

**BRUNA BRISTOT COLOMBO**

**ANÁLISE DE TRÊS FORMULAÇÕES DE BIOCIMENTOS  
APLICADOS ATRAVÉS DE GUIAS DE CRESCIMENTO NA  
CALVÁRIA DE COELHOS**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Oleskovicz

**LAGES, SC  
2016**

Colombo, Bruna Bristot

Análise de três formulações de biocimentos aplicados através de guias de crescimento na calvária de coelhos / Bruna Bristot Colombo. - Lages, 2016. 134p.

Orientador: Nilson Oleskovicz  
Dissertação (mestrado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2016.

1. Biomaterial. 2. Hidroxiapatita. 3. Neoformação óssea. 4. Guias de crescimento I. Oleskovicz, Nilson. II. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação. III. Título.

**Ficha catalográfica elaborada pela autora, com auxílio do programa de geração automática da Biblioteca Setorial do CAV/UESC.**

**BRUNA BRISTOT COLOMBO**

**ANÁLISE DE TRÊS FORMULAÇÕES DE BIOCIMENTOS  
APLICADOS ATRAVÉS DE GUIAS DE CRESCIMENTO NA  
CALVÁRIA DE COELHOS**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em ciência animal da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

**Banca Examinadora:**

Orientador: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Nilson Oleskovicz  
PPGCA/CAV/UDESC

Membro: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Cristiano Gomes  
UFSC/Curitibanos

Membro: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes  
PPGCA/CAV/UDESC

**LAGES, 06/07/2016**



“Aos meus pais, Luiz e DÍlvia, minha irmã Juliana e meu cunhado Fábio, sem vocês eu não teria chegado até aqui! Ao meu sobrinho Dudu, que veio iluminar nossa casa. Ao meu amor, meu marido Martielo, que sempre me concedeu apoio incondicional e o amor maior do mundo!”



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, que é a força maior que me guia em todas as minhas decisões e caminhos.

Agradeço aos meus pais e à minha irmã pelo apoio incondicional, dedicação e carinho que sempre me concederam ao longo de toda a minha jornada acadêmica, residência e agora no mestrado.

Agradeço às minhas amigas Cristiana Corrêa Kuci, Helena Mazzoni Baldini e Laís Villa Demetrio por todo o companheirismo, risadas, momentos de descontração, jantares, almoços, enfim, por todos os ótimos momentos que tornaram meus dias mais felizes. Agradeço aos amigos Bruna e Douglas Regalin, por toda a ajuda e amizade aos longos destes anos de convívio e também ao Ademar Dallabrida e a Lú, que além de dindos se tornaram grandes amigos.

Agradeço à todos os colegas de pós graduação que estiveram ligados direta ou indiretamente ao meu experimento de mestrado, a ajuda de todos foi, sem dúvida, extremamente importante para o êxito do trabalho.

Agradeço ao prof. Dr. Aury Nunes de Moraes, por toda a ajuda e conselhos que me concedeu ao longo da minha jornada e principalmente pelo grande exemplo de pessoa e profissional. Agradeço ao prof. Dr. Celso Pilati por toda a ajuda na parte experimental, por estar sempre disponível e por todas as risadas. Agradeço ao Prof. Dr. Nelson Camargo, que sempre esteve prontamente disponível para tirar qualquer dúvida e ajudar no que fosse preciso.

Agradeço ao meu orientador prof. Dr. Nilson Oleskovicz, que sempre esteve pronto a sanar nossas dúvidas e dilemas e que sempre garimpou fundos para que não nos faltasse nada em nossos experimentos.

Agradeço imensamente a todo o pessoal que trabalha no hospital veterinário, tanto na limpeza, na secretaria ou enfermagem que sempre procuraram nos auxiliar e tornar todo

o trabalho menos difícil. Agradeço à Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) pela oportunidade concedida bem como pela bolsa de auxílio PROMOP que recebi no primeiro ano de mestrado. Agradeço também à CAPES pelos 8 meses de bolsa que recebi no segundo ano de mestrado.

Aos meus coelhos, pois sem eles nada disso teria sido possível! Espero ter proporcionado o ambiente mais favorável e agradável para eles.

A todas as pessoas que por ventura não tiveram seus nomes citados nestes agradecimentos, mas que de alguma forma contribuíram para que esse objetivo fosse alcançado.

E, finalmente, ao meu querido marido Martiello Ivan Gehrcke, que me ofereceu apoio incondicional e conselhos valiosos e que me inspira à estar sempre buscando evolução tanto pessoal quanto profissional. Você é e sempre será meu mais valioso tesouro.



“As criaturas que habitam esta terra em que vivemos, sejam elas seres humanos ou animais, estão aqui para contribuir, cada uma com sua maneira peculiar, para a beleza e a prosperidade do mundo”

Dalai Lama



## RESUMO

COLOMBO, Bruna Bristot. **Análise de três formulações de biocimentos aplicados através de guias de crescimento na calvária de coelhos.** 2016. 134f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2016.

O presente estudo objetivou analisar e comparar diferentes combinações de biocimentos em relação ao seu potencial osseoindutivo e osseocondutivo, quando aplicados através de guias de crescimento na calvária de coelhos. Foram utilizados 14 coelhos da raça Nova Zelândia, machos, com 6 meses de idade e peso médio de  $3,28 \pm 0,44$  kg, comprovadamente hígidos através de exame físico e análise hematológica. Após realização de anestesia e em adequado plano cirúrgico, os animais foram submetidos à exposição óssea periosteal da região da calvária, onde, em cada coelho, foram fixados com parafuso de aço inoxidável, quatro guias cilíndricas de poliamida. Destas guias, três foram preenchidas com materiais na forma de biocimento, compostos por: Hidroxiapatita a 100% (HA 100%), Hidroxiapatita 95% + Alumina 5% (HA95% + Al5%) e Hidroxiapatita 99% + Magnésio 1% (HA99% + Mg1%) e uma com coágulo sanguíneo autólogo (controle). Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: M60 (n=07) e M90 (n=07), que foram eutanasiados com 60 e 90 dias de pós-operatório, respectivamente, sendo a calvária removida e acondicionada em formaldeído por 15 dias. Após, a calvária foi seccionada na forma de quatro quadrados, cada qual contendo o biomaterial ou o controle, sendo mantidos em formaldeído tamponado por mais 15 dias e então encaminhados para avaliações histológicas e para a realização de microscopia eletrônica por varredura (MEV). Analisando as imagens histológicas e as micrografias obtidas com a MEV, observou-se que as amostras controle não apresentaram crescimento ósseo

expressivo. Os biocimentos formados por HA100% e HA99% + Mg1% se mostraram bastante promissores, levando a um importante crescimento ósseo exoesquelético (osseoindução), desde a base quanto ao ápice das amostras (osseocondução) e apresentaram ausência de rejeição, indicada pela pequena quantidade de tecido fibroso e células inflamatórias. As amostras contendo HA99% + Mg1% proporcionaram maior crescimento ósseo em uma fase inicial quanto comparada as que continham HA100%. As amostras compostas por hidroxiapatita 95% + Alumina 5% não obtiveram resultados satisfatórios, levando à ínfima neoformação óssea e apresentando sinais de rejeição. Frente ao exposto, o biocimento composto por HA 100% e o compósito formado por HA99% e Mg1% são promissores e passíveis de serem utilizados como promotores de neocrescimento ósseo.

