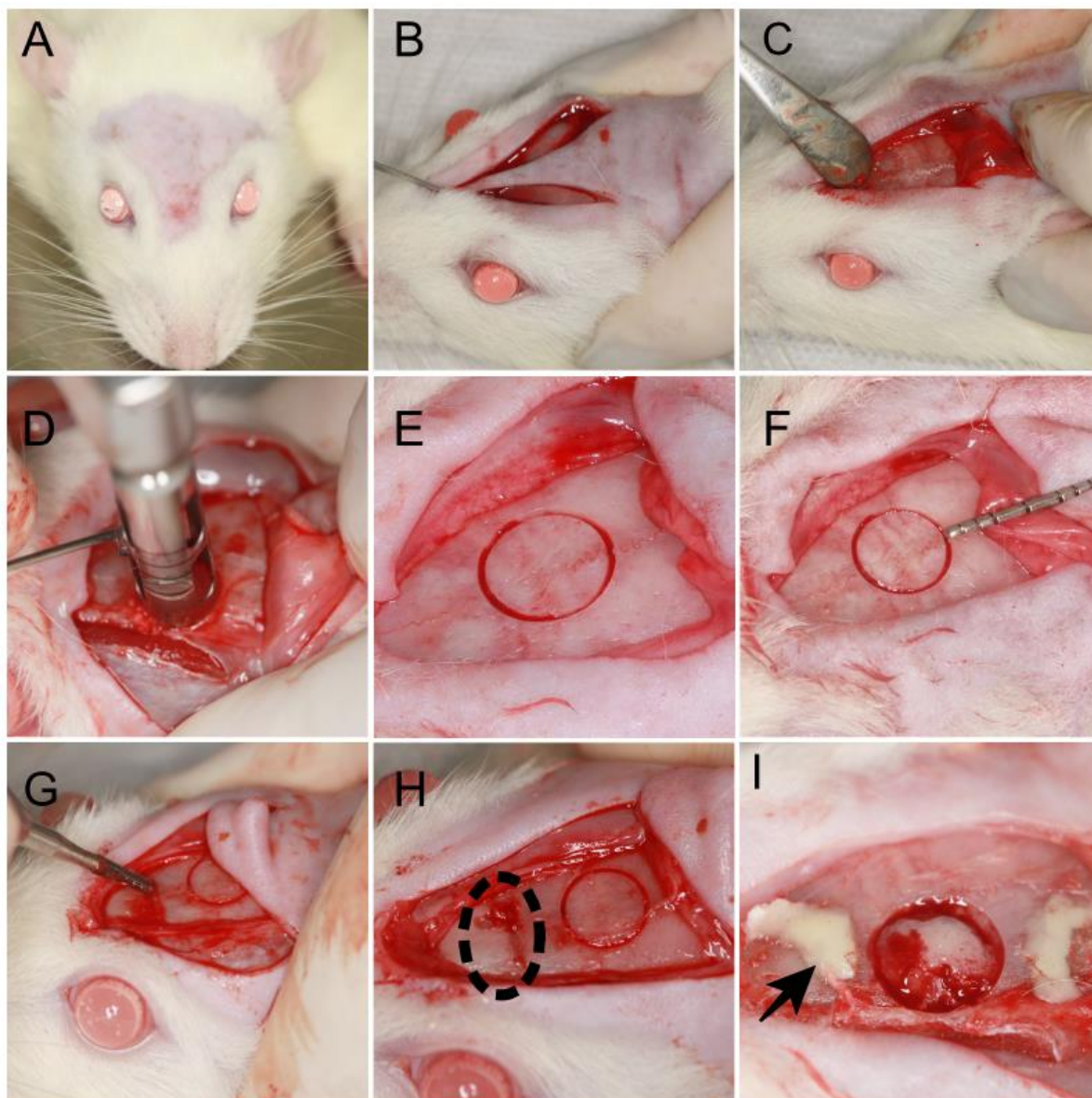


Figura 1- Criação do defeito crítico com broca trefina 6mm e marcações em “L”.

Fonte: Do autor.

Notas: A: tricotomia fronto-parietal; B: incisão em “U” com base caudal; C: retalho de espessura total; D: Criação do defeito com broca trefina 6mm, motor NSK, 1200 rpm; E: circunferência correspondente ao tamanho do defeito; F: Medida de 2mm aquém da borda do defeito, com sonda milimetrada para marcação em “L”; G: broca tronco-cônica confeccionando a canaleta; H: marcação em “L”; I: preenchimento da canaleta com CIV.

Marcações em formato de “L” foram feitas com broca carbide tronco-cônica 701 (KG Sorensen) a 2 mm anterior e a 2 mm posterior às margens do defeito cirúrgico, medida com sonda milimetrada periodontal, e preenchidas com ionômero de vidro (Vitrebond, 3M, Brasil) , fotopolimerizado por 20 segundos com luz de led Rádii-cal, protegendo os olhos do animal com gaze umidecida com soro fisiológico (MESSORA et al., 2008; SILVA et al., 2016). O maior eixo de cada “L” localizou-se sobre uma linha imaginária longitudinal crânio-caudal que dividiu o defeito cirúrgico ao meio. Estas marcações são úteis para a identificação do meio do defeito cirúrgico original durante o processamento laboratorial, permitindo localizar as margens ósseas originais do defeito durante a análise histológica (Figura 1). Após a confecção do defeito crítico de 6mm (UMOH et al., 2009), os grupos receberam os respectivos enxertos, o grupo experimental recebeu HAPNC, o grupo controle positivo recebeu enxerto autógeno particulado, e o grupo controle negativo teve o fechamento da ferida apenas com preenchimento de coágulo. O preenchimento do grupo HAPNC foi realizado com uma colher de medida padrão, depositado em um béquer e umidecido com uma gota de soro fisiológico estéril para facilitar a sua colocação no defeito com o descolador de Molt (Figura 2).

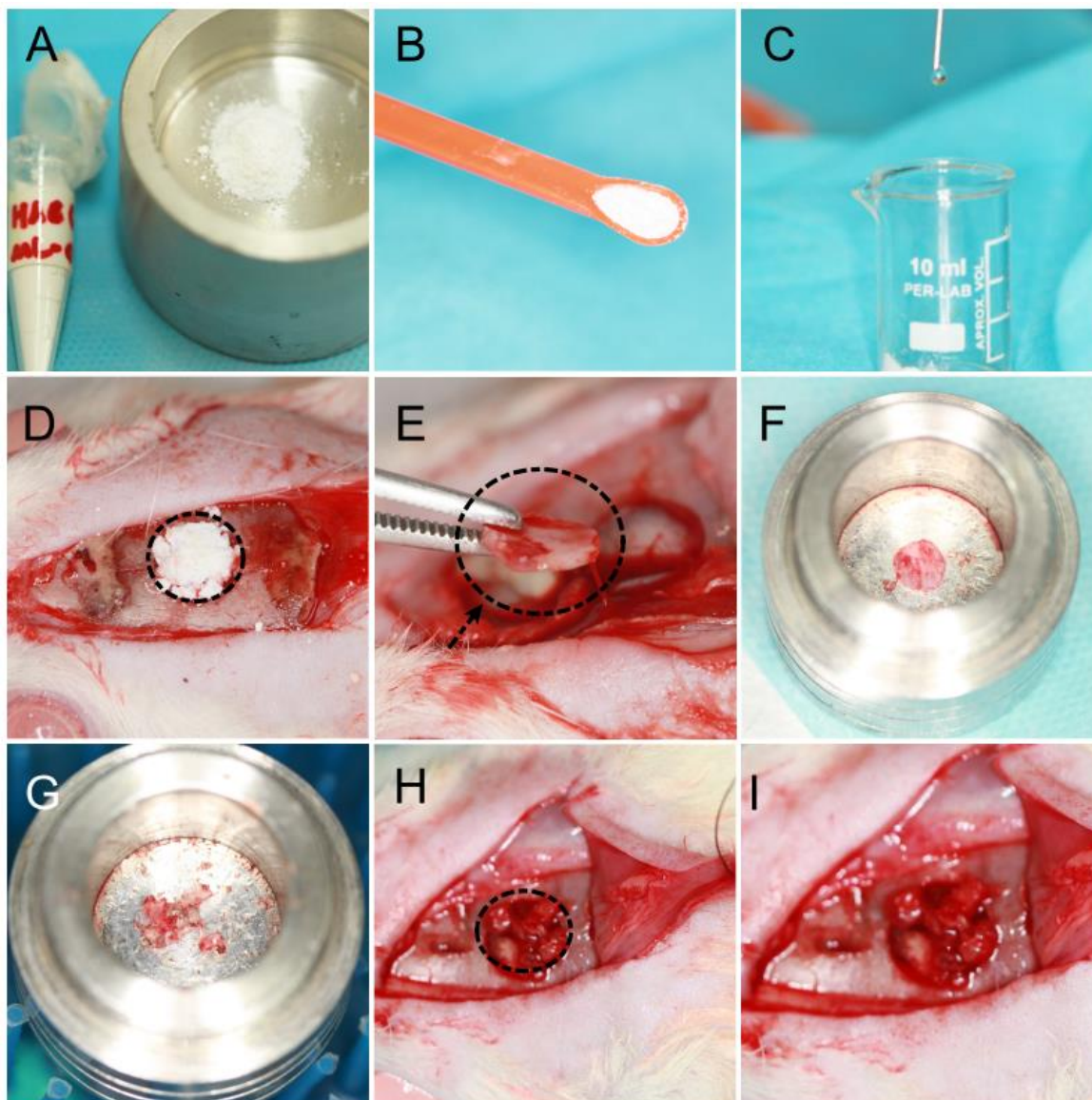


Figura 2- Defeito crítico preenchido com HAPNC e OA.

Fonte: Do autor.

Notas: A: HAPNC em tubo Eppendorf e dispensada em cuba de inox; B: Colher medidora para padronização da quantidade HAPNC a ser enxertado; C: hidratação com uma gota de soro fisiológico estéril; D: HAPNC preenchendo o defeito ósseo; E: exérese do tecido ostectomizado; F: Tecido ostectomizado em cuba de inox para ser triturado; G: osso autógeno particulado. H e I: partículas de osso autógeno posicionadas no defeito.

O grupo que recebeu o osso autógeno, teve a exérese da circunferência óssea ostectomizada e particulada em um moedor de osso, e após a trituração, foi colocada novamente na região do defeito (FIGURA 2).

O grupo coágulo teve o defeito confeccionado com a trefina, remoção da circunferência óssea e o fechamento da ferida com apenas o preenchimento de

coágulo sanguíneo na região do defeito. Os retalhos foram reposicionados e suturados com fio de nylon 3.0 (Ethicon, Johnson&Johnson, Brasil). Após a cirurgia, os animais receberam uma dose única de penicilina G - benzatina (Pentabiótico Veterinário para animais de pequeno porte - Fort Dodge, Campinas, SP, Brasil), de 0,03ml via intramuscular. E uma dose analgésica de 0,5 ml de fosfato de codeína 20mg/Kg (ampola 30mg/2mL), por via intraperitoneal. As doses analgésicas foram administradas ao final do procedimento, e por mais 3 dias, de 24/24 horas (MARIANO et al., 2010).

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

4.3 EUTANÁSIA

Em conformidade com as normas do CONCEA para a prática da eutanásia, o método escolhido deve garantir a perda de consciência de forma rápida, irreversível e desprovida de experiência emocional ou física desagradável, ou seja, o animal não deve apresentar dor, estresse, apreensão ou ansiedade. O método escolhido foi a eutanásia pela câmara de CO₂, que possui um rápido início de ação, causa pronta perda de consciência e, portanto, mínimo desconforto ao animal. Os animais foram eutanasiados nos períodos de 30 e 60 dias pós-operatórios.

4.4 PROCESSAMENTO DAS PEÇAS

As peças foram fixadas em paraformaldeído 4% (ph=7.2), por 24 horas e depois em álcool 70°, lavadas em água corrente e descalcificadas em solução de ácido etilenodiaminotetracético (E.D.T.A.) a 18% (Ludwig Biotecnologia LTDA, Alvorada, RS, Brasil). Para a obtenção da solução de EDTA 18% , foram utilizadas 250 gramas de pó de edta dissódico, misturadas a 1750 ml de água destilada, e 25 gramas de hidróxido de sódio para neutralizar o ph da solução (ph=7). A solução era trocada do frasco uma vez por semana. Após descalcificação inicial, cada peça foi dividida longitudinalmente em dois blocos, exatamente ao longo do centro do defeito cirúrgico original, usando-se os maiores eixos de cada marcação de cimento de ionômero de vidro com formato de “L” como referência. Foram realizados também cortes transversais que tangenciaram o eixo menor de ambas as marcações em “L”,

de modo que cada espécime apresentasse 10 mm de extensão no sentido longitudinal (Figura 3). Assim, foi possível a determinação precisa dos limites do defeito cirúrgico original. Após um período de descalcificação adicional, aproximadamente 60 a 70 dias, as peças foram processadas e incluídas em parafina. Cortes seriados no sentido longitudinal da peça com seis micrômetros de espessura foram realizados, iniciando a partir do centro do defeito cirúrgico original. Os cortes foram corados pelas técnicas hematoxilina e eosina (HE) e outros cortes selecionados para coloração pelo método picrossírius para a análise microscópica.

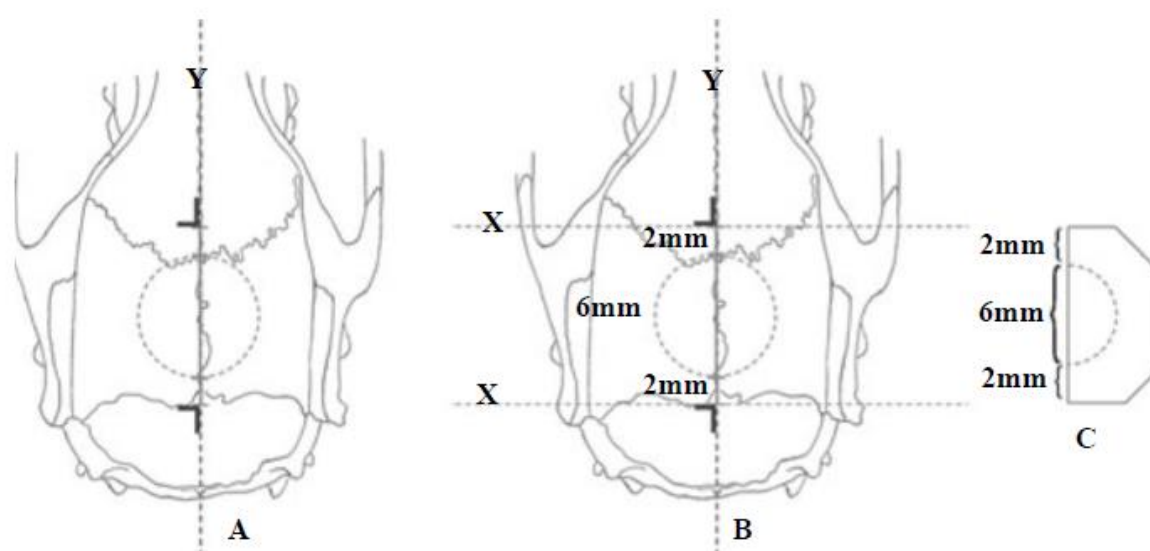


Figura 3- Processamento laboratorial padronizado da redução das peças.

Fonte: Messora et al., 2008; adaptado de Silva, 2015.

Notas: A - Corte longitudinal ao longo da linha central (Y) do defeito de tamanho crítico;
B - Cortes transversais (X); C - Dimensões do espécime a ser embebido em parafina.

Para a microscopia eletrônica de varredura, as peças foram fixadas no paraformaldeído 4% por 24 horas, e secas em temperatura ambiente. As amostras foram fixadas com fita de carbono em suporte próprio para MEV e submetidas à metalização em ouro, com um recobrimento de aproximadamente 20nm. Foi operado um feixe de elétrons de 30kV, e obteve-se fotomicrografias nos aumentos de 500 e 3000x.

4.5 ANÁLISE POR MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

Antes de iniciar o processo de descalcificação, foram selecionadas

aleatoriamente 13 amostras, fixadas em álcool 70°, divididas em grupos de tratamentos para a avaliação microtomográfica no Laboratório de Nanotecnologia do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), em Campinas, SP, Brasil.

Os grupos foram divididos da seguinte maneira:

HAPNC: carboapatita nanométrica: 8 amostras:

4 amostras – 30 dias;

4 amostras – 60 dias.

OA: osso autógeno: 5 amostras:

2 amostras – 30 dias;

3 amostras – 60 dias.