**Palavras-chave:** Biomaterial. Hidroxiapatita. Neoformação óssea. Guias de crescimento.

## ABSTRACT

COLOMBO, Bruna Bristot. **Analysis of three biociments formulations applied by growth guides in the calvaria of rabbits**. 2016. 134f. Dissertation (Masters in Animal Science) - University of the State of Santa Catarina. Graduate Program in Animal Science, Lages, 2016.

This study aimed to analyze and compare different combinations of biocements in relation to osteoinductive and osseoconductive potential, applied by growth guides in rabbit calvaria. We used 14 New Zealand male rabbits, with 6 months of age and average weight of  $3.28 \pm 0.44$  kg, proved healthy through physical examination and hematologic analysis. After performing anesthesia, the animals underwent periosteal bone exposure of the calvaria and each rabbit were attached four cylindrical polyamide guides with stainless steel bolt. Of these guides, three were filled with materials in the form of biocement consisting of: hydroxyapatite 100% (HA 100%), Hydroxyapatite 95% plus Alumina 5% (HA95% + Al5%) and Hydroxyapatite 99% plus Mg 1% (HA99% + Mg1%) and one with autologous blood clot (control). The animals were randomly assigned into two groups: M60 (n = 07) and M90 (n = 07) who were euthanized at 60 and 90 days postoperatively and the calvaria was removed and wrapped in formaldehyde for 15 days. After, the calvaria was sectioned in four squares, each containing the biomaterial or control and is maintained in buffered formaldehyde for 15 days for histological evaluations and scanning electron microscopy (SEM). Analyzing the images and histological micrographs obtained with the SEM the control samples showed no significant bone growth. The biocements formed by HA100% and HA99% + Mg1% proved promising, leading to an important exoskeletal bone growth (osteoinduction), since the base and the apex of the samples (osseconduction) and

showed no rejection indicated by small amount of fibrous tissue and inflammatory cells. Samples containing HA99% + Mg1% provided greater bone growth at an early stage as compared those containing HA100%. Samples composed of hydroxyapatite 95% + Alumina 5% did not obtain satisfactory results, leading to tiny bone formation and showing signs of rejection. Based on these, the biociment composed of HA100% and the composite formed by HA99% and Mg1% are promising and likely to be used as bone neocresciment promoters.

**Keywords:** Biomaterial. Hydroxyapatite. Bone formation. Growth guides

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Coelho da raça Nova Zelândia acondicionado em gaiola galvanizada específica para a espécie, em período de ambientação (30dias)..... 57
- Figura 2 -** Unidade experimental com a região craniana apoiada e fixada com esparadrapos sobre o suporte metálico em forma de calha, preparação pré-operatória..... 59
- Figura 3 -** Modelo utilizado para ilustrar a posição em que cada biomaterial deveria ser implantado, sempre da mesma forma, em todas as unidades experimentais..... 60
- Figura 4 -** Rebatimento do perióstio com auxílio de elevador periosteal, após incisão de pele..... 60
- Figura 5 -** Observa-se a sequência de preparo do biocimento, onde inicialmente se mistura o pó com o sangue do próprio animal (A), até a obtenção de uma pasta cimentícia (B), para posterior preenchimento da guia de crescimento (C). Em D se observa a fixação da guia de crescimento à calvária do coelho, com uso de parafuso de aço inoxidável de 8mm de comprimento e 2mm de diâmetro..... 62

- Figura 6 -** Observa-se o aspecto da calvária após fixação com parafuso de aço inoxidável de uma guia de crescimento (A) e posteriormente as quatro guias implantadas (B). A sutura ocorreu com pontos isolados simples e com o uso de mononylon de diâmetro 3-0 (C). Aspecto final da unidade experimental após a finalização da anestesia e cirurgia (D)..... 63
- Figura 7 -** Aspecto da calvária com as quatro guias de crescimento após permanecer 15 dias conservada em formaldeído 10% (A) e após a remoção das guias de crescimento, observa-se a disposição dos tratamentos (B)..... 67
- Figura 8 -** (A) observa-se o disco de diamante acoplado a um motor de alta rotação, utilizado para criar um ponto de fragilidade nas amostras. (B) observa-se a peça dividida em duas partes..... 70
- Figura 9 -** Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), preenchimento de lacunas osteocíticas (PLO), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo Hidroxiapatita 100%, após 90 dias de implante..... 71



- Figura 10** - Imagem histológica do tratamento controle, indicando presença de pequena camada de deposição óssea, ocorrendo com grande proximidade ao tecido ósseo da calvária (seta preta) aos 60 dias após a implantação. H&E, Obj.10..... 76
- Figura 11** - Imagem obtida através de MEV, demonstrando o neocrescimento na cúpula preenchida por coágulo sanguíneo (grupo controle), evidenciando intensa presença de tecido fibroso (seta preta) entremeado por células da linhagem sanguínea (seta branca), aos 60 dias após a implantação..... 78
- Figura 12** - Imagem obtida através de MEV evidenciando a superfície do neocrescimento contendo coágulo sanguíneo (controle) aos 90 dias de pós-operatório (A) demonstrando a presença de pequena neoformação óssea (seta branca) e alta celularidade na superfície (B) observase osteoblastos emitindo prolongamento (seta preta) para posterior formação óssea..... 79
- Figura 13** - (A) Imagem histológica obtida do tratamento HA 100% após 60 dias de implantação, demonstrando o neocrescimento ósseo distribuído desde a base até a superfície da cúpula, a presença consistente de biomaterial remanescente (BR) e a presença de osteócitos

	aprisionados (seta preta). H&E Obj, 10. (B) A imagem histológica foi obtida do topo do processo, demonstrando a grande quantidade de células de limpeza, exemplificadas pela seta preta. H&E, Obj. 40.....	81
<b>Figura 14 -</b>	Micrografia obtida através de MEV ilustrando a grande quantidade de biomaterial HA 100% presente aos 60 dias após o implante (seta preta).....	82
<b>Figura 15 -</b>	Micrografia obtida através de MEV demonstrando a moderada presença de neoformação óssea do biocimento composto por HA 100% aos 60 dias pós-implante (seta preta).....	83
<b>Figura 16 -</b>	Imagem histológica de toda a peça, pertencente ao grupo HA 100%, aos 90 dias após a implantação, demonstrando a quantidade de tecido ósseo neoformado (seta branca). H&E, Obj. 4.....	84
<b>Figura 17 -</b>	Imagem histológica demonstrando a presença de tecido ósseo tanto primário (seta preta) quanto secundário (seta vermelha) no neocrescimento ósseo do biomaterial HA 100% aos 90 dias após a implantação. H&E, Obj. 10.....	84
<b>Figura 18 -</b>	Micrografia obtida através de MEV, do biocimento HA 100% aos 90 dias após implantação, demonstrando a atividade de	

	osteoblastos e a emissão de prolongamentos nesta amostra (seta preta).....	86
<b>Figura 19 -</b>	Projeção histológica demonstrando a quantidade de tecido ósseo neoformado (seta preta) aos 60 dias após implantação do biocimento formado por HA 99% + Mg 1%. H&E, Obj. 10.....	87
<b>Figura 20 -</b>	A imagem histológica demonstra a grande quantidade de osteoclastos presentes na amostra (seta preta), representando o grupo HA99% + Mg1% aos 60 dias após a implantação. H&E, Obj. 10.....	88
<b>Figura 21 -</b>	Micrografia (A), representando o compósito HA 99% + Mg 1% aos 60 dias após implantação, demonstra a evidente neoformação óssea (NO) no topo da cúpula e alta celularidade presente. Na figura B, observa-se o crescimento ósseo entre os grânulos, representado pela seta preta.....	89
<b>Figura 22 -</b>	Imagem obtida através de microscopia óptica, onde se evidencia a presença de osso primário e osso secundário maduro (seta preta), com osteócitos aprisionados (seta vermelha), nas amostras contendo HA + Mg aos 90 dias após implantação na calvária de coelhos .H&E. Obj 10.....	90
<b>Figura 23 -</b>	As micrografias obtidas através de MEV, obtidas do compósito HA99% + Mg 1%, 90 dias após a implantação, demonstram a	

	interligação de tecido ósseo neoformado entre os grânulos do biomaterial (seta preta).....	91
<b>Figura 24 -</b>	Imagens de microscopia óptica onde em (A) observa-se a grande quantidade de biomaterial remanescente (BR) (Obj 10). Na figura B, evidencia-se a grande quantidade de células de limpeza uninucleares e multinucleares (osteoclastos) presentes no implante formado por HA95% + Al5% aos 60 dias após implantação. H&E, Obj 40.....	93
<b>Figura 25 -</b>	A micrografia do compósito HA 95% + Al 5%, obtida através de MEV, demonstra em (A) a grande quantidade de biomaterial presente aos 60 dias após a implantação (seta preta). Em (B), observa-se que existe pequena neoformação óssea na superfície dos grânulos (seta preta).....	94
<b>Figura 26 -</b>	Imagem histológica do compósito HA 95% + Al 5%, aos 90 dias após a implantação, demonstrando a presença acentuada de biomaterial remanescente (BR), bem como a grande quantidade de células de limpeza e macrófagos (seta branca). H&E. Obj. 10..	95
<b>Figura 27 -</b>	Micrografia do biomaterial formado por HA95% + Al5%, após 90 dias de implante, evidenciando a pequena quantidade de prolongamentos e neoformações ósseas, bem como a grande quantidade de biomaterial remanescente (BR).....	96

- Figura 28** - Imagens histológicas comprando os tratamentos após 60 dias de implantação, (A) grupo controle; (B) HA 100%; (C) HA99% + Mg1% e (D) HA95%+Al5%. As setas pretas indicam neocrescimento ósseo H&E 10X..... 99
- Figura 29** - Imagens obtidas através de MEV, comparando os tratamentos após 60 dias de implantação, (A) grupo controle; (B) HA 100%; (C) HA99% + Mg1% e (D) HA95%+Al%. H&E 10X..... 99
- Figura 30** - Imagens histológicas comparando os tratamentos após 90 dias de implantação, (A) grupo controle; (B) HA 100%; (C) HA99% + Mg1% e (D) HA95%+Al5%. As setas pretas indicam neocrescimento ósseo H&E 10X..... 100
- Figura 31** - Imagens obtidas através de MEV, comparando os tratamentos após 90 dias de implantação, (A) grupo controle; (B) HA 100%; (C) HA99% + Mg1% e (D) HA95%+Al5%. H&E 10X..... 100



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 -** Biomateriais fornecidos pelo Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC-Joinville (CCT) e suas composições..... 56
- Tabela 2 -** Tabela modificada de Pazzini (2014), utilizada para avaliação pós-operatório dos coelhos submetidos a implantação de guias de crescimento na região da calvária, graduando como ausente, moderado ou intenso os seguintes parâmetros: ingestão de alimento, ingestão de água, apatia, movimentação e graduando como presente ou ausente os seguintes parâmetros: presença de urina, presença de fezes, deiscência da sutura, presença de exsudato na ferida cirúrgica, edema e dor à palpação (n = 14)..... 65
- Tabela 3 -** Tabela modificada de Valiati (2011), atribuindo graus, expressados por cruces, no que diz respeito ao grau de presença ou ausência dos seguintes parâmetros nos biocimentos aplicados: neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), preenchimento das lacunas osteocíticas (PLO), presença de osteoclastos (PO), presença de células de limpeza (CL), biomaterial remanescete (BR), presença de osso primário (OP) e presença de osso secundário (OS)..... 69

**Tabela 4 -** Frequência observada no primeiro, segundo e terceiro dia de pós-operatório após implantação de guias de crescimento na região da calvária de coelhos, segundo os seguintes parâmetros avaliados: ingestão de alimento, ingestão de água, apatia, movimentação, presença de urina, presença de fezes, deiscência da sutura, presença de exsudato na ferida cirúrgica, edema e dor à palpação (n = 14)..... 74

**Tabela 5 -** Frequência observada no quarto, quinto e sexto dia de pós-operatório após implantação de guias de crescimento na calvária de coelhos, segundo os seguintes parâmetros avaliados: ingestão de alimento, ingestão de água, apatia, movimentação, presença de urina, presença de fezes, deiscência da sutura, presença de exsudato na ferida cirúrgica, edema e dor à palpação (n = 14)..... 75

**Tabela 6 -** Resultados médios obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), preenchimento de lacunas osteocíticas (PLO), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo controle, após 60 dias de implante.. 77

**Tabela 7 -** Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de



fibras colágenas (DFC), preenchimento de lacunas osteocíticas (PLO), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo controle, após 90 dias de implante..... 79

**Tabela 8 -** Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), preenchimento de lacunas osteocíticas (PLO), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo Hidroxiapatita 100%, após 60 dias de implante..... 82

**Tabela 9 -** Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), preenchimento de lacunas osteocíticas (PLO), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo Hidroxiapatita 100%, após 90 dias de implante..... 85

**Tabela 10 -** Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), preenchimento de lacunas osteocíticas (PLO), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo

secundário (OS) do grupo Hidroxiapatita 99% + Magnésio 1%, após 60 dias de implante..... 88

**Tabela 11 -** Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), preenchimento de lacunas osteocíticas (PLO), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo Hidroxiapatita 99% + Magnésio 1% após 90 dias de implante..... 91

**Tabela 12 -** Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), preenchimento de lacunas osteocíticas (PLO), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo Hidroxiapatita 95% + Alumina 5%, após 60 dias de implante..... 93

**Tabela 13 -** Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), preenchimento de lacunas osteocíticas (PLO), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo Hidroxiapatita 95% + Alumina 5%, após 90 dias..... 95

**Tabela 14 -** Resultados médios por grupo, aos 60 dias após a implantação, obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), preenchimento de lacunas osteocíticas (PLO), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS). Quadro representativo por cruzes, onde 0 seria a ausência e 4 cruzes a presença muito acentuada..... 97