Cada amostra foi seca em temperatura ambiente por cerca de 60 minutos antes de ser levada ao microtomógrafo. O aparelho utilizado foi SkyScan – Bruker^R, Bélgica, modelo 1272 (microtomógrafo 100KV, 100µm). O software utilizado para a leitura das imagens foi CTvox para visualização e CTan para quantificação, ambos softwares de análises da Bruker, Bélgica, baixados pelo link: https://www.bruker.com/products/mr.html?gclid=Cj0KCQiAs9zSBRC5ARIsAFMtUXGCaoV2spLs7uF8maqOXNFUvUsqQWNBFFF3XZx1dA1pZDFpYSwsMUcaAqfvEALw_wcB

As análises dos espécimes por microtomografia foram realizadas de duas maneiras:

- Classificação por “score” através da avaliação do fechamento do defeito; (PANG et al., 2015).
- Avaliação estatística analisando a área de tecido mineralizado no “slice” que representa o centro do defeito criado, simulando o corte histológico, (WANG et al., 2016a).

4.5.1 Avaliação por ”score”

A avaliação foi realizada por um avaliador no esquema cego. Previamente à avaliação, uma tabela de classificação correspondente ao fechamento do defeito foi

apresentada, descrevendo os pontos a serem considerados para a classificação (PANG et al., 2015).

Guia de pontuação para formação óssea usando conjuntos de dados de tomografia microcomputadorizada:

- a) Tecido ósseo abrangendo todo defeito no seu ponto mais longo (6mm): 4;
- b) Tecido ósseo sobre parte do defeito : 3;
- c) Ponte óssea apenas nas bordas do defeito: 2;
- d) Algumas espículas ósseas dispersas no defeito : 1;
- e) Nenhuma formação óssea dentro do defeito : 0.

K.-M. Pang et al. / Biologic properties of nano-hydroxyapatite

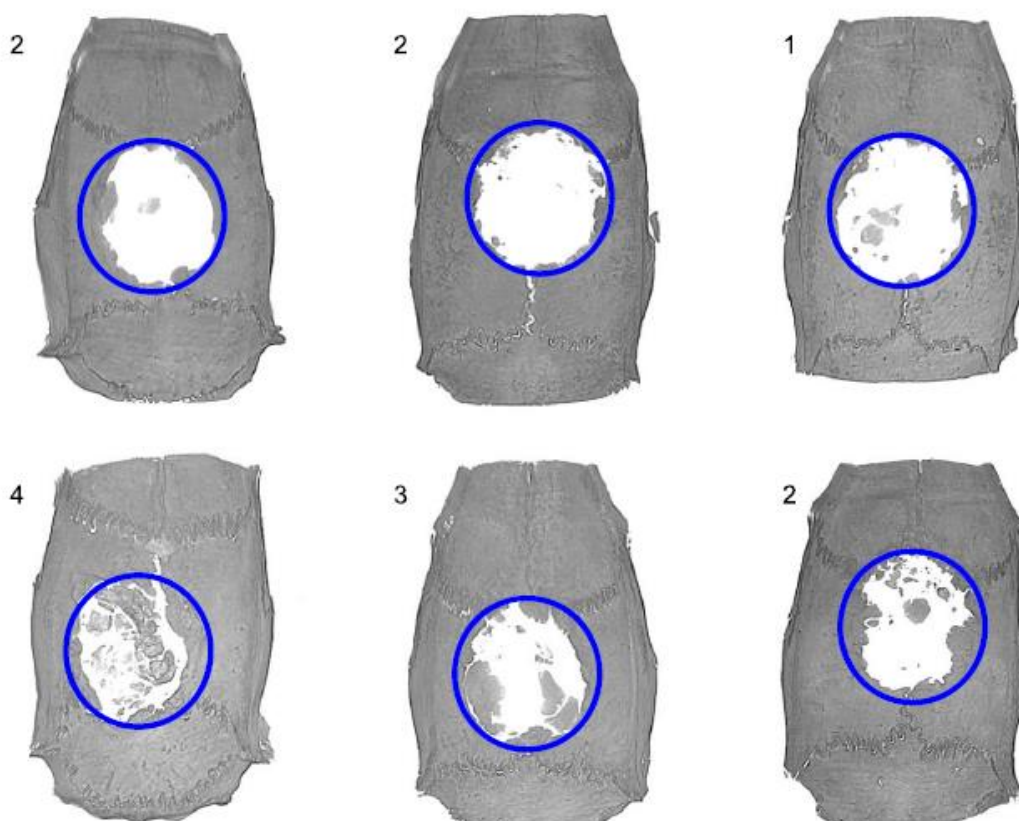


Figura 4 – Exemplo da pontuação descritiva do fechamento do defeito pela avaliação de superfície do registro microtomográfico.

Fonte: PANG et al., (2015).

4.5.2 Avaliação morfométrica e estatística

Utilizando o software CTan (BRUKER®- Bélgica), a imagem microtomográfica de cada amostra foi aberta e o corte correspondente ao centro do defeito criado foi selecionado para análise binária. Os valores de cinza foram calibrados numa escala de 90 a 255, para diferenciar tecidos mais mineralizados e tecidos menos mineralizados ou tecido mole, de acordo com a barra de escala. Em seguida, utilizando a ferramenta morfometria, selecionamos a área de interesse (ROI) correspondente a área do defeito, rente as bordas do remanescente ósseo. Sendo assim, obtemos a área total, área de tecido mineralizado e porcentagem de tecido mineralizado (FIGURA 5). Sendo registrados os valores, utilizando o *software* RStudio fizemos o teste de normalidade e análise de variância.

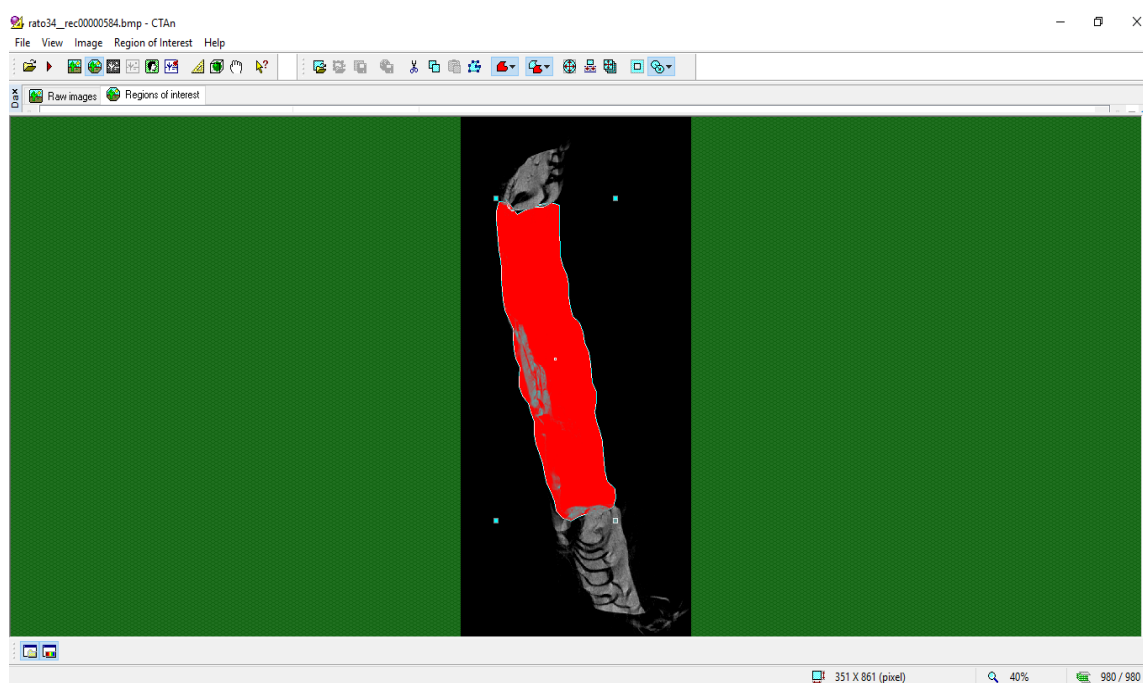


Figura 5 – Imagem do Software CTan configurando a imagem a ser analisada.

Fonte: Do autor.

4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA

As imagens dos cortes histológicos foram capturadas por meio de uma câmera digital (Axiocam MRc 1.4 Mb - Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplada à um microscópio óptico binocular (Axio Lab - Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) com um aumento original de 20X e 40X (lente objetiva N - Achromplan) e salvas em um computador.

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

análise microscópica de histomorfometria, e também, através do método de picrossírius, com a finalidade de avaliar a produção de colágeno na região do defeito. Para a análise histomorfométrica através da microscopia de luz, os seguintes parâmetros foram analisados:

- a) Qualidade e intensidade da reação inflamatória desenvolvida;
- b) Presença de fibroblastos e fibras colágenas;
- c) Presença de tecido de granulação e formação de trabéculas ósseas;
- d) Tipo e qualidade do tecido formado no interior do defeito cirúrgico.

O programa utilizado para a quantificação da área de tecido neoformado foi o *Image Pro Plus* (Image-Pro Plus; Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Buscou-se avaliar a área de tecido ósseo neoformado (AON), calculada em micrômetros quadrados e porcentagem de tecido neoformado relacionado a área total (AT) do defeito. A área de tecido neoformado é representada por uma região de intensa atividade celular, matriz osteóide e osso mineralizado com osteócitos, formado a partir da borda do defeito cirúrgico em direção ao centro. Biomateriais de ordem nanométrica não são totalmente observados na microscopia de luz, portanto suas nanopartículas não podem ser visualizadas na análise histológica convencional. Deste modo, para análise histométrica contabilizou-se apenas o tecido neoformado, as partículas de enxerto não foram incluídas na análise.

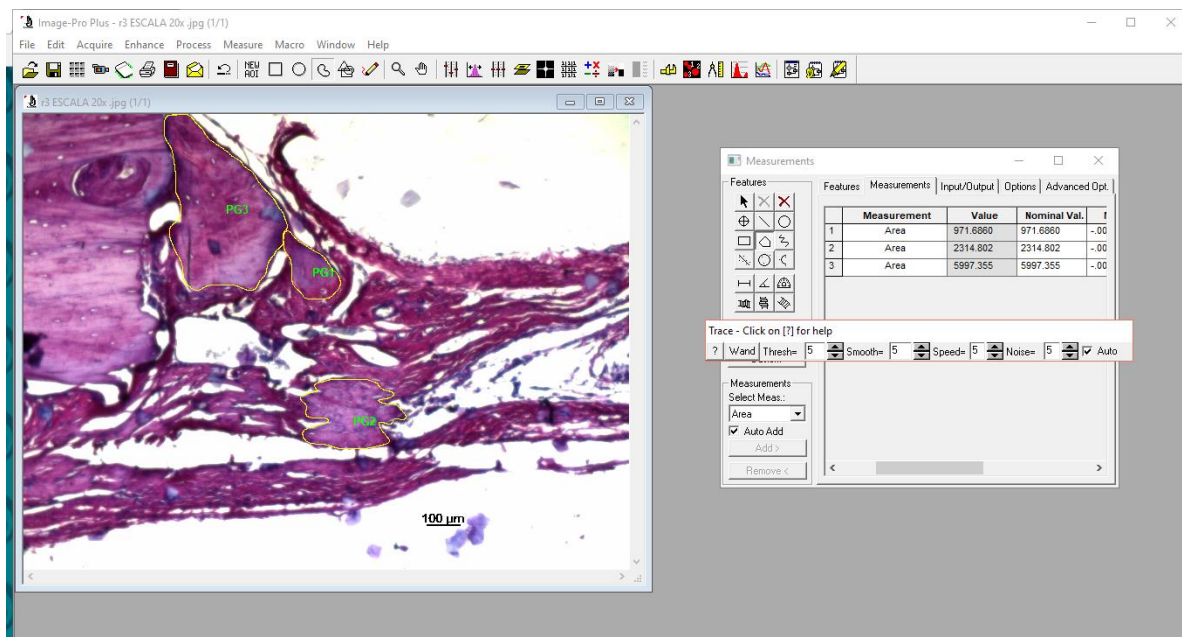


Figura 6- Imagem do software Image Pro Plus utilizado para a coleta de dados.
Fonte: Do autor.

As partículas de osso autógeno inseridas na região do defeito não foram contabilizadas, por não representarem, nestes períodos experimentais, uma região de total remodelação óssea em que o osso enxertado foi reabsorvido e substituído por um novo tecido sintetizado pelos osteoblastos.

O programa *Image Pro Plus* foi calibrado com a imagem previamente estabelecida no *software* de captura "*Axiovision Rel. 4.8*", e sua respectiva barra de escala, com a objetiva de 20x. Utilizando a ferramenta "*measurements*" a área de tecido neoformado pode ser calculada em micrômetros quadrados. Seguindo os critérios de cálculo da porcentagem de área neoformada dos trabalhos de Messora et al., (2008) e Wang et al., (2016a) as médias percentuais de AON de cada amostra foram determinadas.

Ao final da análise de determinação da área, os dados foram submetidos ao teste de normalidade pelo programa *RStudio*. Os dados apresentaram variabilidade e heterogeneidade nos grupos, sendo assim, o teste estatístico selecionado para comparar as áreas entre os grupos foi o não-paramétrico Kruskal-Wallis. Foram comparadas as áreas de tecido ósseo neoformado e valores percentuais, de acordo com o tratamento e o período experimental.

4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A análise por microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica (CEME) da Unifesp-SP, em colaboração com a professora Rita Sinigaglia Coimbra (UNIFESP).

A análise foi realizada para a verificação da morfologia dos materiais, através de amostras fixadas com fita adesiva de carbono em suporte próprio para MEV e submetidas à metalização em ouro, que consiste em recobrir as amostras com uma camada de aproximadamente 20 nm. Foi operado com um feixe de elétrons 30.0kV e obteve-se fotomicrografias das matrizes nos aumentos de 500X, 3000X.

A análise por microscopia eletrônica de varredura é uma técnica bastante utilizada na caracterização dos substitutos ósseos. Através dela pode-se observar a topografia superficial dos biomateriais, especialmente em relação ao aspecto microscópico, tamanho dos grânulos e porosidade.

5 RESULTADOS

Os resultados estão descritos em tópicos separados, de acordo com o modelo de análise e metodologia abordada.

5.1 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

Foram realizadas duas análises por microtomografia computadorizada: uma análise qualitativa por “score” e uma análise quantitativa morfométrica.

5.1.1 Avaliação microtomográfica por “score”

Este tipo de avaliação permite detectar a disposição dos biomateriais no local do defeito cirúrgico. Devido ao tamanho das partículas, o grupo osso autógeno apresentou melhor fechamento de defeito, dispondo-se ao longo das bordas até o centro do defeito, favorecendo a regeneração óssea devido às suas propriedades osteogênicas e osteoindutoras (FIGURA 7: score 3). O grupo HAPNC apresentou partículas dispersas ao longo do defeito cirúrgico, porém, no período de 60 dias, observamos uma menor quantidade de partículas presentes no centro do defeito. Pode-se relacionar este fato à sua característica nanométrica, que desencadeia reações celulares mais rapidamente que biomateriais micrométricos, portanto pode-se atribuir a uma reabsorção mais acelerada por parte das células osteoclásticas. Observa-se uma reação tecidual muito variável em relação ao mesmo grupo tratado (FIGURA 7: score 1 e 4), HAPNC 60 dias. As bordas do defeito cirúrgico apresentavam-se escavadas, o que indica haver um processo de remodelação, onde atuam-se osteoclastos e osteoblastos concomitantemente.

Nenhum grupo em nenhum período experimental foi capaz de fechar totalmente o defeito cirúrgico. Observa-se regiões com pequenas depressões nas bordas remanescentes, que representa a atividade osteoclástica, e outras regiões com picos ósseos estendendo-se das margens, sugestivo de áreas de neoformação. A permanência do nanobiomaterial HAPNC no interior do defeito crítico em ambos os períodos experimentais é importante para avaliar a sua capacidade osteocondutora, mantendo o arcabouço no meio osteogênico para o povoamento de células osteoblásticas e formação de novo osso (FIGURA 7: score 1 e 4).