**Tabela 15 -** Resultados médios por grupo, aos 90 dias após a implantação, obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), preenchimento de lacunas osteocíticas (PLO), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS). Quadro representativo por cruzes, onde 0 seria a ausência e 4 cruzes a presença muito acentuada..... 98



## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{m}$	Micrômetro
HA	Hidroxiapatita
Al	Alumina
Mg	Magnésio
$\text{Al}_2\text{O}_3$	Óxido de Alumínio
MgO	Óxido de Magnésio
Ca	Cálcio
MEV	Microscopia Eletrônica por Varredura
CAM	Concentração alveolar mínima
G	Gaugi
V%	Volume porcento
mcg	Microgramas
H&E	Hematoxilina e Eosina
Kv	Quilovolt



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>39</b>
2.1	TECIDO ÓSSEO.....	39
<b>2.1.1</b>	<b>Enxertos ósseos.....</b>	<b>40</b>
2.2	BIOMATERIAIS.....	41
<b>2.2.1</b>	<b>Biocimentos.....</b>	<b>44</b>
2.2.1.1	Biocimento de Hidroxiapatita e composições Bifásicas.....	45
2.3	CRESCIMENTO ÓSSEO GUIADO.....	48
2.4	UNIDADE EXPERIMENTAL.....	50
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>53</b>
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	53
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
4.1	APRESENTAÇÃO DOS BIOMATERIAIS....	55
4.2	ANIMAIS.....	56
4.3	PREPARO PRÉ-OPERATÓRIO.....	57

4.4	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	58
4.5	PÓS-OPERATORIO.....	63
<b>4.5.1</b>	<b>Avaliação Clínica.....</b>	<b>64</b>
4.6	EUTANÁSIA E COLETA DE MATERIAL...	65
<b>4.6.1</b>	<b>Avaliação histológica.....</b>	<b>67</b>
<b>4.6.2</b>	<b>Avaliação através de Microscopia Eletrônica por Varredura.....</b>	<b>69</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>73</b>
5.1	AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	73
5.2	RESULTADOS HISTOLÓGICOS E ATRAVÉS DE MEV.....	75
<b>5.2.1</b>	<b>Controle.....</b>	<b>76</b>
5.2.1.1	60 Dias.....	76
5.2.1.2	90 dias.....	78
<b>5.2.2</b>	<b>Hidroxiapatita.....</b>	<b>80</b>
5.2.2.1	60 Dias.....	80
5.2.2.2	90 Dias.....	83
<b>5.2.3</b>	<b>Hidroxiapatita 99% + Magnésio 1%.....</b>	<b>86</b>
5.2.3.1	60 Dias.....	86



5.2.3.2	90 Dias.....	89
<b>5.2.4</b>	<b>Hidroxiapatita 95% + Alumina 5%.....</b>	<b>92</b>
5.2.4.1	60 Dias.....	92
5.2.4.2	90 Dias.....	94
<b>5.3</b>	<b>RESULTADOS COMPARATIVOS.....</b>	<b>96</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>101</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>115</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>117</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo possui alta capacidade de reparação espontânea quando lesionado, repondo, após um variável intervalo de tempo, parte ou toda a porção perdida. No entanto, em alguns casos de defeitos ósseos extensos, que não têm a capacidade de se repararem espontaneamente, há a necessidade de se utilizar diversas técnicas cirúrgicas na tentativa de maximizar a reparação da deficiência óssea (FUCHS, 2008). A reconstrução destas lesões amplas em tecidos duros sempre foi um dos grandes desafios para a ciência, tendo sido utilizados para tal o osso autógeno, homogêneo, liofilizado e desmineralizado, como também materiais artificiais ou sintéticos (LAUREANO et al., 2007).

O enxerto ósseo ideal deve ser osseoindutor, ou seja, ter a capacidade de indução de nova formação óssea e osseocondutor, capacidade esta que proporciona um suporte temporário para estabelecer ótimas condições para o crescimento interno dos vasos sanguíneos e células com potencial osteogênico (PRIPATNANONT et al., 2007).

Do ponto de vista ósseo, a melhor opção para tratar as falhas ósseas é o enxerto autólogo (do próprio animal), uma vez que acelera a reparação, com menor risco de rejeição, sequestro ósseo e infecção, quando comparado a enxertos alógenos (mesma espécie) e xenógenos (espécie diferente) (GUASTALDI, 2003), no entanto, há o inconveniente de aumentar a morbidade, a dor, os tempos anestésico e cirúrgico e de lesar estruturas fisiológicas, além de poder não fornecer volume suficiente para reparar grandes falhas ósseas. Outra opção para a reparação das falhas ósseas é o uso de biomateriais, apresentando excelentes resultados (MELO et al., 1998; ALIEVI et al., 2007).

Entende-se por biomaterial, toda substância ou combinação de substâncias que não sejam fármacos, de origem natural ou sintética, que podem ser usadas durante qualquer

período de tempo, como parte ou como um todo, em sistemas que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo (FRANCZAK, 2014). As biocerâmicas (incluindo os vidros e vitro-cerâmicas) englobam uma gama enorme de composições não-metálicas/inorgânicas, com aplicações biomédicas e odontológicas. As cerâmicas de fosfato de cálcio apresentam-se hoje como os principais biomateriais estudados e empregados para a reposição e reparação do tecido ósseo, pois apresentam como principais características: semelhança com a fase mineral de ossos e excelente biocompatibilidade, bioatividade, ausência de toxicidade, taxas de degradação variáveis e osseocondutividade (GUASTALDI & APARECIDA, 2010).

A cerâmica de fosfato de cálcio mais difundida é a hidroxiapatita (HA), cuja estrutura química é representada pela fórmula  $C_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  (LEGEROS, 2002). Tal cerâmica geralmente é encontrada na forma de blocos ou de grânulos (densos ou porosos). O formato pré-determinado dos blocos dificulta a sua adequação ao local de implante, assim como o material granulado apresenta risco de migração, podendo alcançar os tecidos moles e provocar reações adversas e até mesmo a perda do material (DRIESENS et al., 1997). Estas desvantagens estão ausentes em biomateriais que possuem composição similar às cerâmicas de fosfato de cálcio (possuindo assim biocompatibilidade, bioatividade e osseocondutividade) e que podem ser moldados nas formas e dimensões do defeito ósseo, como no caso dos biocimentos (CARRODEGUAS et al., 1999; ALONSO, 2011).

Os cimentos ósseos são constituídos de uma parte sólida e uma líquida, que pode ser água ou uma solução, que formam uma pasta ao serem misturadas, perdendo sua plasticidade com o tempo e ganhando resistência mecânica, progressivamente (ALONSO, 2011). Alguns requisitos são básicos para o cimento ósseo, destacando-se a adesão e endurecimento in vivo em tempo satisfatório, a resistência

mecânica apropriada durante o período requerido, o pH próximo da faixa de neutralidade (6,5-8,5) durante e após a adesão para evitar os efeitos citotóxicos, a fácil manipulação, a moldabilidade, a ausência de toxicidade, a adesão ao tecido ósseo e a ausência de características alergênicas e cancerígenas (LEMAITRE et al., 1992; DRIESENS et al., 1997).