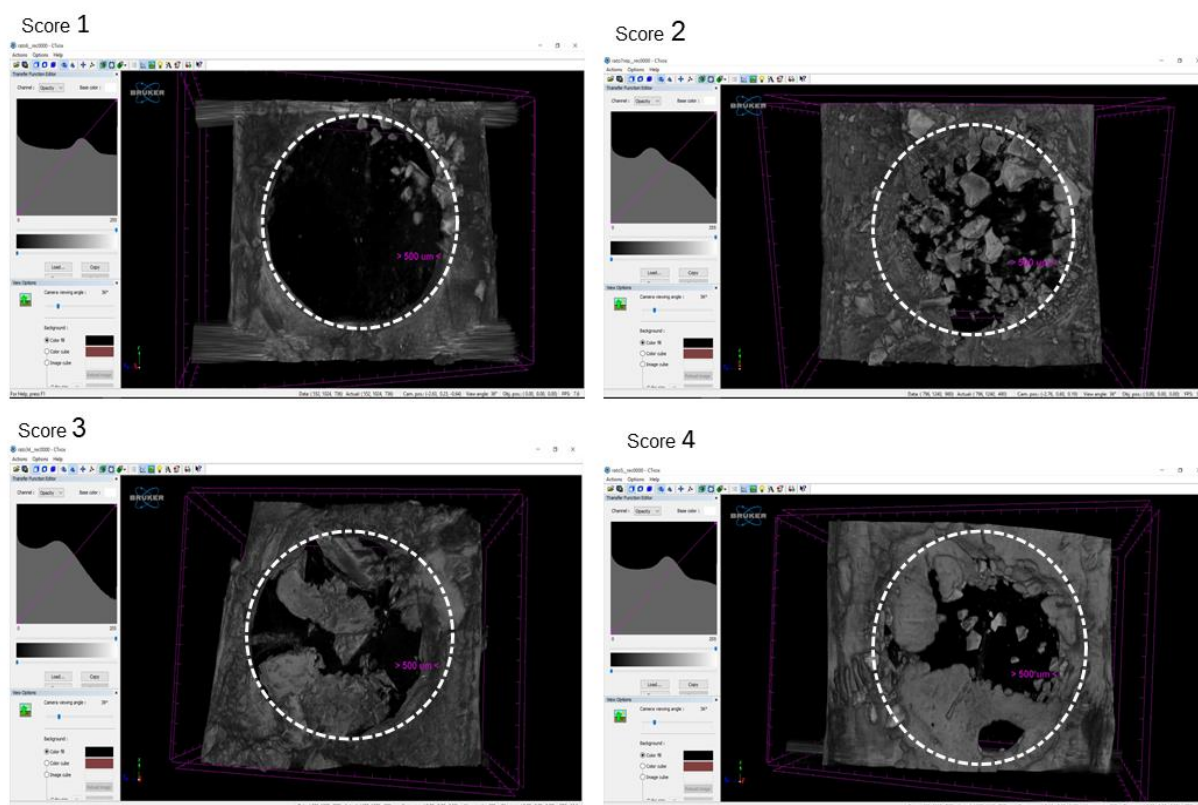


Figura 7 - Registros microtomográficos utilizados para avaliação por score.

Fonte: Do autor.

Notas: Score 1: HAPNC 60d; Score 2: HAPNC 30d; Score 3: OA 30d; Score 4: HAPNC 60d.

5.1.2 Análise morfométrica e estatística

Para a análise morfométrica utilizou-se o software CTAnalyzer (Bruker®, Bélgica), foi possível calcular a área de tecido mineralizado em pixel^2 e a média percentual de tecido mineralizado correspondente ao corte central do defeito cirúrgico, simulando o corte histológico. Os cálculos da área e média percentual foram comparados entre os grupos de tratamento e períodos experimentais.

Os valores da área de tecido mineralizado em pixel^2 não responderam positivamente ao teste de normalidade, sendo assim, o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foi aplicado.

Como apresentado na tabela 1, ao nível de significância $\alpha = 0,05$, houveram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p=0,01459$). O grupo que apresentou maior área de tecido mineralizado foi o OA no período experimental de 60 dias, seguido pelo grupo HAPNC 30 dias, OA 30 dias e HAPNC 60 dias respectivamente.

Aplicando-se o teste t ($\alpha=0,05$) pode-se dizer que OA 60 dias (11, 67pixel²) e HAPNC 30 dias (7,5 pixel²) são estatisticamente iguais, demonstrando as maiores áreas de tecido mineralizado no defeito cirúrgico. Os grupos HAPNC 30 dias (7,5 pixel²), OA 30 (4,5 pixel²) dias e HAPNC 60 dias (4,25 pixel²) podem ser considerados estatisticamente iguais (TABELA 2 e GRÁFICO 1).

Tabela 1 – Teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância comparando a área de tecido mineralizado dentro do defeito entre os grupos.

Grupo	Dias	Rank	Osso (pixel²)	Std	r	Min	Max
HAPNC	30	7.5	6982.997	2129.5908	4	5840.75	10174.25
HAPNC	60	4.25	5857.403	9514.3539	4	998.12	20128.25
OA	30	4.5	3173.250	402.6973	2	2888.50	3458.00
AO	60	11.67	35532.457	24026.1281	3	18968.25	63088.25

Fonte: Do autor.

Notas: * Rank: classificação; * Std: desvio padrão; * r: repetição; p-valor: 0.01459.

Tabela 2 -Teste T a 5% de significância para os grupos experimentais e períodos.

Grupos	Período	Moda	
AO	60	11.667	a
HAPNC	30	7.5	a b
AO	30	4.5	b
HAPNC	60	4.25	b

Fonte: Do autor.

Notas: Letras diferentes denotam diferenças estatísticas; p-valor: 0.01459.

Os valores das médias percentuais de tecido mineralizado fornecidos pelo *software* CTAnalyzer foram submetidos ao teste de normalidade e responderam positivamente ao teste. Em seguida, os dados foram submetidos ao Anova (análise da variância), segundo a tabela 3 e 4, comparando os grupos experimentais e os grupos e períodos experimentais.

Submetendo os dados ao teste de Tukey, a 5% de significância, de acordo com a tabela 5, a maior média percentual correspondeu ao grupo OA 60 dias (40,7467%), sendo este estatisticamente diferente dos demais grupos: HAPNC 30 dias (12,185%), OA 30 dias (3,205%) e HAPNC 60 dias (2,9825%).

Tabela 3 – Análise da variância (ANOVA) das médias percentuais da AON segundo os grupos experimentais.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor de f	α
Tratamento	3	2873.81	957.94	39.399	0.3767012
Resíduo	9	218.82	24.31		
Total	12	3092.64			

Fonte: Do autor.

Notas: * G.L.: graus de liberdade; * S.Q.: soma dos quadrados; * Q.M.: média dos quadrados;

Tabela 4 – Análise da variância das médias percentuais de AON segundo os períodos e os tratamentos.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>Fc
Tratamento	1	1013.19	1013.19	41.671	0.0001174
Dias	1	221.86	221.86	9.125	0.0144618
Tratamento * dias	1	1638.76	1638.76	67.401	0.0000180
Resíduo	9	218.82	24.31		
Total corrigido	12	3092.64			

Fonte: Do autor.

Notas: * G.L.: graus de liberdade; * S.Q.: soma dos quadrados; * Q.M.: média dos quadrados;

Tabela 5- Teste de Tukey a 5% de significância para médias percentuais da AON segundo os tratamentos.

Grupos	N	Médias %	Homogeneidade
OA 60d	3	40.74667	a
HAPNC 30d	4	12.185	b
OA 30d	2	3.205	b
HAPNC 60d	4	2.9825	b

Fonte: Do autor.

Notas: Letras diferentes denotam diferenças estatísticas. OA : osso autógeno; HAPNC : carboapatita nanométrica.

Desdobrando os grupos de tratamentos em cada período experimental, o teste Anova foi aplicado (TABELA 6). Sendo assim, constatou-se que no período experimental de 30 dias, de acordo com o teste F, as médias percentuais de HAPNC (12,185%) e OA (3,205%) foram consideradas estatisticamente diferentes (TABELA 7). No período experimental de 60 dias, aplicando-se o teste de Tukey a 5% de significância, os grupos OA (40,7467%) e HAPNC (2,9825%) apresentaram diferenças estatisticamente significantes (TABELA 8).

Tabela 6 – Análise da variância desdobrando o fator tratamento dentro de cada nível de dias.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr.Fc
Dias	1	221.8613	221.86126	9.1249	0.000145
Tratamento: 30 dias	1	107.5205	107.52053	4.4222	0.0648
Tratamento: 60 dias	1	2444.7982	2444.78820	100.5519	0
Resíduo	9	218.8241	24.31379		
Total corrigido	12	3092.6371	257.71976		

Fonte: Do autor.

Notas: * G.L.: graus de liberdade; * S.Q.: soma dos quadrados; * Q.M.: média dos quadrados;

Tabela 7 – Teste de Tukey comparando os tratamentos dentro do período de 30 dias.

Tratamento	Médias	
HAPNC	12.185	a
OA	3.205	b

Fonte: Do autor.

Notas: De acordo com o Teste F, as médias deste fator são estatisticamente diferentes.

Tabela 8 – Teste de Tukey comparando os tratamentos dentro do período de 60 dias.

Tratamento	Médias	
OA	40.74667	a
HAPNC	2.9825	b

Fonte: Do autor.

Notas: Letras diferentes denotam diferenças estatísticas. De acordo com Teste de Tukey, as médias deste fator são estatisticamente diferentes.

Desdobrando os períodos experimentais dentro de cada tratamento, a análise da variância foi calculada, como na tabela 9. Após submeter os valores ao Anova, o teste de Tukey a 5% de significância foi aplicado. No grupo tratado com osso autógeno, o período experimental de 60 dias (40,7467%) obteve uma média percentual superior ao período de 30 dias (3.205%), sendo estatisticamente diferentes (TABELA 10). O mesmo teste aplicado ao grupo tratado com HAPNC demonstrou que o período experimental de 30 dias (12,185%) apresentou uma média percentual superior ao período de 60 dias (2,9825%), sendo estatisticamente

diferentes , $p < 0,05$, (TABELA 11).

Tabela 9 – Análise da variância dos períodos experimentais dentro de cada grupo de tratamento.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr.Fc
Tratamento	1	1013.1889	1013.18889	41.6714	1e-04
Tratamento: dias OA	1	1691.2521	1691.25208	69.5594	0
Tratamento: dias HAPNC	1	169.3720	169.37201	6.9661	0.0269
Resíduo	9	218.8241	24.31379		
Total corrigido	12	3092.6371	257.71976		

Fonte: Do autor.

Notas: * G.L.: graus de liberdade; * S.Q.: soma dos quadrados; * Q.M.: média dos quadrados;

Tabela 10 – Teste de Tukey a 5% de significância para as médias percentuais de tecido mineralizado segundo os períodos experimentais do grupo OA.

Grupos	Período	Médias	
OA	60	40.74667	a
AO	30	3.205	b

Fonte: Do autor.

Notas: Letras diferentes denotam diferenças estatísticas.

Tabela 11 – Teste de Tukey a 5% de significância para as médias percentuais de tecido mineralizado segundo os períodos experimentais do grupo HAPNC.

Grupos	Período	Médias	
HAPNC	30	12.185	a
HAPNC	60	2.9825	b

Fonte: Do autor.

Notas: Letras diferentes denotam diferenças estatísticas.

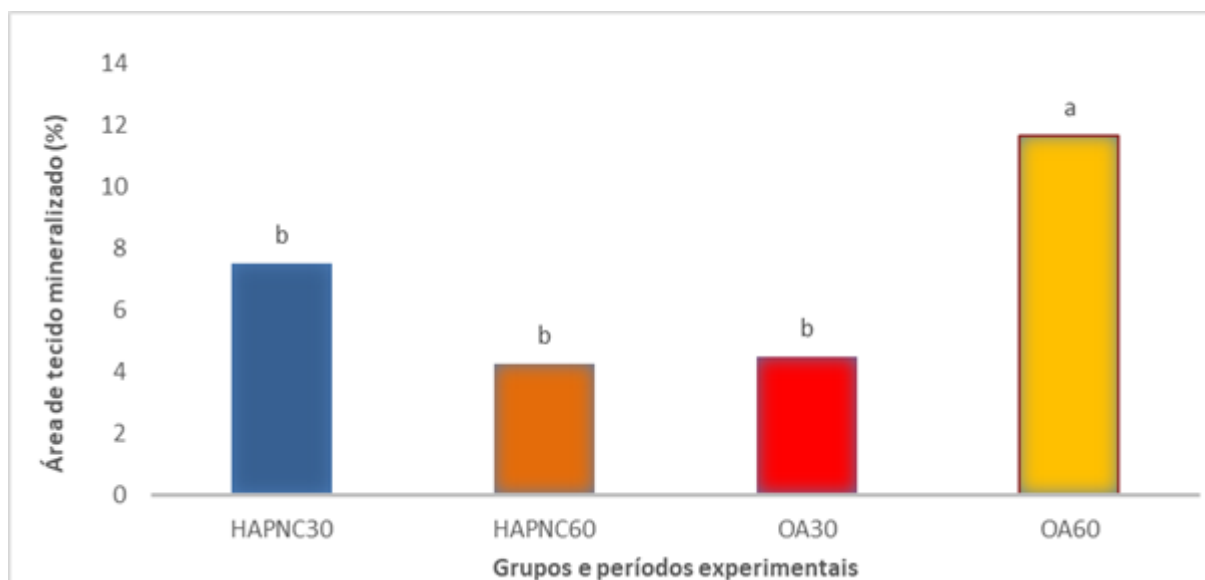


Gráfico 1 – Gráfico de colunas representando as médias percentuais de tecido mineralizado no centro do defeito cirúrgico, segundo os grupos e períodos experimentais pela análise de micro-CT.

Fonte: Do autor.

Notas: Letras diferentes denotam diferenças estatísticas.

5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA

Duas análises foram atribuídas à histologia, uma análise qualitativa descritiva e uma análise quantitativa através da histomorfometria.

5.2.1 Análise histológica qualitativa

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

5.2.1.1 Grupo Coágulo (COA):

Nos defeitos críticos preenchidos apenas com o coágulo não observamos o fechamento total do defeito. Houve uma neoformação óssea sutil nas margens do defeito, com características de tecido ósseo imaturo, acompanhando as bordas do osso remanescente, no período experimental de 30 dias.

Fibras colágenas e fibroblastos foram observados ao longo do defeito, caracterizando tecido conjuntivo frouxo. Um discreto infiltrado inflamatório também foi observado em alguns pontos do defeito (FIGURA 8, FIGURA 14: A e B, e

FIGURA 16 A).

Aos 60 dias, foi observada uma discreta neoformação óssea restrita às margens do defeito, seguindo um formato de rampa nas bordas do osso remanescente. No centro do defeito cirúrgico, observou-se uma maior quantidade de fibras colágenas e menor quantidade de fibroblastos, quando comparados com o período experimental de 30 dias (FIGURA 9, FIGURA 15: A e B, FIGURA 16 B).

A espessura do tecido neoformado de ambos os períodos do grupo coágulo apresentou-se menor que da calvária original (FIGURAS 8 e 9).

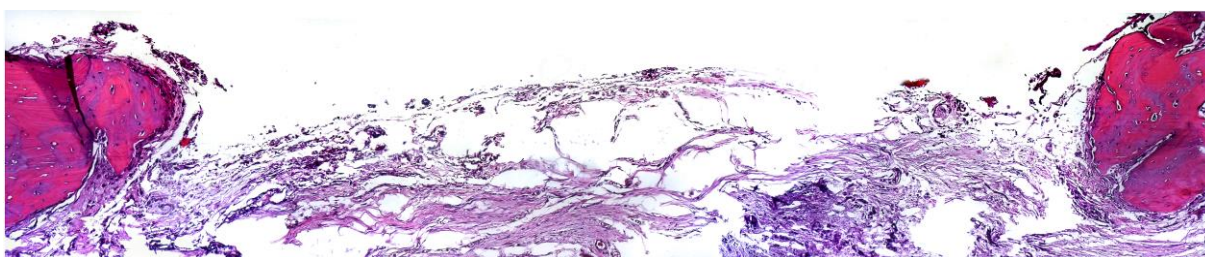


Figura 8 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo COA no período experimental de 30 dias.

Fonte: Do autor.

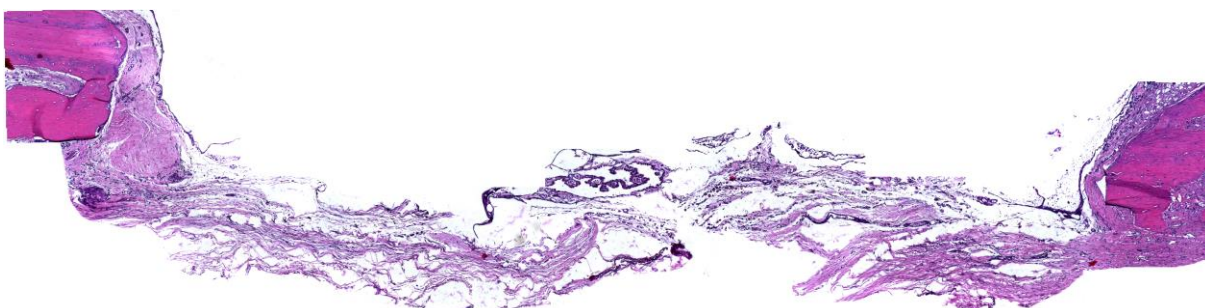


Figura 9 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo COA no período experimental de 60 dias.