Diversas formulações de cimentos ósseos já foram propostas apresentando variações quanto a resultados e solubilidade, sem que fosse encontrada a formulação ideal (BOHNER, 2000). Os cimentos à base de fosfato de cálcio são as formulações mais difundidas e utilizadas, porém apresentam o inconveniente de induzirem uma remodelação lenta e mesmo imperfeita em defeitos ósseos maiores (DRIESENS et al., 1998), o que torna necessário novos estudos visando corrigir tais falhas.

Em seu estudo, Sencimen (2007) sugere que a elevação do periósteo e a criação de um espaço sobre a superfície óssea induz a formação de osso novo. No entanto, a invasão do espaço criado com tecido mole altamente competitivo não osteogênico e má qualidade do osso recém-formado são os principais inconvenientes desta técnica. Por este motivo, tem-se utilizado um novo conceito, onde se alia a técnica de crescimento guiado com o uso de biomateriais. Na técnica de crescimento ósseo guiado, é necessário o uso de dispositivos rígidos e impermeáveis para estabilizar o biomaterial e promover o isolamento completo de tecidos adjacentes (BUSENLECHNER, 2008). No aumento ósseo guiado, apenas a face inferior do dispositivo fica em contato com o tecido ósseo, que é a única interface entre o biomaterial e o organismo receptor (YAMADA, 2012). Este método é ainda pouco utilizado em estudos comparativos de formação óssea com biomateriais, mas apresenta vantagens como baixa morbidade e forte semelhança a situações clínicas (LEVANDOWSKI, 2009).

A pesquisa com animais tem contribuído grandemente para a compreensão do vários processos fisiológicos e patológicos que afetam humanos. Neste contexto, os coelhos apresentam muitas vantagens para sua utilização em pesquisas, são alguns exemplos: facilidade de manusear e observar; permite trabalhar com um grande número de indivíduos; têm ciclos vitais curtos; padronização genética e grande quantidade de informações de base disponíveis (CALASANS-MAIA et al., 2009). O coelho como unidade experimental apresenta composição, remodelação e densidade óssea semelhante à encontrada na espécie humana, sendo usado frequentemente em pesquisas ortopédicas e craniomaxilofaciais (PEARCE et al, 2007).

A maioria dos biomateriais utilizados no Brasil, tanto para uso na medicina veterinária, quanto na odontologia e medicina são oriundos de outros países, encarecendo o tratamento e inviabilizando-o muitas vezes. Desta forma, buscase o desenvolvimento científico e tecnológico brasileiro nesta área a fim de reduzir o custo dos materiais envolvidos. Além disso, o objetivo principal da utilização de biomateriais é melhorar a saúde animal e humana, restaurando tecidos vivos do corpo que perderam as suas funções. Portanto, é importante conhecer as propriedades dos biomateriais e sua influência no comportamento interativo entre o biomaterial e o meio biológico (FRANCZAK, 2014).

No presente estudo, buscou-se avaliar o potencial osseocondutor e osseoindutor de três formulações de biocimentos, ao serem aplicadas sem a confecção de defeito ósseo, na calvária de coelhos. Para tal, utilizou-se guias de crescimento impermeáveis, visando criar um ambiente ideal de crescimento ósseo exoesquelético sem interferência do qualquer meio biológico externo além da interface biocimento-calvária.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 TECIDO ÓSSEO

O osso é um dos tecidos mais resistentes e rígidos encontrado nos vertebrados, composto metabolicamente por células ativas que estão integradas em uma estrutura sólida. Após sofrer algum trauma, apresenta grande potencial de regeneração de forma e função (ROBBINS et al, 2005). É um tipo de tecido conjuntivo especializado, formado por matriz óssea, células e membranas conjuntivas. A matriz óssea é composta de uma porção inorgânica, formada por íons fosfato, cálcio, magnésio, potássio, sódio, citratos e bicarbonato, e porção orgânica, formada por fibras colágenas (95%) e por pequena quantidade de substância fundamental amorfa (LEGEROS, 2002).

O tamanho, formato e a força dos ossos são determinados por células ósseas efetoras das linhagens osteoblásticas e osteoclásticas. Os osteoblastos são células ramificadas e jovens, com intensa atividade osseoprogenitora. São oriundos de células mesenquimais da medula óssea e são responsáveis pela síntese e deposição de material proteico e mineral à matriz óssea (BREW, 2003). Os osteócitos são células não proliferativas, diferenciadas, que estão no final da linhagem osteoblástica. Estas células residem tanto na matriz mineral óssea quanto em um osteóide neoformado, permanecendo presos em pequenas lacunas na porção rígida do osso (NOBLE et al, 2008). Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas com 50 a 100µm de diâmetro, derivados de células da linhagem hematopoiética. Sua origem se dá através dos monócitos e macrófagos e são responsáveis por reconhecer, degradar e reabsorver a matriz óssea. A atividade osteoclástica é, em geral, maior que a osteoblástica, no tocante ao equilíbrio entre a formação e reabsorção óssea que ocorrem

de forma conjugada e determina a massa esquelética (ROBBINS et al, 2005).

A matriz óssea mineralizada é coberta por duas membranas não calcificadas de natureza conjuntiva, que possibilitam uma gradual relação entre um tecido mineralizado e o restante do organismo. O perióstio, mais externamente, é constituído de fibras colágenas e fibroblastos, e, na sua região mais interna, além de uma camada de células de revestimento potencialmente osteogênica, possui células indiferenciadas (KATCHBURIAN et al, 2004).

Doenças e lesões ósseas são condições comuns que afetam diretamente a qualidade de vida, sendo diversos os processos que podem resultar na perda de tecido ou na dificuldade de sua reparação (KOKUBO et al, 2003). Em condições favoráveis, a neoformação óssea se dá através, inicialmente, da deposição de uma matriz intracelular de colágeno e polissacarídeos que se impregnam de sais de cálcio, formando o osso primário, que gradualmente se transforma em osso maduro com estrutura lamelar típica, denominado osso secundário (CROCI et al, 2003). Em grandes defeitos ósseos ou doenças que levem a esta condição, pode ocorrer a falha neste processo natural, podendo acarretar na união retardada ou a não união óssea (MORAES, 2006).

Buscando alternativas para reparação óssea e mesmo auxílio na velocidade de consolidação, vem-se estudando substitutos ósseos, naturais ou sintéticos, autógenos ou não, que quando aplicados no ambiente biológico levam aos objetivos citados (LAUREANO FILHO et al, 2007).

### **2.1.1 Enxertos ósseos**

Há situações em que a capacidade de reparo ósseo natural é limitada pelo tamanho da perda óssea, como aquelas causadas por traumas, patologias ou consequência de procedimentos cirúrgicos diversos. Nestes casos, o defeito



ósseo torna-se crítico à reparação espontânea, onde se faz necessário o uso de enxertos para um correto tratamento e bom prognóstico (CARNEIRO et al., 2005). Com relação à sua origem, os enxertos podem ser classificados basicamente como: autógenos, alógenos, xenógenos e aloplásticos (MURUGAN et al, 2005).

Dentre os materiais biológicos, os enxertos de origem autógena (do mesmo indivíduo) são os que apresentam melhor previsibilidade por possuírem propriedades osteogênicas, osseocondutoras e osseoindutoras, além de ausência de rejeição, por ser proveniente do próprio organismo receptor (DALAPICULA et al., 2006). 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, são vistos com alguma resistência por parte dos pacientes e por isso tiveram sua indicação redimensionada (LYNCH et al., 1999).

Os enxertos alógenos (retirados de outro indivíduo da mesma espécie) e também os xenógenos (retirados de uma espécie diferente do receptor) são utilizados na tentativa de estimular a formação óssea em defeitos ósseos eliminando a agressão cirúrgica adicional associada ao uso de enxertos autógenos. No entanto, o uso de aloenxertos e xenoenxertos envolve certo risco com relação à antigenicidade, que pode levar a rejeição do material por parte do organismo receptor (LINDHE et al., 2005; PRECHEUR, 2007). Como alternativa aos citados enxertos, tem-se o uso de biomateriais sintéticos (enxerto aloplástico).

## 2.2 BIOMATERIAIS

A utilização de diversos biomateriais, sintéticos ou naturais, para reparar ou substituir órgãos ou partes dos sistemas do corpo humano tem crescido muito nos últimos anos, graças ao desenvolvimento de novas tecnologias e uma

melhor compreensão dos mecanismos de interação desses implantes com os tecidos biológicos (FRANCZAC, 2014).

Os biomateriais correspondem aos enxertos aloplásticos e podem ser classificados ou subdivididos conforme sua origem (natural ou sintética), sua composição química (metálicos, cerâmicos, poliméricos ou compósitos) e comportamento fisiológico (OLIVEIRA et al., 2009; TEIXEIRA, 2009).

Biomateriais de origem natural são aqueles em que a matéria prima para produção provém de um organismo vivo (queratina, colágeno...) e biomateriais sintéticos tem sua base obtida de elementos encontrados na natureza e manufaturados (polímeros sintéticos, metais) (FRANCKAC, 2014).

Em relação ao comportamento em meio biológico, os biomateriais podem ser classificados como biotoleráveis (onde os materiais são tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes por meio da formação de camada envoltória de tecido fibroso), bioinertes (onde o material também é tolerado pelo organismo, mas a formação de envoltório fibroso é mínima, praticamente inexistente) e bioativos (quando induzem uma reação biológica resultando na formação de osso entre o tecido e o implante por meio de uma ligação química) (GOUVEIA, 2008).

Em relação à estrutura química, os biomateriais estão divididos em (CUNHA, 2012):

- Metais e ligas metálicas: Resistente à corrosão, boa resistência mecânica, além de alta resistência à fadiga, à tração e à fratura;
- Cerâmicos: sintéticos ou naturais, não metálicos, duros, frágeis, com alto ponto de fusão;
- Poliméricos: São macromoléculas formadas da união de várias unidades fundamentais, que repetidamente dão origem a longas cadeias (possuem baixa densidade e são biodegradáveis);

- Compósitos: São sólidos que possuem dois ou mais componentes;
- Naturais: enxertos de origem animal (enxertos autógeno, alógeno e xenógeno).

Com intuito de suprir as limitações consequentes ao uso de enxerto autógeno e/ou de bancos de osso (alógeno ou xenógeno), os biomateriais vêm sendo utilizados com perspectiva de uma reconstituição do tecido ósseo, seja no reforço de uma estrutura ou preenchimento de um defeito, tanto em cirurgia ortopédica, traumatológica e buco-maxilo-facial (SANCHES et al, 2010).

Os biomateriais utilizados como substitutos do tecido ósseo devem possuir características peculiares como ter capacidade osteogênica, ser osseoindutor e osseocondutor. São classificados como osteogênicos quando são capazes de promover a formação óssea por carregarem consigo células ósseas; osseoindutores quando são capazes de induzir a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos com possibilidade de formação óssea ectópica e osseocondutores quando sua estrutura serve de arcabouço ou substrato estrutural favorável para a migração celular e deposição óssea oriunda das imediações, desta forma, o biomaterial pode ser gradativamente reabsorvido e simultaneamente substituído por novo tecido ósseo (NOVAES JR. et al, 2000, URIST et al, 2002). De forma geral, os biomateriais devem proporcionar a condução de osteoblastos ou de células precursoras de osteoblastos para o sítio lesado e de fatores regulatórios que promovam esse recrutamento, assim como o crescimento celular neste sítio (LIU et al, 2004; CHEN et al., 2009).

Segundo Carvalho et al. (2004), os biomateriais utilizados como substituto ósseos devem ainda possuir as seguintes propriedades: não induzir à formação de trombos como resultado do contato entre o sangue e o biomaterial; não induzir resposta imunológica adversa; não ser tóxico; não ser

carcinogênico; não perturbar o fluxo sanguíneo e não produzir resposta inflamatória aguda ou crônica que impeça a diferenciação própria dos tecidos adjacentes.

Atualmente, as biocerâmicas de fosfato de cálcio são os principais materiais pesquisados e utilizados na formulação de biomateriais empregados em casos clínicos onde há a necessidade de neoformação óssea. E isso é justificado pelo fato dos fosfatos de cálcio possuírem características mineralógicas semelhantes à estrutura dental e tecidos ósseos, além disso, são materiais que apresentam excelente biocompatibilidade, bioatividade e variadas taxas de dissolução e adsorção, que são condições propícias aos processos de osseoindução e osseointegração (FRANCZAK, 2016).

### **2.2.1 Biocimentos**

Os biocimentos são biomateriais formados pela mistura de pós de fosfatos de cálcio em meio líquido. Essa mistura fornece uma pasta que endurece espontaneamente a temperatura ambiente ou corpórea, de forma que um ou mais constituintes do biocimento são dissolvidos e precipitados, resultando em um ou mais tipos de fosfatos de cálcio, como brushita, hidroxiapatita, hidroxiapatita deficiente em cálcio e fosfatos de cálcio amorfos. As composições bifásicas com uma segunda fase nanométrica na matriz de hidroxiapatita podem melhorar as características de pega e hidratação do biocimento (FRANCZAK, 2014).

Segundo sua origem, os biocimentos podem ser sintéticos ou naturais modificados, elaborados dentro de sistemas controlados. Sua maior vantagem em relação às cerâmicas convencionais é a capacidade de adaptação ao defeito ósseo à corrigir, podendo ser moldados ou injetados através de vias minimamente invasivas, além de poder carrear medicamentos (BOHNER, 2000).

A consolidação dos biocimentos se dá através de duas etapas chamadas de pega e endurecimento. Inicialmente, quando misturados com líquido, é formada uma pasta plástica que perde plasticidade com o tempo e vai aumentando sua resistência mecânica, de tal maneira que se moldado ou novamente misturado com líquido a plasticidade é reestabelecida. No segundo estágio tem lugar a consolidação, geralmente acompanhada da perda da permeabilidade a líquidos, onde o valor máximo de resistência é alcançado (DOS SANTOS, 2011). O processo de solidificação ocorre devido à reação de dissolução-precipitação, onde há o crescimento e entrelaçamento dos cristais, elevando a resistência mecânica progressivamente em função do tempo, tendo como resultado um corpo sólido único formado por uma ou mais fases (MESTRES & GINEBRA, 2011).