Fonte: Do autor.

5.2.1.2 Grupo Carboapatita Nanométrica (HAPNC):

Houve neoformação óssea principalmente nas margens do defeito, acompanhando as bordas do osso remanescente, seguindo o padrão de neoformação óssea centrípeta. No período experimental de 30 dias, o tecido ósseo neoformado também foi observado pontualmente ao longo do defeito, com a característica de matriz osteóide, bastante celularizada e pouco organizada, com coloração rosa escuro, formada aos arredores do local onde se concentrou o

nanobiomaterial. Na região central do defeito constatou-se a presença de fibras colágenas e fibroblastos. O tecido neoformado não foi capaz de fechar o defeito crítico de 6mm, mas a HAPNC mostrou sua capacidade osteocondutora para guiar a neoformação (FIGURA 10, FIGURA 14: C e D, FIGURA 16 C).

No período de 60 dias, foi observada neoformação óssea seguindo o padrão de rampa, partindo das bordas do osso remanescente em direção ao centro do defeito, com algumas estrias basófilas e presença de osteócitos. Pontualmente, espalhadas ao longo do defeito, observou-se áreas de tecido neoformado, permeadas por osteoblastos e áreas com a presença de fibras colágenas e fibroblastos. Nas regiões onde se caracteriza a presença de HAPNC também foi observada a presença de osteoclastos, indicando o processo de reabsorção do nanobiomaterial. Fibras colágenas dispostas de maneira organizada foram observadas no centro do defeito (FIGURA 11, FIGURA 15: C e D, FIGURA 16 D).

A espessura do tecido neoformado de ambos os períodos experimentais do grupo HAPNC aproximou-se da espessura original da calvária, mas ainda permaneceu inferior à esta.

Nenhuma das espécimes deste grupo, tanto com 30 dias, quanto com 60 dias, apresentou o fechamento total do defeito criado (FIGURAS 10 e 11).

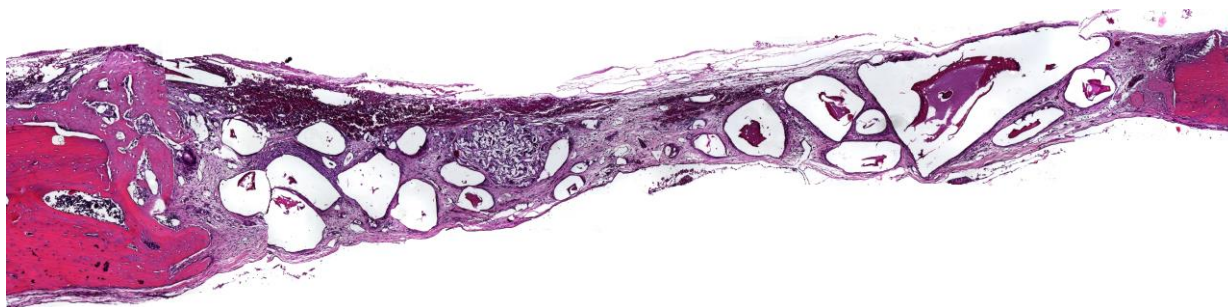


Figura 10 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo HAPNC no período experimental de 30 dias.

Fonte: Do autor.

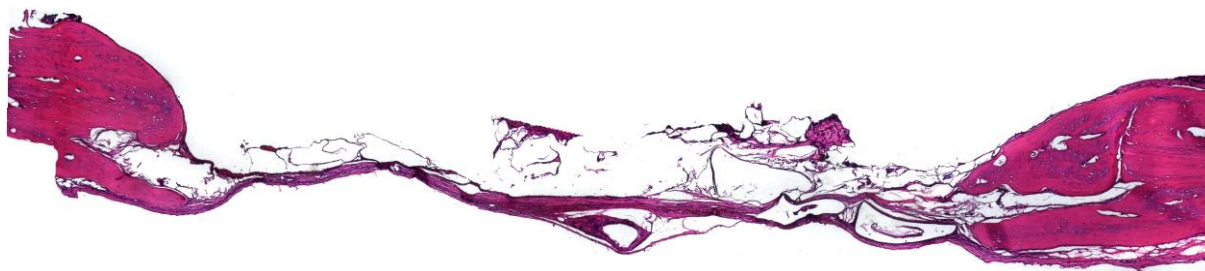


Figura 11 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo HAPNC no período experimental de 60 dias.

Fonte: Do autor.

5.2.1.3 Grupo Osso Autógeno (OA):

Por toda a região do defeito foi observada a presença de partículas do osso autógeno triturado. No período experimental de 30 dias, foi observada uma neoformação óssea significativa nas margens do defeito, com a presença de osteoblastos e osteócitos. As áreas de tecido neoformado correspondentes a um início da formação da matriz osteóide, concentraram-se principalmente entre as partículas do osso triturado, interconectando-as, correspondendo assim a uma área de intensa atividade celular no processo de remodelação óssea. Ao redor das partículas do enxerto autógeno observa-se uma grande presença de células osteoblásticas, sugerindo o processo de osseointegração do osso enxertado (FIGURA 12, FIGURA 14: E e F, FIGURA 16 E).

No período experimental de 60 dias observou-se uma área de neoformação óssea já com tecido ósseo mais maduro, com a presença de lamelas e grande quantidade de osteócitos organizados na matriz óssea. A área de tecido ósseo neoformado apresenta-se consideravelmente mais organizada, com intensa atividade osteoblástica, presença de osteoclastos e pouco tecido conjuntivo fibroso presente no centro do defeito. Uma vez que este grupo de enxerto é o único que possui células osteogênicas associadas à porção mineralizada, a presença de tecido neoformado no centro do defeito é consideravelmente maior, denotando a atividade osteoindutora do enxerto autógeno (FIGURA 13, FIGURA 15: E e F, FIGURA 16 F).

Os espécimes de ambos os períodos experimentais deste grupo apresentaram o fechamento parcial do defeito, que apresentou-se microscopicamente superior aos demais grupos devido à disposição de suas partículas ao longo do defeito (FIGURA 12 e 13).

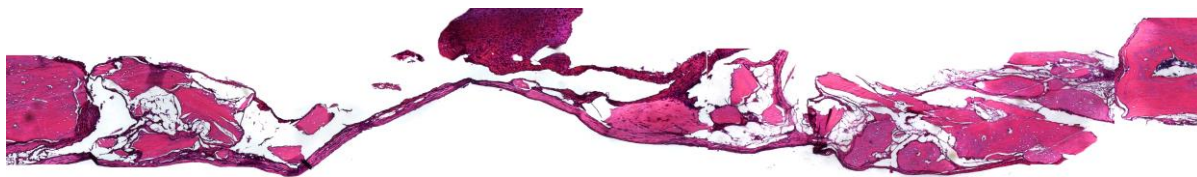


Figura 12 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo OA no período experimental de 30 dias.

Fonte: Do autor.

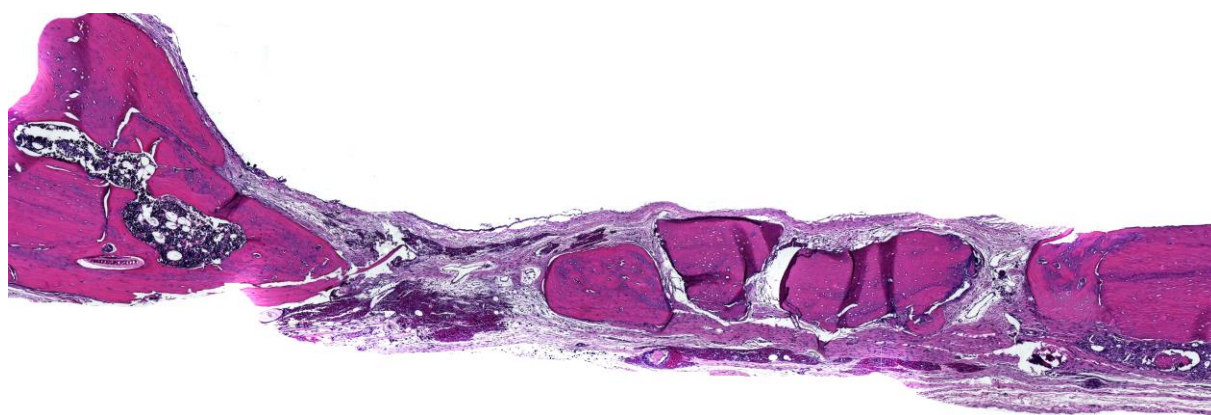


Figura 13 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo OA no período experimental de 60 dias.

Fonte: Do autor.

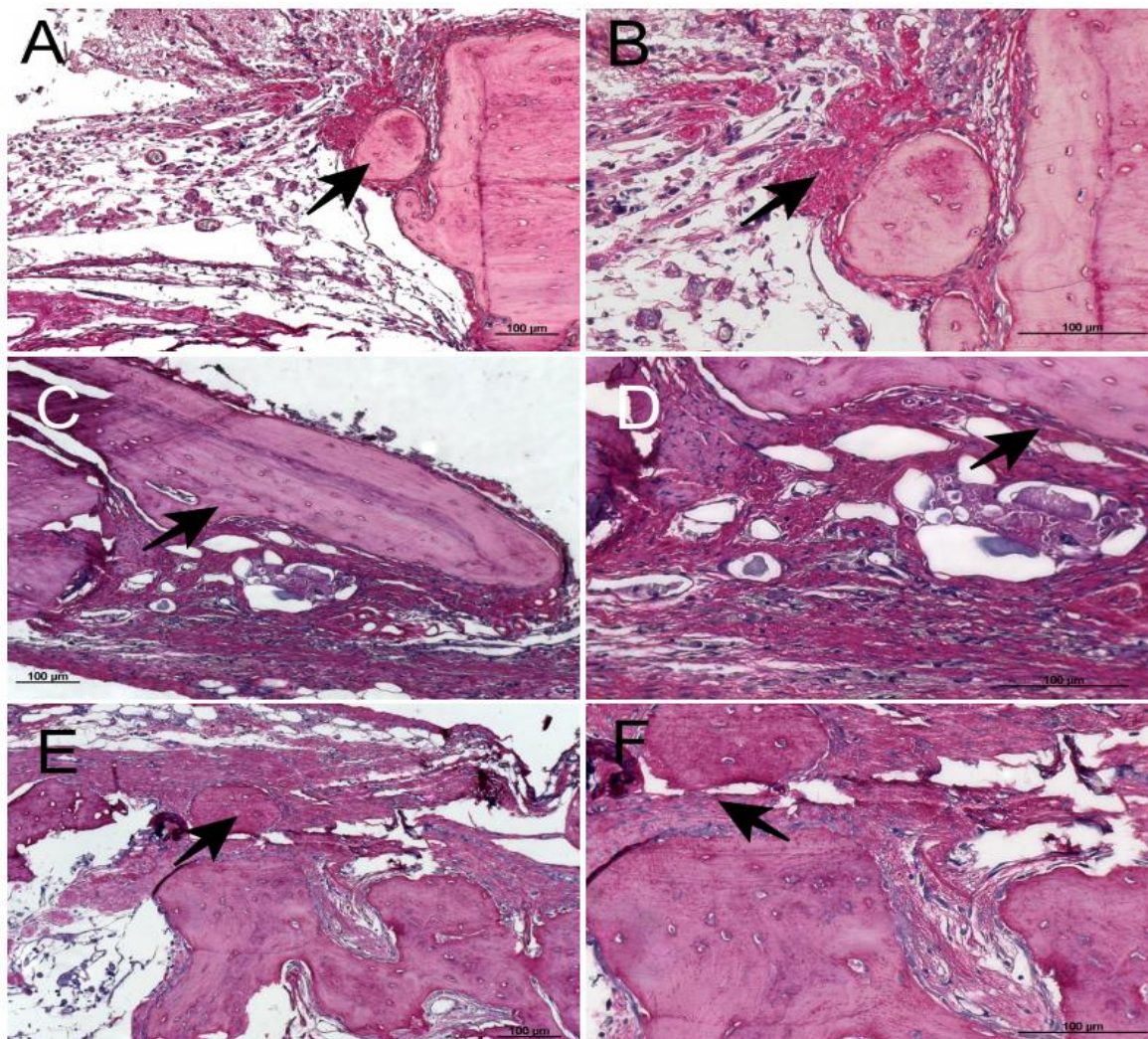


Figura 14 – Fotomicrografia dos grupos de tratamento no período de 30 dias (Picosírius).
Fonte: Do autor.

Notas: A e B representam o grupo COA; C e D representam o grupo HAPNC; E e F representam o grupo OA. As setas em A, C e E indicam o tecido ósseo neoformado nas margens do defeito (objetiva 20x) ; as setas em B, D e F indicam a área de neoformação óssea com osteoblastos e fibras colágenas (objetiva 40x). Em F encontra-se tecido ósseo neoformado interconectando as micropartículas de osso autógeno.

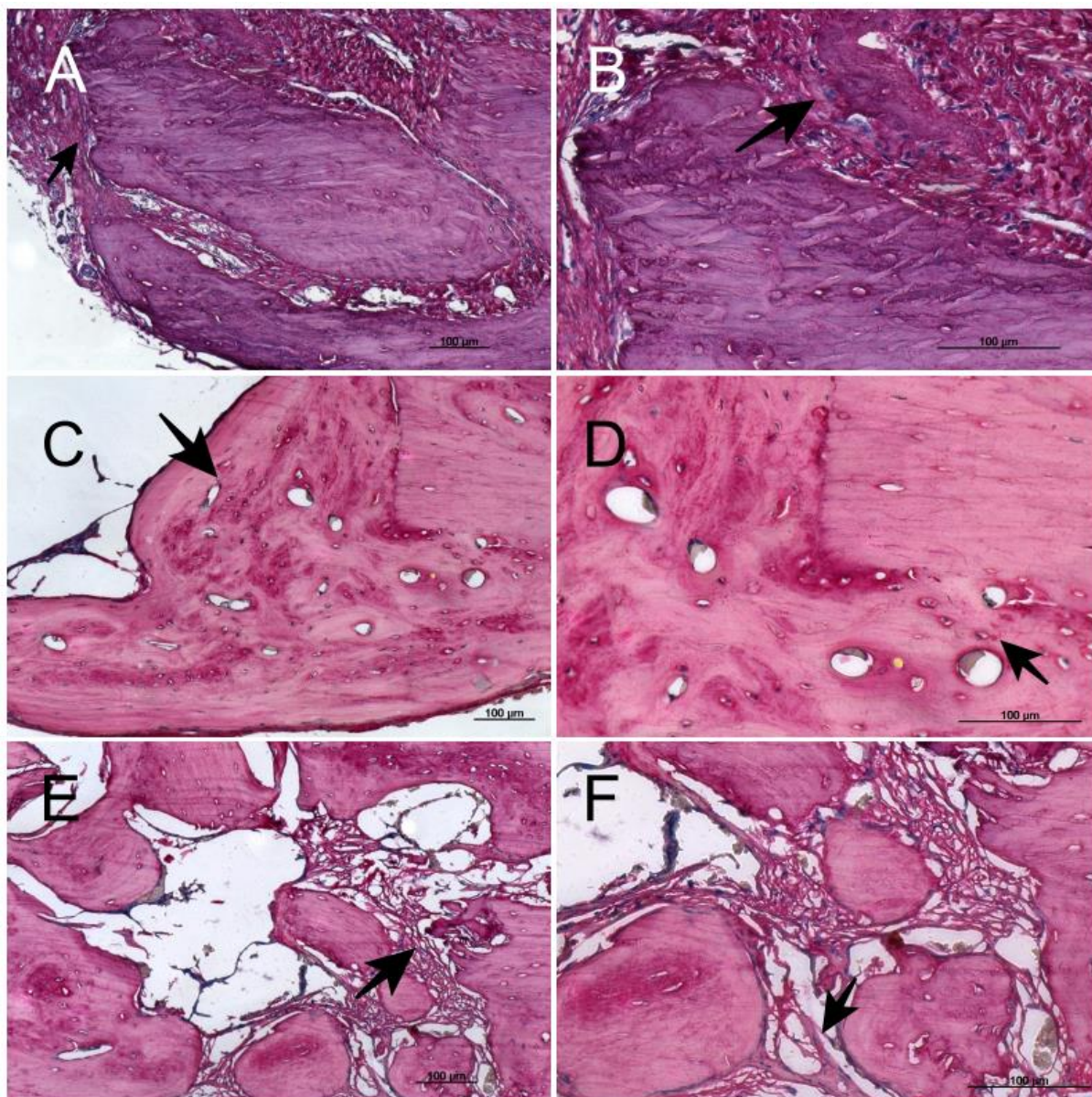


Figura 15 – Fotomicrografia dos grupos de tratamento no período de 60 dias (Picosírius).
Fonte: Do autor.