Os biocimentos obtidos a partir da composição Ca/P vêm sendo estudados e desenvolvidos desde 1983. Estes se destacam por apresentarem boa biocompatibilidade, pela facilidade de moldagem durante o processo cirúrgico e também pela capacidade de regeneração e reconstituição óssea após sua implantação. Favorecendo a osseointegração e osteoindução, transformam-se em novo osso pela atividade celular dos osteoclastos e osteoblastos que são responsáveis pela remodelação do osso local. Em razão destas características, os biocimentos são promissores em aplicações cirúrgicas ortopédicas e odontológicas (KHAIRON et al, 1999; LIU et al, 2003; KUMTA et al, 2005).

### 2.2.1.1 Biocimento de Hidroxiapatita e Composições Bifásicas

O grupo de biomateriais que mais se assemelham à composição do osso é o das cerâmicas de fosfato de cálcio, dentre as quais a mais difundida é a hidroxiapatita (AMINZARE, 2013).

Os biocimentos de hidroxiapatita obtidos pela mistura de fosfato de cálcio e fosfato dicálcico em uma solução aquosa, reagem para formar cristais microporosos de uma hidroxiapatita deficiente de cálcio, estes apresentam elevada área de superfície e finos grãos, estas características conduzem a uma melhor reatividade e hidratação do biocimento (BOHNER, 2005). A estrutura porosa da HA funciona como suporte passivo à neoformação vascular, o que leva à proliferação de fatores indutores da aposição óssea (VITAL et al, 2006).

Apesar das pesquisas para melhorar as propriedades mecânicas da HA (modificando-se os parâmetros de processamento), os resultados ainda não são satisfatórios, por possuírem ligações fracas e serem biomateriais frágeis (SUCHANEK et al, 1998). A nova tendência na melhoria das características mecânicas da hidroxiapatita deslocou-se para o desenvolvimento de biomateriais bifásicos (CAMARGO et al, 2007; CORRÊA et al, 2013).

As composições de biocimentos bifásicos são formadas pela mistura de duas fases físicas cristalinas ou amorfas diferentes, que formam um biocimento bifásico ou também chamado de híbrido (SOARES et al, 2006; CAMARGO et al, 2007). Diferentes autores observaram nas composições bifásicas de fosfatos de cálcio, quando aplicadas *in vivo* ou em meio simulado, uma deposição de cristais de apatita óssea na superfície dos grãos e microporos, o que está associado às melhores capacidades de solubilidade que estes materiais apresentam (DACULSI et al, 1998).

Em comparação com os fosfatos de cálcio microestruturados, as biocerâmicas com micro e nanoestruturas interconectadas, oferecem melhores condições de adesão e proliferação celular, devido às suas mais altas especificidades de superfície, porosidade em micro e nano escala e topografia de superfície mais favorável. Estas vantagens estruturais demonstram melhor bioatividade, solubilidade e

biodegradabilidade destes biomateriais quando aplicados in vivo e/ou em meio simulado (HONG et al. 2010).

A utilização de uma matriz (HA) somada a uma segunda fase do tipo alumina- $\alpha$  e/ou Magnésio nanométrica na elaboração de biomateriais bifásicos visa proporcionar uma estabilidade mecânica da fase hidroxiapatita e melhorar a bioatividade mantendo a sua biocompatibilidade (EPURE, 2007). Portanto, um sistema composto de dois componentes pode oferecer novas características microestruturais, nanoestruturais e área superficial de grãos e de microporos promissoras a molhabilidade e capilaridade. Estas características contribuem com a bioatividade e osseocondutividade do biomaterial. Outra contribuição favorável com a presença da segunda fase em posição inter-intragranular na matriz hidroxiapatita são as propriedades mecânicas que podem ser melhoradas (KNEPPER, 1998).

O termo alumina engloba a família de mais de 25 politipos entre óxidos hidratados, cristalinos e amorfos. A alumina- $\alpha$  foi a primeira biocerâmica amplamente usada na área clínica. A estabilidade química, resistências à corrosão e ao desgaste garantem sua grande aplicabilidade biomédica. Alumina- $\alpha$  pode ser produzida a partir de precursores de aluminas variados como hidróxido de alumina, boemita, sulfato de alumina, e alumina alcoóxido, através de diferentes métodos de sínteses, que posteriormente por tratamento térmico se produz nanopartículas de alumina- $\alpha$  cristalina (PASSONI, 2010). Um ponto de destaque desta biocerâmica está associado a sua biocompatibilidade e elevada resistência mecânica (HENCH, 1991). A incorporação de nanopartículas de alumina- $\alpha$  numa matriz cerâmica de hidroxiapatita pode melhorar as características de propriedade mecânicas, da microestrutura da matriz cerâmica, que isoladamente é sabidamente frágil (BELLINI, 2007).

Entre os diferentes íons utilizados nestas composições, o magnésio é de especial importância, por ser o quarto cátion

mais abundante no corpo, segundo no meio intracelular e o mais abundante em cartilagem e tecido ósseo durante as fases iniciais da osteogênese (TAVARES, 2013). É conhecido por seu efeito significativo em processos de mineralização e tem grande importância nas fases iniciais deste processo, atuando sobre células ósseas e estimulando a proliferação de osteoblastos. Kalita (2007) descreve que a HA sintética não possui a mesma velocidade de reparação óssea que a HA natural devido ao fato de não possuir os íons naturalmente presente em organismos vivos e que a incorporação destes na matriz mineral auxiliariam na sua bioatividade, velocidade de degradação osteoclástica e mineralização.

A adição de Mg à estrutura hexagonal da HA, por meio da substituição parcial dos íons de cálcio por magnésio, favorece a diminuição da cristalinidade da HA e, conseqüentemente, aumenta a dissolução desta cerâmica. A substituição do Ca pelo Mg tem despertado grande interesse científico e clínico, uma vez que as cerâmicas bifásicas mostraram-se, *in vitro*, biocompatíveis e não apresentaram toxicidade (BERTINETTI, 2006; YAMAMOTO, 2006), tornando esses novos biomateriais promissores para a regeneração óssea.

### 2.3 CRESCIMENTO ÓSSEO GUIADO

Existem diversas metodologias utilizadas para realização de estudos e análises comparativas de biomateriais *in vivo* (crescimento ósseo ectópico, preenchimento de defeito intraósseo, preenchimento de defeitos de tamanho crítico e crescimento ósseo guiado). Constata-se na literatura que cada método possui suas características próprias, o que leva ao fornecimento de respostas diferentes e/ou específicas do comportamento e desempenho do biomaterial (LEVANDOSKI, 2014)



Em estudos de crescimento ósseo ectópico, fosfatos de cálcio são implantados em regiões desprovidas de osso, como o tecido muscular, visando analisar o potencial de osseoindução dos biomateriais (RIPAMONTI, 2008).