Notas: A e B representam o grupo COA; C e D representam o grupo HAPNC; E e F representam o grupo OA. As setas em A, C e E indicam o tecido ósseo neoformado nas margens do defeito crítico (objetiva 20x). As setas em B, D e F indicam os pontos de neoformação com fibras colágenas (B), osteócitos (D), e osteoblastos e matriz óssea interconectando as micropartículas do enxerto autógeno (F); objetiva 40x.

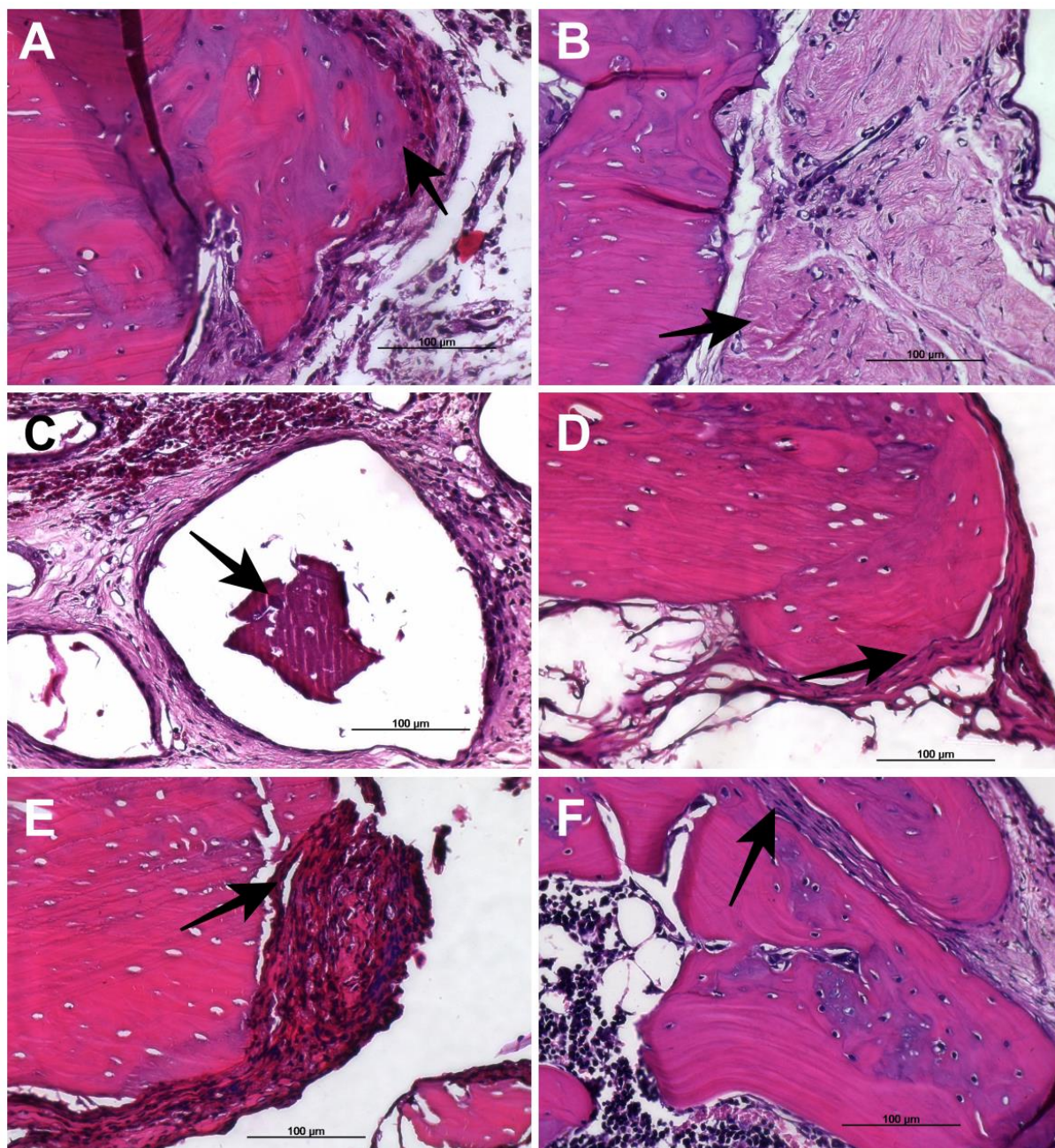


Figura 16- Fotomicrografia dos grupos de tratamento e períodos experimentais (HE).

Fonte: Do autor.

Notas: A e B: correspondem ao grupo COA 30 e 60 dias, respectivamente; C e D: correspondem ao grupo HAPNC 30 e 60 dias, respectivamente; E e F: correspondem ao grupo OA 30 e 60 dias, respectivamente. As setas indicam a região de neoformação óssea em cada grupo e período experimental (objetiva 40x).

5.2.2 Análise histomorfométrica e estatística

A histomorfometria foi realizada seguindo os critérios de Messoria et al., (2008). Os cálculos das áreas de tecido ósseo neoformado e área total do defeito foram feitos pelo *software* Image Pro Plus.

O valor absoluto da área em micrômetros quadrados (μm^2) e a percentagem da área de osso neoformado (AON) foram comparados entre os grupos e os períodos experimentais. Para a seleção da área de osso neoformado, as partículas de enxerto autógeno e áreas sugestivas da presença de nanopartículas da HAPNC não foram contabilizadas, devido à característica nanométrica do biomaterial testado, que não pode ser visualizado na microscopia de luz, nenhum resquício de material de enxerto foi contabilizado. Apenas as áreas representativas de neoformação óssea (atividade osteoblástica, osteócitos, matriz osteóide, lamelas, vasos sanguíneos, fibras colágenas organizadas) foram selecionadas para a mensuração.

Após a coleta de dados, o programa RStudio foi utilizado para os cálculos estatísticos. Os valores de área de tecido e neoformado e percentagem de AON foram submetidos ao teste de normalidade. Ambos apresentaram grande variância entre os dados, portanto o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foi selecionado.

Como apresentado nas tabelas 12 e 13, comparando as áreas de AON e a percentagem de AON entre os grupos e períodos experimentais, o grupo HAPNC 30 dias apresentou melhor classificação referente à neoformação óssea encontrada, seguido dos grupos HAPNC 60 dias, OA 60 dias, OA 30 dias, COA 60 dias e COA 30 dias, respectivamente (GRÁFICO 2 e 3). O resultado foi estatisticamente significativo ($p=0,01808$).

Tabela 12 – Teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância comparando as áreas de tecido neoformado entre os grupos e períodos experimentais.

Grupo	Dias	Rank	Área (μm^2)	Std	r	Min	Max
COA	30	3.750	4266.86	1753.984	4	2071.22	6358.69
COA	60	13.500	26516.09	39903.940	4	4572.06	86327.28
HAPNC	30	27.750	83708.88	62173.213	8	5817.46	163532.90
HAPNC	60	23.750	57565.39	54817.308	8	3034.98	161799.00
OA	30	19.750	24612.77	12656.343	8	11372.75	43433.38
AO	60	22.625	30792.45	16207.851	8	11956.18	58753.43

Fonte: Do autor.

Notas: * Rank: classificação; * Std: desvio padrão; * r: repetição; *p-valor: 0.01808.

Tabela 13 – Teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância comparando as percentagens de tecido neoformado entre os grupos e períodos experimentais.

Grupo	Dias	Rank	% AON	Std	r	Min	Max
COA	30	3.750	1.0612	0.4362	4	0.5151	1.5814
COA	60	13.500	6.5946	9.9241	4	1.1371	21.4696
HAPNC	30	27.750	20.8184	15.4624	8	1.4468	40.6706
HAPNC	60	23.750	14.3165	13.6330	8	0.7548	40.2394
OA	30	19.750	6.1212	3.1476	8	2.8284	10.8019
AO	60	22.625	7.6580	4.0309	8	2.9735	14.6120

Fonte: Do autor.

Notas: * Rank: classificação; * Std: desvio padrão; * r: repetição; p-valor: 0.01808.

Aplicando o Teste T em ambos os dados da análise, o grupo HAPNC 30 dias apresentou o maior valor entre os grupos, sendo considerado estatisticamente semelhante a HAPNC 60 dias, OA 60 dias e OA 30 dias.

O grupo COA 60 dias apresentou-se estatisticamente semelhante aos grupos HAPNC 60 dias, OA 60 dias e OA 30 dias. O grupo que apresentou menor valor relacionado a neoformação óssea foi o COA 30 dias, sendo estatisticamente diferente dos demais grupos (TABELA 14).

Tabela 14 – Teste t a 5% de significância para os grupos e períodos experimentais.

Grupo	Período	Moda	
HAPNC	30	27.750	a
HAPNC	60	23.750	a b
OA	60	22.625	a b
AO	30	19.750	a b
COA	60	13.500	b c
COA	30	3.750	c

Fonte: Do autor.

Notas: Letras diferentes denotam diferenças estatísticas.

Analisando a área de tecido ósseo neoformado (μm^2) e a percentagem de AON comparadas apenas entre os grupos de tratamento, tabelas 15 e 16 e gráfico 2, o grupo HAPNC apresentou melhores resultados comparado aos grupos OA e COA ($p=0,00312485$). Aplicando o Teste T a 5% de significância, podemos concluir que os grupos HAPNC e AO são estatisticamente iguais, e o grupo COA é estatisticamente diferente dos demais (TABELA 17).

Tabela 15 – Teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância comparando a AON em μm^2 entre os grupos.

Grupo	Rank	Área μm^2	Std	r	Min	Max
AO	21.1875	27702.61	14405.78	16	11372.75	58753.43
COA	8.6250	15391.48	28725.94	8	2971.22	86327.28
HAPNC	25.7500	70637.14	58210.56	16	3034.98	163532.90

Fonte: Do autor.

Notas: * Rank: classificação; * Std: desvio padrão; * r: repetição; *p-valor: 0.00312485.

Tabela 16 – Teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância comparando a percentagem AON entre os grupos.

Grupo	Rank	% AON	Std	r	Min	Max
AO	21.1875	6.8896	3.5827	16	2.8284	14.6120
COA	8.6250	3.8278	7.1441	8	0.5151	214696
HAPNC	25.7500	17.5674	14.4769	16	0.7548	40.6706

Fonte: Do autor.

Notas: * Rank: classificação; * Std: desvio padrão; * r: repetição; * p-valor: 0.00312485.

Tabela 17 – Teste de T a 5% de significância para os grupos experimentais.

Grupo	Moda	
HAPNC	25.7500	a
OA	21.1875	a
COA	8.6250	b

Fonte: Do autor.

Notas: Letras diferentes denotam diferenças estatísticas.

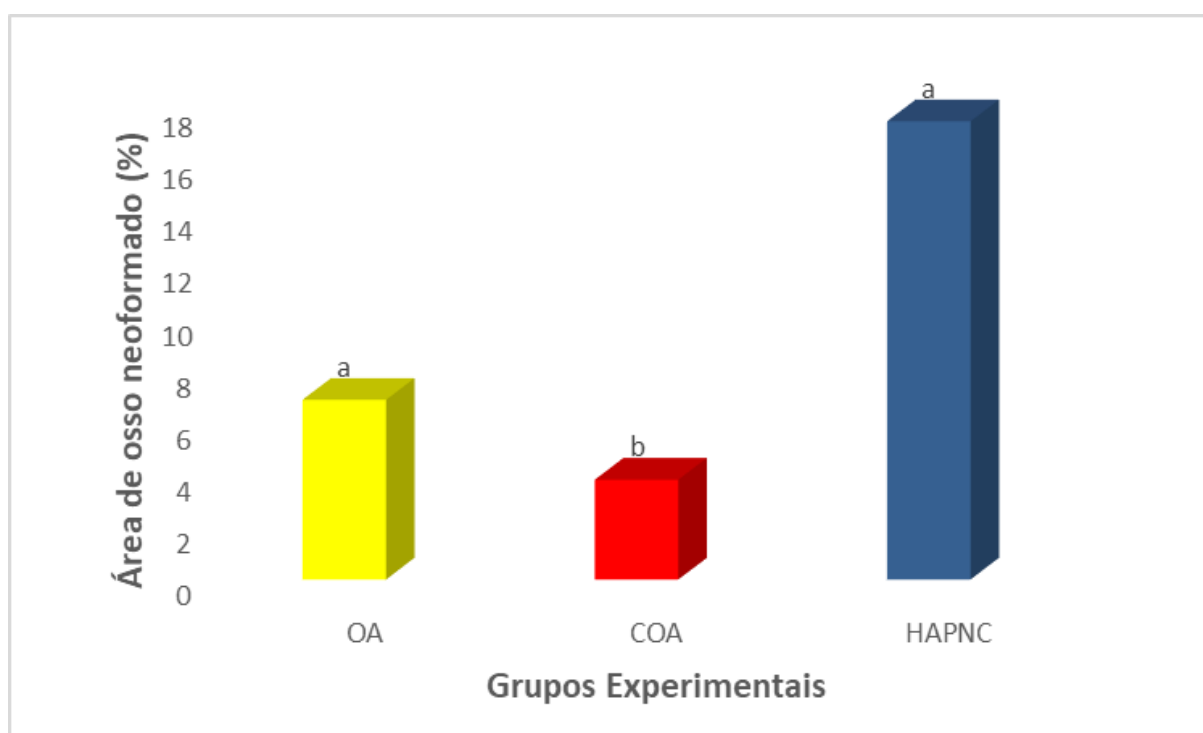


Gráfico 2 – Gráfico de colunas representando a porcentagem de área de osso neoformada segundo os grupos experimentais.

Fonte: Do autor.

Notas: Letras diferentes denotam diferenças estatísticas.

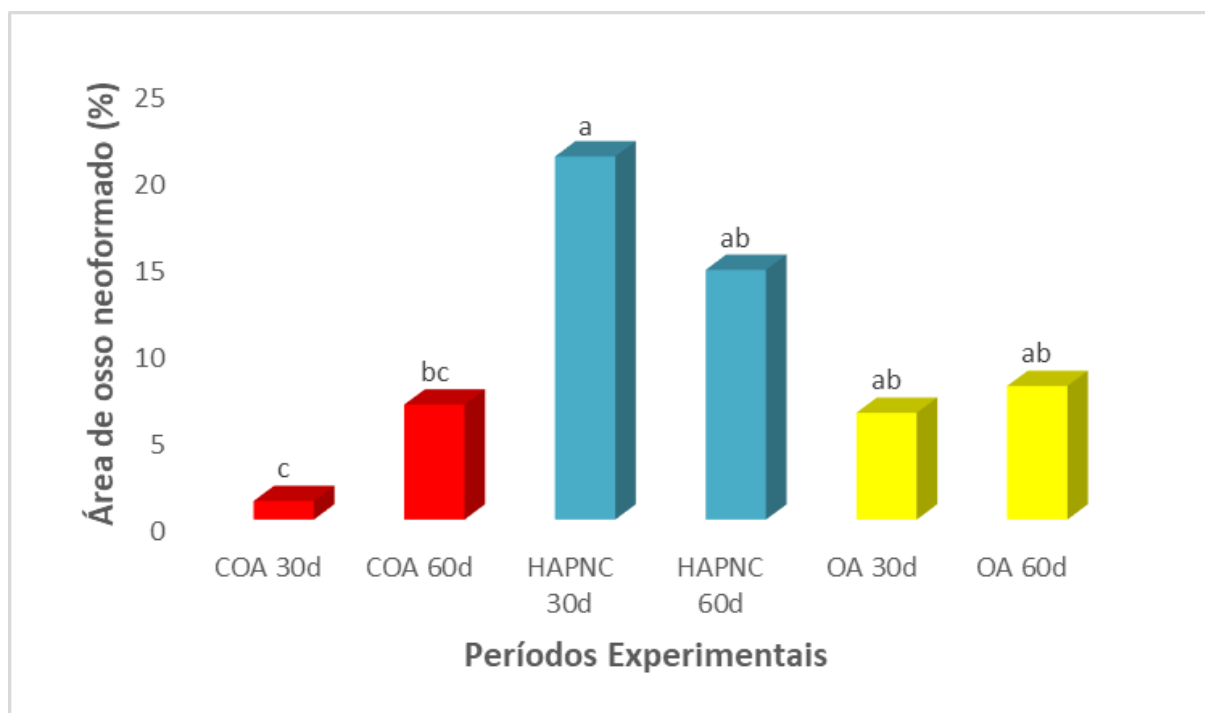


Gráfico 3 – Gráfico de colunas representando a percentagem da área de osso neoformado segundo os períodos experimentais.

Fonte: Do autor.

Notas: Letras diferentes denotam diferenças estatísticas.

5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Os resultados estruturais da superfície e da topografia das nanopartículas foram obtidos a partir da microscopia eletrônica de varredura, a fim de se analisar a morfologia do biomaterial, ilustrados nas figuras 17, 18 e 19, observados os grupos: HAPNC 30 dias (Figuras 17 e 18) e OA 30 dias (Figura 19).

Pode-se observar a presença de inúmeras partículas minerais em íntimo contato com a borda óssea remanescente (A, B, C) e também as partículas do biomaterial no centro do defeito ósseo (D), demonstrando que mesmo sem a neoformação óssea no centro do defeito, o biomaterial mantém o arcabouço para guiar a neoformação. O biomaterial apresenta superfície irregular com poros que favorecerão o repovoamento celular.

No período experimental de 60 dias, observou-se a presença de rede de fibrina partindo da borda óssea remanescente, no grupo HAPNC (Figura 20, B).

As micropartículas de osso autógeno permanecem em íntimo contato com o osso remanescente (Figura 20, D), garantindo o arcabouço necessário para a neoformação óssea.

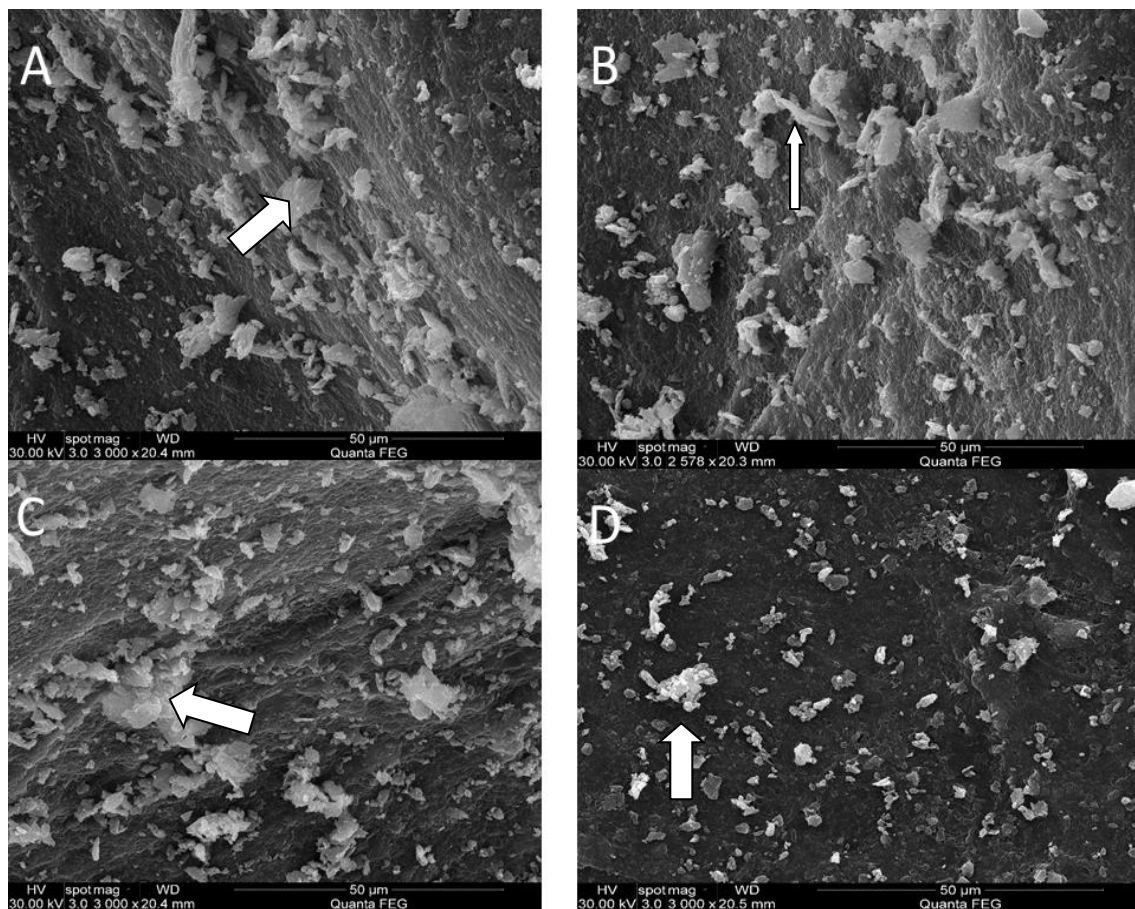


Figura 17 – Fotomicrografia de MEV da carboapatita nanométrica , grupo 30 dias.
Fonte: Do autor.

Notas: A e C: As setas indicam o biomaterial em íntimo contato com a estrutura óssea remanescente na borda do defeito crítico. B :nota-se a presença de fibras colágenas (seta) .D: Presença do biomaterial no centro do defeito ósseo. Nota-se a presença das partículas do biomaterial (seta) em meio a uma matriz orgânica.

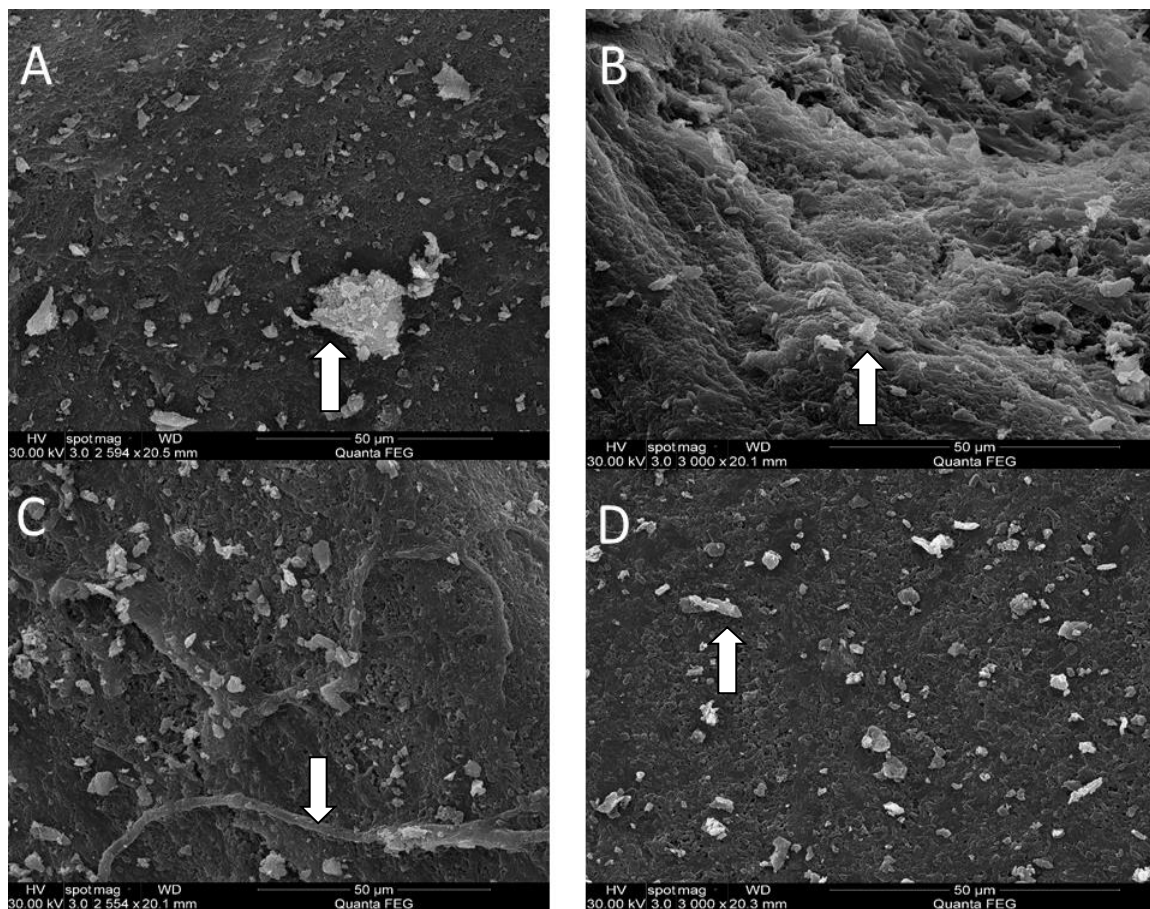


Figura 18- Fotomicrografia de MEV da carboapatita nanométrica, grupo 30 dias.

Fonte: Do autor.

Notas: A: Partícula de HAPNC em íntimo contato com a estrutura óssea (seta); B: Tamanho dos nanorods de HAPNC comparados à porosidade óssea (seta); C: Fibra colágena e partículas de HAPNC (seta); D: HAPNC no centro do defeito, mantendo a arquitetura para guiar a neoformação óssea (seta).

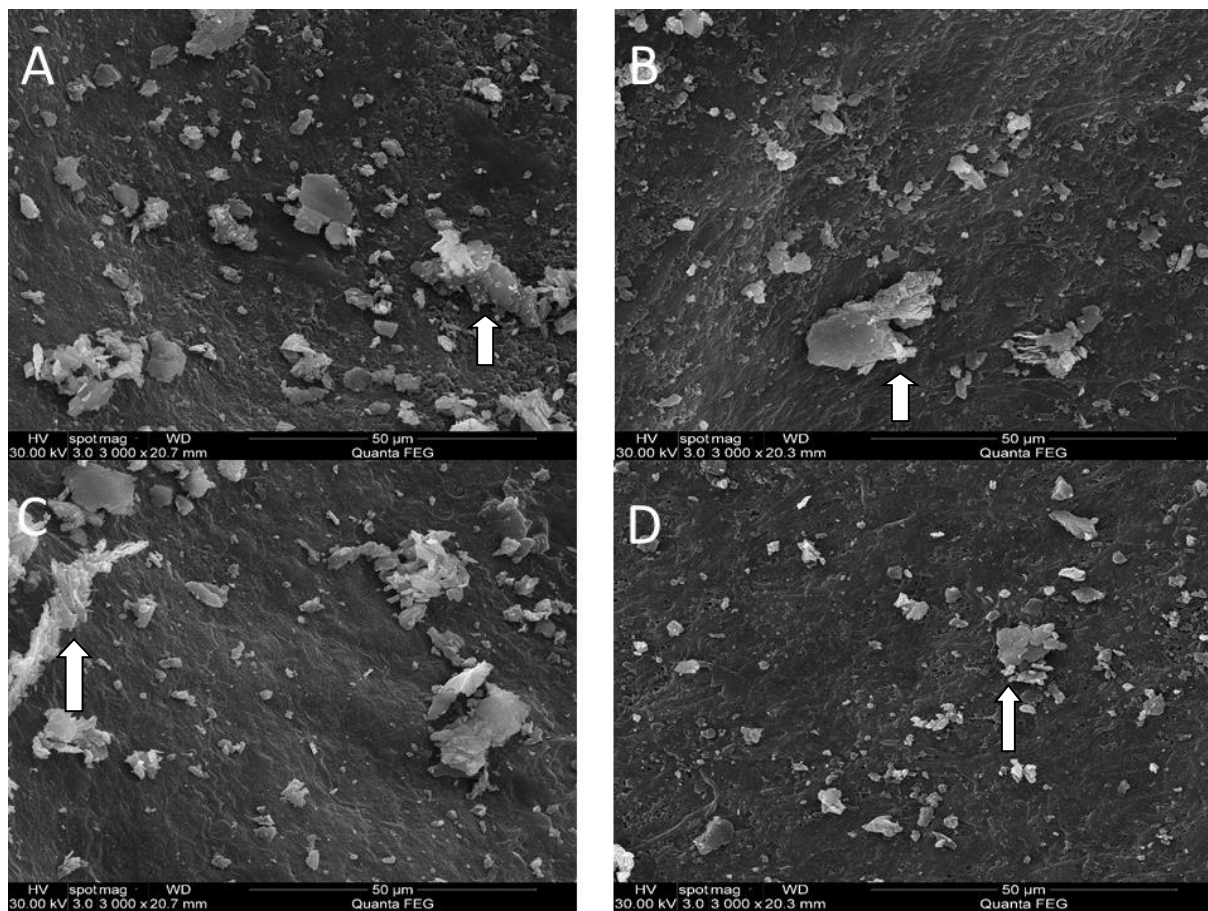


Figura 19- Fotomicrografia de MEV do osso autógeno particulado utilizado para preencher o defeito crítico .

Fonte: Do autor.

Notas: A, B : partículas de osso autógeno em contato com a superfície óssea remanescente (seta). C: nota-se a presença de colágeno(seta). D: partículas de osso autógeno no centro do defeito crítico (seta).

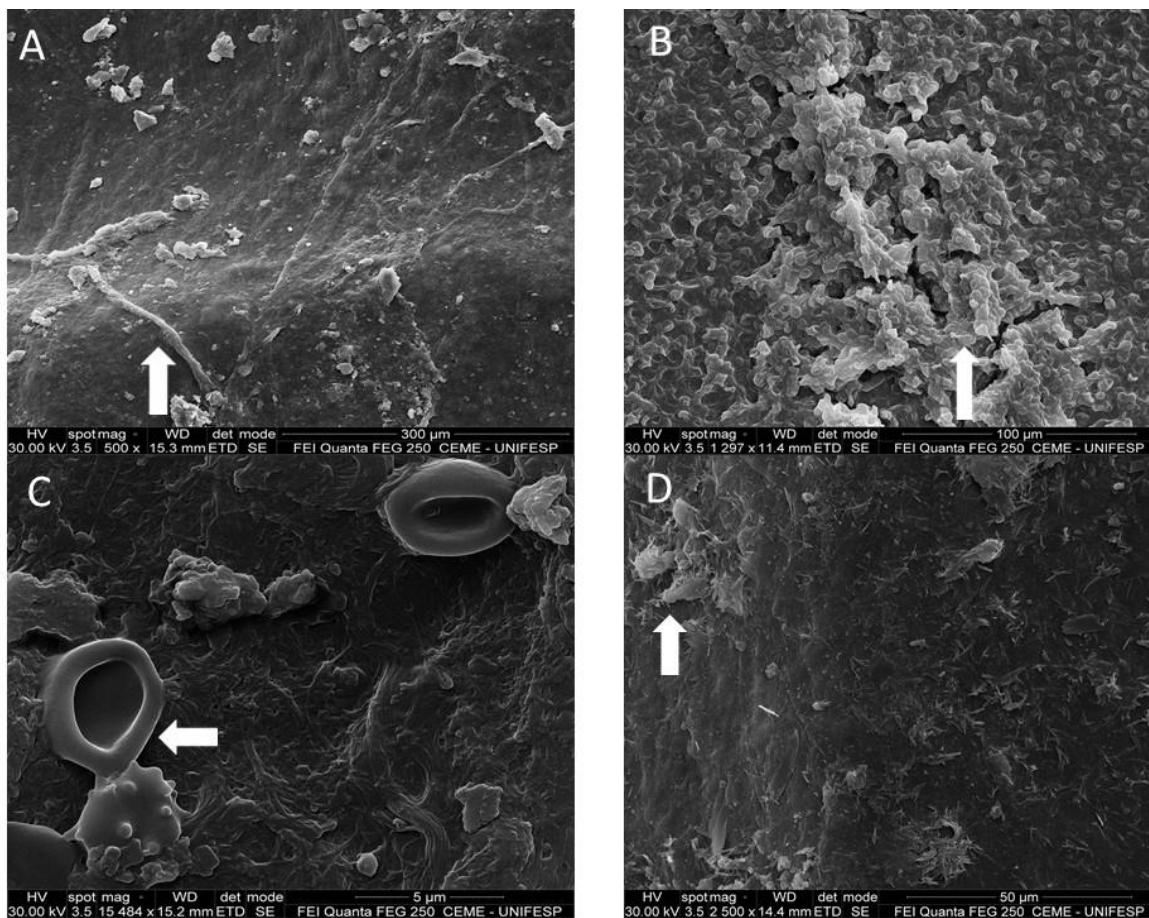


Figura 20- Fotomicrografia de MEV do período experimental de 60 dias, dos grupos HAPNC e OA.

Fonte: Do autor.

Notas: A: grupo HAPNC 60 dias, observa-se a presença de fibras colágenas (seta) ; B: Rede de fibrina (seta) na borda óssea remanescente , grupo HAPNC; C: Hemácia (seta) e cristais de HAPNC em contato com a margem óssea (seta) ; D: partículas de osso autógeno em íntimo contato com a borda óssea remanescente.

6 DISCUSSÃO

As pesquisas acerca dos substitutos ósseos para regeneração tem buscado melhorar as propriedades e características físico-químicas dos biomateriais, a fim de mimetizar a estrutura e composição do osso autógeno (GENG et al., 2017; SILVA et al., 2016; WANG et al., 2016a).

A classe dos nanobiomateriais trouxe novas perspectivas à respeito da regeneração óssea, vários estudos demonstraram melhor resposta biológica, como o aumento da atividade osteoblástica, causada pela característica nanométrica, que provê reações moleculares em uma velocidade maior, além de melhorar a adesão celular relacionada à sua característica de superfície (DUMONT et al., 2016; SAI NIEVETHITHA et al., 2017; WEBSTER, 2000a).

A nanociência veio melhorar a velocidade das reações teciduais, bem como aprimorar a interação dos nanocompósitos com as células. Muitas leis que orientam a ciência convencional não são transferidas para a nanociência, que ainda requer que muitos dos seus mecanismos sejam explanados.

A utilização da hidroxiapatita como substituto ósseo já é bem conhecida pela comunidade científica. A HA é quimicamente similar a estrutura inorgânica do osso, além de ser biocompatível, osteocondutora e auxiliar no processo de osseointegração (GENG et al., 2017; WANG et al., 2016b).

A regeneração óssea com biomateriais sintéticos requerem um longo tempo de cicatrização para que o osso neoformado complete sua função e se organize com anatomia apropriada como a do osso natural. Mediante a isto, as pesquisas tem-se voltado a aprimorar a performance dos biomateriais sintéticos através da nanobiotecnologia e reconstruções 3D (OKAWA et al., 2016; XIE et al., 2017; ZHANG et al., 2017). Justifica-se então a produção da HAPNC e requerimento e registro de sua patente, uma vez que a Carboapatita nanométrica é um nanobiomaterial novo, sintetizado e caracterizado (**ANEXO A**), provando não haver nanobiomaterial semelhante no mercado. A topografia nanométrica possibilita maior interação celular, tanto na adesão quanto no recrutamento celular, as reações teciduais tendem a ocorrer de maneira mais eficaz, acelerando o processo de neoformação óssea. As hidroxiapatitas carbonatadas são as mais similares a composição química do osso natural, pois toda síntese de HA resulta na precipitação de íons carbonato no final da reação. Sendo assim, temos um nanobiomaterial que

intenciona mimetizar o tecido ósseo natural.

Para avaliar o desempenho de enxertos com a finalidade para regeneração óssea, os defeitos críticos são os mais indicados. Um defeito crítico é caracterizado por não ter a capacidade de se reconstituir sozinho em um dado período experimental. Para defeitos críticos em calvária de ratos *wistar*, com períodos experimentais que avaliam a fase de cura inicial da regeneração óssea : 30 dias/ 4 semanas e 60 dias/ 8 semanas, são aceitos defeitos a partir de 5mm, conforme os trabalhos de Patel et al., (2008); Umoh et al., (2009).

Seguindo os critérios dos procedimentos cirúrgicos aplicados na metodologia deste trabalho, utilizou-se os trabalhos de Messoria et al., (2008) e Silva et al., (2016) como referência para a análise histomorfométrica, cálculos de AT e AON, com algumas modificações referentes a quantificação da área de tecido neoformado (JO et al., 2017).

Alguns trabalhos com a análise histomorfométrica , a contagem de área de osso neoformado englobava as partículas de osso autógeno (controle positivo) e também as partículas residuais de enxerto do biomaterial. Porém, muitos biomateriais sintéticos podem ficar por anos no local do enxerto sem que haja reabsorção deste seguida de neoformação óssea (BAE et al., 2014; UMOH et al., 2009). Com as crescentes pesquisas no campo dos nanobiomateriais novas abordagens na metodologia de pesquisa devem ser consideradas (BUSER, 2010; MESSORA et al., 2008; PATEL et al., 2008).

No presente estudo a AON foi quantificada com a exclusão das partículas de enxerto residuais. Essa modificação foi feita de acordo com o trabalho de Jo et al., (2017). Os nanobiomateriais não podem ser observados na microscopia de luz convencional, portanto, com a intenção de calibrar melhor a análise histomorfométrica, apenas as regiões correspondentes a neoformação óssea (osteoblastos, fibras colágenas, matriz osteóide, presença de osteócitos desorganizados na matriz, tecido ósseo imaturo e início da formação de lamelas) é que foram selecionadas para contabilização (CUI et al., 2016; KIM et al., 2015; MACHADO et al., 2016).

Para a quantificação morfométrica através da micro-CT os dados de tecido mineralizado presentes no centro do defeito, simulando o corte histológico, foram mensurados de acordo com os trabalhos de BOUXSEIN et al., (2010); UMOH et al., (2009); WANG et al., (2016a).

A quantificação da área de tecido mineralizado pelo “software” CTan contabiliza a área de tecido ósseo neoformado e resíduos do material de enxerto, tanto da HAPNC quanto as partículas de osso autógeno. Portanto essa análise esclarece a capacidade osteocondutora do enxerto, como a manutenção do arcabouço na região do defeito para facilitar o processo de angiogênese, recrutamento celular e neoformação tecidual, assim como foi observado no trabalho de Wang et al.,(2016a), ao avaliar a ação da BMP2 associada a um “scaffold” de fosfato de cálcio biomimético e β TCP, onde os resultados demonstraram que esta associação teve também propriedades osteoindutoras que alcançou resultados tão efetivos quanto do osso autógeno .

Os resultados da micro-tomografia computadorizada analisados por “score” mostraram que a presença das micropartículas de osso autógeno aparentam maior fechamento do defeito. A disposição das micropartículas de OA ao longo do defeito garantem as propriedades osteoindutoras e osteogênicas, que resultam em neoformação óssea e integração do enxerto ao osso remanescente. O nanobiomaterial HAPNC também manteve-se disposto ao longo do defeito, porém, a sua avaliação por “score” mostrou que a HAPNC 30 dias teve melhor pontuação relacionada a HAPNC 60, onde parte de suas nanopartículas já haviam sido reabsorvidas. Nas bordas ósseas observou-se em todos os grupos, regiões escavadas, com suaves depressões nas margens, sugestivas de áreas de reabsorção, e algumas pontos protuberantes estendendo-se além das margens, indicativo de tecido ósseo neoformado. Estes resultados vão de encontro aos achados de Pang et al., (2015), o estudo comparou a hidroxiapatita convencional com nano-hidroxiapatita. As imagens de micro-CT da nano-hidroxiapatita mostraram-se com maior fechamento do defeito crítico que o grupo de hidroxiapatita convencional.

Pela análise morfométrica por micro-CT, o osso autógeno manteve maior área de tecido mineralizado ao longo dos 60 dias de tratamentos, comprovando sua excelente capacidade osteocondutora para guiar a neoformação óssea.

Os dados estatísticos mostraram que a área de porcentagem de osso de HAPNC 30 dias foi superior a OA 30 dias e HAPNC 60 dias, provavelmente porque o nanobiomaterial tende a desencadear as reações tissulares mais rapidamente, no entanto, não conseguiu manter a mesma quantidade de tecido mineralizado no período de 60 dias. Dumont et al., (2016) e Tae Young et al.,(2016) testaram

nanobiocompósitos de HA em *scaffolds* e avaliaram a diferenciação de *stem-cells* em vários períodos experimentais, justamente para que a arquitetura fosse mantida por mais tempo, garantindo volume para que a angiogênese ocorresse seguida do recrutamento, diferenciação celular e formação de novo osso. Isso se explica porque os nanobiomateriais de ordem nanométrica desencadeiam reações numa velocidade mais rápida que biomateriais convencionais, inclusive o processo de reabsorção por parte das células osteoclásticas. Por isso observamos que HAPNC 60 dias tem parte de seu conteúdo reabsorvido, de modo que a neoformação não conseguiu suprir, então observa-se uma queda da área de conteúdo mineralizado ao longo do defeito, provavelmente a região foi substituída por tecido conjuntivo fibroso.

A análise morfométrica demonstrou que HAPNC 30 dias e OA 60 dias apresentaram resultados semelhantes quando se trata de área de tecido mineralizado presente ao longo do defeito crítico. Wang et al., (2016a) encontraram resultados parecidos quando avaliaram por micro-CT a capacidade osteoindutora da BMP2 associada ao BioCaP e β TCP comparados ao osso autógeno, onde a neoformação óssea pelo grupo teste foi semelhante ao osso autógeno no período de 12 semanas.

Na análise histológica foram identificadas regiões de neoformação óssea nas bordas do defeito, em todos os grupos experimentais. No grupo coágulo, nos períodos de 30 e 60 dias, a neoformação foi bem discreta, iniciando-se nas bordas do remanescente ósseo em direção ao centro do defeito. A espessura do tecido neoformado é inferior à espessura original da calvária, assumindo um formato de rampa. Em defeitos críticos de calvária este tipo de neoformação a partir das margens em formato de rampa é comum de ser observado nos grupos que não apresentam osteocondução adequada para guiar a angiogênese e recrutamento celular. De um modo geral, os grupos coágulo (controle negativo) apresentam esse tipo de característica por não serem capazes de reparar o tecido ósseo se o defeito não for preenchido com algum tipo de enxerto. Amaral (2013) observou estes mesmos resultados quando comparou coágulo, tendão bovino, hidroxiapatita e Bio-oss. Os grupos coágulo e tendão bovino apresentaram discreta formação óssea em suas margens, tendo maior formação de tecido conjuntivo fibroso. Os grupos preenchidos pelas biocerâmicas apresentaram maior neoformação óssea e tecido mineralizado ao longo do defeito.

A área de osso neoformado observada no grupo tratado HAPNC apresentou-

se mais pontualmente, como ilhas de neoformação espalhadas ao longo do defeito, principalmente no período experimental de 30 dias. A neoformação óssea ocorreu de maneira centrípeta, porém a presença dessas ilhas de neoformação ao longo do defeito podem indicar um potencial osteoindutor, como ocorre nos estudos envolvendo BMPs, em que se observa pontos de tecido neoformado no centro de defeito sem estarem associados às margens do osso remanescente (KIM et al., 2015; NOTODIHADRJO et al., 2012; PATEL et al., 2008; WANG et al., 2016a; XIE et al., 2017).

No grupo OA (controle positivo), áreas de tecido neoformado estavam espalhadas por todo o defeito crítico, interconectando as partículas do enxerto, fato este que sugere um processo de osteointegração do enxerto autógeno, em que não necessariamente ocorre uma reabsorção total do enxerto para que haja substituição por novo osso. Pelas propriedades osteogênicas e osteoindutoras no momento em que ocorre a colocação do enxerto, inicia-se o processo de remodelação no sítio receptor, e este enxerto se integra ao meio. Isso resulta em uma maior área de osso, que não corresponde a osso neoformado em sua totalidade, mas que foi capaz de desencadear no sítio receptor uma resposta apropriada para a regeneração óssea (LINDHE, 2010; MISCH, 2000; OLIVEIRA et al., 2015).

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

Segundo os resultados da histomorfometria, a velocidade da atividade osteoblástica não consegue sobrepor a velocidade de reabsorção, no período experimental de 60 dias. Portanto tem-se uma queda da AON, comparado ao grupo HAPNC 30 dias. Por outro lado, a AON encontrada no grupo HAPNC 30 dias foi superior aos demais grupos, provavelmente porque a resposta tecidual ocorreu de forma mais rápida neste grupo.

Porém, para que a neoformação óssea ocorra gradativamente e se mantenha nos períodos experimentais mais tardios há a necessidade de se manter um arcabouço que garanta volume e preenchimento do defeito, sem que haja uma reabsorção rápida do enxerto. Silva et al., (2016) testaram o gel de doxiciclina em defeitos críticos de calvária. Os resultados mostraram resultados relevantes com a utilização da doxiciclina no veículo em gel de natrosol, que serviu como scaffold para garantir que a arquitetura e o espaço a ser preenchido por novo osso fosse garantido. No período experimental de 8 semanas, o grupo que utilizou doxiciclina apresentou maior neoformação óssea devido às suas propriedades de estimulação de osteoblastos e atividade anti-osteoclastogênica.

Os concentrados plaquetários, como o L-PRF, também podem ser utilizados para aprimorar a resposta tecidual e servir como “*scaffold*” para materiais de ordem manométrica (OLIVEIRA et al., 2015).

O biomaterial Bio-oss® é um dos biomateriais mais utilizados para a regeneração óssea. Nos estudos em calvária de ratos, por ter suas partículas muito cristalinas, ele mantém a microarquitetura no local do enxerto para conduzir o processo de neoformação. Sua reabsorção é lenta, em alguns estudos clínicos, biópsias feitas após dez anos de enxerto apresentaram ainda resquícios do biomaterial (Sartori et al., 2003).

A neoformação óssea resultante da utilização do Bio-oss é crescente com o decorrer do período experimental. A microestrutura, porosidade e composição das partículas de Bio-oss favorecem o povoamento celular e atividade osteoblástica, porém, a sua cristalinidade dificulta o processo de reabsorção e substituição do biomaterial por tecido ósseo neoformado, o que pode ser chamado de osteobstrução (AMARAL, 2013). No entanto, avaliando as situações clínicas de cada material de enxerto, materiais nanométricos para regeneração óssea podem ser associados a materiais de alta cristalinidade para que ocorra um equilíbrio entre os processos de neoformação óssea e reabsorção de biomaterial, resultando em uma reposta efetiva, e reduzindo a morbidade de uma segunda cirurgia no caso de enxertos autógenos.

O β TCP é uma biocerâmica muito utilizada para cirurgias de reconstruções ósseas. Sua cristalinidade é inferior à da hidroxiapatita, sendo reabsorvido mais rapidamente. Sua utilização associada a BMP2 foi estudada por Wang et al., (2016a) e os resultados mostraram que houve osteoindução e neoformação óssea tão

eficiente quanto a neoformação óssea do grupo tratado com osso autógeno. Nakayama et al., (2010) observaram que o β TCP sozinho não apresentou potencial osteoindutor, portanto é necessário desencadear uma reação molecular para que tal fato agora Os resultados da HAPNC vão de encontro as pesquisas, que buscam justamente um biomaterial que tenha a capacidade de induzir a neoformação óssea de forma rápida, porém, precisa-se garantir que a neoformação óssea continue em períodos de cicatrização mais tardios.

A neoformação óssea com a utilização de nanobiomateriais tem demonstrado bons resultados, principalmente quando avalia-se a adesão celular, diferenciação e proliferação osteoblástica como encontrados nos estudos de Dumont et al., (2016); Geng et al., (2017); Jain et al., (2014); Kweon et al., (2011); Munarin et al., (2015); Pang et al., (2015); Sai Nievethitha et al.,(2017); Webster, (2000a); Webster et al., (2000b), onde a propriedade osteoindutora e a neoformação óssea apresentaram resultados promissores, garantindo através de diversas análises que os nanomateriais são o caminho para alcançarmos um biomaterial ideal para a regeneração óssea. Porém, a capacidade de manter o arcaçouço no local do defeito crítico para garantir a arquitetura e volume para neoformação óssea vem sendo questionada, pois em períodos de cicatrização mais tardios há perda do volume de biomaterial, devido a sua característica nanométrica, a reabsorção ocorre mais rapidamente. Esta capacidade osteocondutora pode ser aprimorada através da associação com “*scaffolds*” proteicos, como preconiza as terapias 3D (DUMONT et al., 2016; OKAWA et al ., 2016; TAE YOUNG et al., 2016).

As nanopartículas de HA são capazes de internalizar células mesenquimais e desencadear respostas moleculares para a diferenciação destas células. Novas estratégias terapêuticas utilizando *scaffolds* de nanocompósitos associados á biocerâmicas, carreando células mesenquimais e BMPs vem sendo estudadas a fim de mimetizar completamente a estrutura óssea natural, inclusive com os componentes celulares (CHEN et al., 2011; ZHANG et al., 2017). Sendo assim, a associação da carboapatita nanométrica à *scaffolds* proteicos pode trazer resultados ainda mais satisfatórios para os períodos de cicatrização mais tardios.

Para processos de regeneração óssea em curto intervalo de tempo, como por exemplo: preenchimento alveolar pós exodontia para instalação de implantes de titânio; preenchimento de “*gaps*” na associação a enxertos em bloco; fraturas de vértebras e trincas de ossos longos ou ainda regeneração óssea em maxilares de

pacientes pediátricos, cujo metabolismo é mais acelerado, a HAPNC demonstrou ser uma alternativa viável (BUSER et al., 2016).

Os resultados encontrados na MEV, micro-CT e histomorfometria demonstraram que o grupo HAPNC 30 dias apresentou uma neoformação óssea efetiva, e que, neste período experimental, ela foi capaz de conduzir de um modo satisfatório o processo de regeneração óssea.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos e dentro dos limites deste estudo, observa-se que a carboapatita nanométrica foi capaz de estimular a regeneração óssea quando utilizada no preenchimento de defeitos críticos em calvária de ratos, principalmente no período experimental de 30 dias. Segundo os dados histomorfométricos e morfométricos, a área de osso neoformada no defeito crítico foi bastante similar aos resultados do grupo com osso autógeno, considerado padrão ouro dos enxertos ósseos. No período experimental de 60 dias, houve uma reabsorção acentuada do nanobiomaterial, o que comprometeu a neoformação óssea neste período mais tardio, o que sugere a perda do mecanismo osteocondutor devido a acelerada atividade celular por parte dos osteoclastos em relação ao biomaterial de categoria nanométrica.

Os resultados foram promissores quando comparados ao controle positivo: osso autógeno, demonstrando que este nanobiomaterial foi eficaz no período experimental de 30 dias. Porém, novos estudos devem ser guiados com o objetivo de aprimorar as reações teciduais em relação ao nanobiomaterial, e avaliar também a sua capacidade osteoindutora e sua viabilidade nas indicações clínicas.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, M. B. (2013). **Capacidade de regeneração óssea de biomateriais em defeito crítico de calvária**: análise histológica e microtomografia computadorizada. (2013)110f. Tese (Doutorado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos/ Instituto de Química de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
- ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. In.: _____. **Biomaterials**. Nova York: Elsevier, 2000. cap. 21. p. 667-681.
- APARECIDA, A. H. et al. Influência dos íons K⁺ e Mg²⁺ na obtenção de Apatitas Biomiméticas. **Eclética Química**, v. 30, n. 4, 2005.
- BAE, S. Y. et al. Tomographic and histometric analysis of autogenous bone block and synthetic hydroxyapatite block grafts without rigid fixation on rabbit calvaria. **Journal of Periodontal and Implant Science**, v. 44, n. 5, p. 251–258, 2014.
- BONADIO, T. G. M. (2014). **Biocompósitos de pentóxido de nióbio, hidroxiapatita e β- fosfato tricálcico**: produção, caracterização e estudos in vivo como suportes ósseos denso e poroso 2014. 140 f. Tese (Doutorado em Física) - Universidade Estadual de Maringá, 2014.
- BOUXSEIN, M. L. et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 7, p. 1468–1486, 2010.
- BUSER, D. **20 anos de regeneração óssea guiada na Implantodontia**. 2. ed. São Paulo: Quintessence, 2010.
- BUSER, Z. et al. Synthetic bone graft versus autograft or allograft for spinal fusion: a systematic review. **J Neurosurg Spine**, v. ANNS,2016, p. 1–8, 2016.
- CARMO, S. C. F. DO. **Comportamento Osteoclástico na Superfície de Hidroxiapatite Micro- e Nanoestruturada**. [s.l.] (2012).124f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) , Engenharia Biomédica, Universidade de Porto, 2012.
- CHEN, L. et al. The role of surface charge on the uptake and biocompatibility of hydroxyapatite nanoparticles with osteoblast cells. **Nanotechnology**, v. 22, n. 10, 2011.
- COSTA, N. M. F. et al. Osteogenic effect of tricalcium phosphate substituted by magnesium associated with Genderm ® membrane in rat calvarial defect model. **Materials Science & Engineering C**, v. 61, p. 63–71, 2016.
- CUI, W. et al. Repair of rat calvarial defects using Si-doped hydroxyapatite scaffolds loaded with a bone morphogenetic protein-2-related peptide. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 34, n. 11, p. 1874–1882, 2016.

CUISINIER, F. J. G. Bone mineralization. **Solid State & Mater. Sci.**, n. 1, p. 436-439, 1996.

DATTA, H. K. et al. The cell biology of bone metabolism. **J Clin Pathol** , n. 61, v.5, p.577-87, 2008.

DUMONT, V. C. et al. Glycol chitosan/nanohydroxyapatite biocomposites for potential bone tissue engineering and regenerative medicine. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 1465–1478, 2016.

DUTTA, S. R. et al. Ceramic and non-ceramic hydroxyapatite as a bone graft material: a brief review. **Irish Journal of Medical Science**, v. 184, n. 1, p. 101–106, 2015.

GENG, Z. et al. Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation of Nanostructured Hydroxyapatite with Different Dimensions. **Nanomaterials** (Basel, Switzerland), v. 7, n. 2, p. 38, 2017.

GUDA, T. et al. Bilayer hydroxyapatite scaffolds for maxillofacial bone tissue engineering. **The International journal of oral & maxillofacial implants**, v. 27, n. 2, p. 288–94, 2012.

GUTIERRES, M. et al. . Substitutos ósseos. Conceitos gerais e estado actual . **Arquivos de medicina** , n. 19, v.4, p.153-62, 2006.

HELMUS, M. N.; TWEDEN; K., Materials selection. **In Encyclopedia Handbook of Biomaterials and Bioengineering**, v. 2, part A, p. 1429-1463,1995.

HENCH, L. L. Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials**, n. 19, p. 1419-1423, 1998.

HERNÁNDEZ-GIL, I.F. et al. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v.11, p.47-51, 2006.

HORNEZ, J.C. et al. Biological and physico-chemical assessment of hydroxyapatite (HA) with different porosity. **Biomol. Eng**, v. 24, p. 505-509, 2007.

JAIN, R. Comparison of Nano-Sized Hydroxyapatite and b -Tricalcium Phosphate in the Treatment of Human Periodontal Intrabony Defects. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 3, n. Group I, p. 1–5, 2015.

JO, Y. Y. et al. Silk fibroin-alginate-hydroxyapatite composite particles in bone tissue engineering applications in vivo. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, 2017

JUNQUEIRA, L.C. Tecido ósseo. In: Koogan G, **Histologia Básica**. 11^a edição, p. 108-26, 2008.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral**, 2.ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 2004.

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

KIM, B.S. et al. Comparison of in vitro and in vivo bioactivity: cuttlefish-bone-derived hydroxyapatite and synthetic hydroxyapatite granules as a bone graft substitute. **Biomedical materials** (Bristol, England), v. 9, p. 25004, 2014.

KIM, H. J. et al. Efficacy of rhBMP-2 / Hydroxyapatite on Sinus Floor Augmentation : A Multicenter , Randomized Controlled Clinical Trial. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 9, p. 158–165, 2015.

KRUSE, A. et al. Oxide-based and a xenogenic hydroxyapatite-based bone substitute materia Bone regeneration in the presence of a synthetic hydroxyapatite / silica oxide based and a xenogenic hydroxyapatite based bone substitute material. **Clinical Oral Implants Research**, v. 22, n. 5, p. 506–511, 2011.

KOLERMAN, R. et al. Histomorphometric analysis of newly formed bone after bilateral maxillary sinus augmentation using two different osteoconductive materials and internal collagen membrane. **International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 32, p. e21-e28, 2012.

KWEON, H.Y. et al. Development of nano-hydroxyapatite graft with silk fibroin scaffold as a new bone substitute. **Journal Oral Maxillofacial Surgery**, v. 69, p. 1578-1586, 2011.

LEGEROS, R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clin Orthop Rel Res**, v. 395, p. 81-98, 2002.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. **Periodontologia Clínica e Implantologia Odontológica**. 5ª ed. São Paulo. Editora: Médica Panamericana, 2010.

MACHADO, C. P. G. et al. Histomorphometric evaluation of strontium-containing nanostructured hydroxyapatite as bone substitute in sheep. **Brazilian oral research**, v. 30, n. 1, p. e45, 2016.

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

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

MESSORA, M.R. et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria, **Journal of Periodontology Research**, v. 43, n. 2, p. 217-223, 2008.

MISCH, C.E.; BIDEZ, M.W. Enxertos ósseos e Biomateriais, capítulo 12. In: MISCH, C.E. **Implantes dentários contemporâneos**. São Paulo: Santos, 2009.

MUNARIN, F. et al. International Journal of Biological Macromolecules Micro- and nano-hydroxyapatite as active reinforcement for soft biocomposites. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 199–209, 2015.

NAKAYAMA, H. I. N.; AWASE, T. O. K.; OGAMI, H. I. K. Evaluation by Bone Scintigraphy of Osteogenic Activity of (Porous b -TCP and HAp Particles) Subcutaneously Implanted in Rats. v. 24, n. May, 2010.

NANCI, ANTONIO. **Ten Cate histologia oral: desenvolvimento, estrutura e função**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

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

OKAWA, H. et al. Scaffold-Free Fabrication of Osteoinductive Cellular Constructs Using Mouse Gingiva-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. **Stem Cells International**, v. 2016, 2016.

OLIVEIRA, M.R. et al. Influence of the association between platelet-rich fibrin and bovine bone on bone regeneration. A histomorphometric study in the calvaria of rats. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg**, v.44, p. 649–655, 2015.

PANG, K. M. et al. Biologic properties of nano-hydroxyapatite: An in vivo study of calvarial defects, ectopic bone formation and bone implantation. **Bio-Medical Materials and Engineering**, v. 25, n. 1, p. 25–38, 2015.

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

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

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

PEREIRA, M.M. Conceitos básicos de ciência dos materiais. In: Oréfice, R.L, Magalhães, M.M, Mansur HS, eds. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica; p.13-37.2006.

SAI NIEVETHITHA, S. et al. Nanoceramics on osteoblast proliferation and differentiation in bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 67–74, 2017.

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

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

SILVA, A. C. et al. Effect of Doxycycline in Gel Form in Regeneration Bone: Histomorphometric and Tomographic Study in Rats Calvary. **J Periodontol**, v. 87, p.74-82, 2016.

SILVA, A. D. E. C. **Gel de doxiciclina a 10% como inibidor da osteoclastogênese na regeneração óssea, associado ou não ao bio-oss – estudo histomorfométrico e tomográfico em ratos.** (2015) 98f. [s.l.] Universidade Federal de Alfenas, 2015.

TAE YOUNG, A. et al. Interaction of stem cells with nano hydroxyapatite-fucoidan bionanocomposites for bone tissue regeneration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 1488–1491, 2016.

UMOH, J.U. et al. In vivo micro-CT analysis of bone remodeling in a rat calvarial defect model. **Physics Inmedicine And Biology**, v. 54, p. 2147–2161, 2009.

UTKU, F. S. et al. Carbonated hydroxyapatite deposition at physiological temperature on ordered titanium oxide nanotubes using pulsed electrochemistry. **Ceramics International**, v. 40, n. 10, p. 15479–15487, 2014.

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

WANG, Y.-F. et al. Comparison of bone regeneration in alveolar bone of dogs on mineralized collagen grafts with two composition ratios of nano-hydroxyapatite and collagen. **Regenerative biomaterials**, v. 3, n. 1, p. 33–40, 2016b.

WEBSTER, T. J. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. **J Biomed Mater Res** n.3, v.51, p .475-83, 2000a.

WEBSTER, T. J. et al. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. **Biomaterials** v.17 , n.21, 1803-10, 2000b.

WILLIAMS, D.F. In **Definitions in biomaterials**; 1ªEd.; Elsevier, Amsterdam, p 66-71, 1987.

XIAO-MAN, L.; WEBSTER, S. S. J. "Integrated Bone Tissue Anatomy and Physiology." In **Current Topics on Bone Biology**, edited by YAO-ZHONG LIU HONG-WEN DENG, 11-21. USA: World Scientific, 2005.

XIE, C. et al. Graphene Oxide Nanolayers as Nanoparticle Anchors on Biomaterial Surfaces with Nanostructures and Charge Balance for Bone Regeneration. **Journal**

of **Biomedical Materials Research - Part A Applied**, p. 2–43, 2017.

ZHANG, L.; WEBSTER, T. J. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. **Nano Today**, n. 4, p.66-80, 2009.

ZHANG, B. et al. Tissue-engineered composite scaffold of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite nanoparticles seeded with autologous mesenchymal stem cells for bone regeneration. **Journal of Zhejiang University: Science B**, v. 18, n. 11, p. 963–976, 2017.

ANEXOS

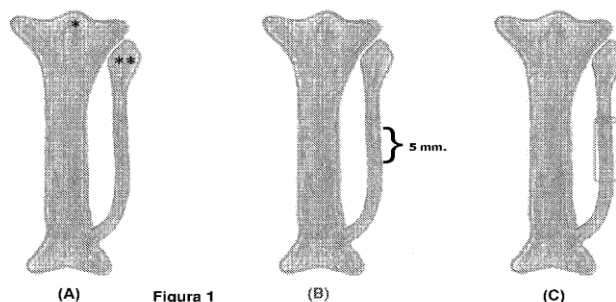
ANEXO A – Registro de patente da HAPNC

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional(10) Número de Publicação Internacional
WO 2016/187685 A1(43) Data de Publicação Internacional
1 de Dezembro de 2016 (01.12.2016) **WIPO | PCT**

- (51) **Classificação Internacional de Patentes :**
A61K 6/033 (2006.01) *A61K 33/42* (2006.01)
A61B 17/58 (2006.01) *C07F 9/02* (2006.01)
- (21) **Número do Pedido Internacional :**
PCT/BR2016/050112
- (22) **Data do Depósito Internacional :**
20 de Maio de 2016 (20.05.2016)
- (25) **Língua de Depósito Internacional :** Português
- (26) **Língua de Publicação :** Português
- (30) **Dados Relativos à Prioridade :**
BR102015011732-9
20 de Maio de 2015 (20.05.2015) BR
- (71) **Requerentes :** **UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS** [BR/BR]; Rua Gabriel Monteiro da Silva, Nº700, Centro Alfenas, Minas Gerais, 37130-000 Alfenas (BR). **FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS - FAPEMIG** [BR/BR]; Av. José Cândido da Silveira, Nº 1.500 - Horto Florestal - Belo Horizonte/MG, 31035-536 Belo Horizonte (BR).
- (72) **Inventores :** **CARABALLO, Mirta Mir**; Rua Joaquim Bernardes da Silva, 856, Jardim Aeroporto - Alfenas - MG, 37130-000 Alfenas (BR). **GEONMONOND, Rafael Dos Santos**; Rua Presciliano Pinto de Almeida, 1375, Livramento - Buritama - SP, 15.290-000 Buritama (BR).
- (74) **Mandatário :** **VAZ E DIAS ADVOGADOS & ASSOCIADOS**; Rua da Assembléia 10, CJ. 1503/1504 – Centro, Rio de Janeiro – RJ, Cep: 20011-000, 20011-000 Rio de Janeiro (BR).
- (81) **Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes) :** AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes) :** ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,

(Continua na página seguinte)

(54) **Title :** NANOSCALE CARBOAPATITE WITH SPECIFICITY FOR BONE REGENERATION(54) **Título :** CARBOAPATITA NANOMÉTRICA COM ESPECIFICIDADE PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA

(A) **Figura 1** (B) (C)

(57) **Abstract :** The present invention relates to a process for producing nanoscale carbonate hydroxyapatites (CHA) with dimensions of 1-10 nm obtained for a CO₃²⁻ composition range of 0-14%, which are similar in terms of crystallinity and composition to human bone tissue, and are intended for use in medicine and dentistry. The material produced has CO₃²⁻ compositional variability and has the chemical and physical features of the bone into which it is to be implanted, thereby stimulating natural bone integration and regeneration processes. Said material retains the same nanostructural and degradation-related features *in vivo*, for the purpose of selective and improved use thereof in implants, grafts and fillers for bones in various parts of the body.

(57) **Resumo :** A presente invenção trata-se de um processo de produção de hidroxiapatitas carbonatadas (HAC) nanométricas com dimensões entre 1-10 nm obtidas para uma faixa de composições

(Continua na página seguinte)

WO 2016/187685 A1

ANEXO B – Certificado de aprovação do CEUA:

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação histológica da carboapatita nanométrica como substituto ósseo em defeitos críticos em calvária de ratos", registrada com o nº 29/2016, sob a responsabilidade de Tomaz Henrique Araújo – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS, em 27/09/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 27/09/2016 a 05/12/2017
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico
Nº de animais	80
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da UNIFAL

Alfenas, 28 de setembro de 2016.

Estela Regina de Oliveira

Prof.ª Dr.ª Estela Regina de Oliveira
 Coordenadora CEUA-UNIFAL