O estudo de preenchimento de defeito intraósseo (não críticos) é um método usual para testes comparativos *in vivo*. Este método é útil para avaliar a atividade de diferentes biomateriais no processo de formação óssea. Entretanto, o método é muito discutido na literatura, pois os estudos indicam que este tipo de defeito pode apresentar a capacidade de reparação espontânea, sendo que por muitas vezes o coágulo sanguíneo (controle), apresenta maior velocidade de reparação que os biomateriais testados (JENSEN, 2009; REICHERT 2009), além disso, ocorreria interferência do meio biológico nos materiais de teste.

Os estudos utilizando defeitos de tamanho crítico (o menor defeito intraósseo que não apresente capacidade total de reparação durante o tempo de vida do animal) são bastante utilizados para comparação de biomateriais (YOUNG, 2008), porém, seu grande inconveniente é que variações de espécie, idade, sexo, peso, localização anatômica, tipo de carga empregada, vão influenciar no tamanho do defeito crítico, podendo este ser super ou subestimado (REICHERT, 2009).

O objetivo do crescimento ósseo guiado é criar novo osso em um local em que não havia tecido ósseo previamente (crescimento ósseo exoesqueletal) (SCHMID et al, 1994). Para realização de estudos de aumento ósseo guiado é necessário o uso de dispositivos rígidos e impermeáveis para estabilizar o biomaterial e promover o isolamento completo de tecidos adjacentes, visando isolar o biomaterial de qualquer tecido não osteogênico que pudesse vir a interferir no neocrescimento ósseo (BUSENLECHNER et al, 2008).

Os princípios básicos para a regeneração óssea guiada são: exclusão dos tecidos e células indesejáveis ao estudo, criação e manutenção do espaço, proteção do coágulo

sanguíneo e estabilização dos materiais testados (LINDHE et al., 2005).

A técnica supracitada permite avaliação do comportamento da neoformação óssea dentro de um sistema fechado havendo somente uma superfície de contato com o tecido ósseo receptor. Este método foi utilizado por diferentes autores (LUNDGREN et al, 1998; SCHMID et al, 1994; BUSENLECHNER et al, 2008; LEVANDOWSKI-JR 2009), apresentando resultados promissores, pois permite a avaliação do biomaterial sem qualquer tipo de interferência que possa mascarar ou influenciar os resultados.

Levandowski (2014), baseado na análise de estudos de outros autores utilizando biomateriais alocados em defeito crítico, utilizando implantação ectópica, preenchimento de defeito intraósseo e uso de sistema guiado descreve que, quando se deseja efetuar um estudo comparativo entre diferentes biomateriais, a técnica de crescimento ósseo guiado apresenta melhores resultados.

Frente ao exposto, neste trabalho optou-se por utilizar guias de crescimento ósseo, confeccionadas em poliamida (material inerte), para criar um ambiente ideal para que cada variável de biocimento implantado pudesse expressar sua real qualidade em relação à osseoindução e osseocondução. Os resultados encontrados poderão ser utilizados posteriormente visando a aplicação biomédica do biocimento testado, quer como preenchimento em cirurgias craniomaxilofaciais quanto como reforço e promotor osteogênico em cirurgias ortopédicas.

## 2.4 UNIDADE EXPERIMENTAL

A utilização de animais em pesquisa biomédica tem sido recomendada para aperfeiçoar e validar procedimentos existentes, desenvolver novos materiais e compreender os diversos processos fisiológico e patológico (CALASANS-MAIA, 2009).

Entre os pequenos animais, os coelhos são comumente utilizados para pesquisa médica. O coelho oferece várias vantagens, incluindo a facilidade de manuseio, alta taxa de rotatividade óssea e o fato de que ele atinge a maturidade dentro de 6 meses, além de fornecer um adequado modelo ósseo para experiências relacionadas a enxertia de materiais e avaliações de regeneração óssea (DELGADO-RUIZ, 2015).

O crânio encefálico ou calvária estende-se da cavidade supraorbital à protuberância occipital externa e é composta pelos ossos parietais, porção escamosa dos temporais e do occipital, escama do frontal e asa maior do esfenoide. Esses ossos apresentam pobre suprimento sanguíneo e deficiência relativa de osso medular, quando comparado à ossos longos (PROLO et al, 1982).

A região da calvária em animais maduros permite a avaliação de vários materiais ao mesmo tempo, o que diminui o risco de erros de observação resultantes das diferenças individuais entre animais (PRIPATNANONT et al. 2007). Além do exposto, a região está sujeita a pequenas forças mecânicas, condição necessária para a utilização de cimentos ósseos a base de fosfatos de cálcio (DORNAS, 2013).

O estudo de crescimento ósseo utilizando guias de crescimento ósseo na calvária de coelhos foi realizado por diversos autores (LEVANDOWSKI, 2009; EZIRGANLI, 2013; LEVANDOWSKI, 2014), demonstrando ser de fácil execução e bem tolerado pelos animais. A região torna-se ideal para este tipo de estudo, pois permite facilmente a fixação das guias, visto que possui formato mais plano que se implantadas em ossos longos.

Devido as informações pesquisadas e encontradas na literatura, se optou pelo uso do coelho como modelo experimental, utilizando a calvária como ponto de fixação para as 4 guias de crescimento preenchidas com diferentes biocimentos, utilizados neste estudo.



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVOS GERAIS**

Avaliar o potencial de osseoindução, osseocondução e ausência de rejeição de biocimentos micronanoestruturados formados por Hidroxiapatita (HA) a 100%, Hidroxiapatita 95% + Alumina 5% (HA + Al), Hidroxiapatita 99% + Magnésio 1% (HA + Mg) e coágulo sanguíneo (grupo controle), quando aplicados na calvária de coelhos através de guias de crescimento, em diferentes tempos de pós-operatório.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar o comportamento e o potencial de diferentes formulações de biocimentos aplicados através de guias de crescimento em calvária de coelhos, em diferentes tempos de pós-operatório, utilizando análise histológica.

Avaliar o comportamento e o potencial de diferentes formulações de biocimentos aplicados através de guias de crescimento em calvária de coelhos, em diferentes tempos de pós-operatório, utilizando microscopia eletrônica por varredura (MEV).



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em experimentação animal – CETEA da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), segundo protocolo de número 01.72.14.

### 4.1 APRESENTAÇÃO DOS BIOMATERIAIS

Os biomateriais utilizados neste estudo foram produzidos, caracterizados e fornecidos pelo Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC, no Centro de Ciências Tecnológicas (CCT) – campus Joinville.

No presente estudo, os biomateriais foram utilizados na forma de biocimentos, obtidos à partir de pós nanoestruturados sinterizados à temperatura de 1300°C por 2 horas. Estes são formados pelas composições seguintes: Hidroxiapatita 100%, Hidroxiapatita 99% + MgO 1% e hidroxiapatita 95% + Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-α5%, conforme ilustrado na tabela 1.

Todos os biocimentos passaram por caracterização morfológica, cristalográfica e química. As investigações foram realizadas através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), difratometria de raios-X, análise do tamanho de partícula pelo método teórico de Scherrer e pelo método de difração a laser. A espectroscopia de infravermelho e a análise por fluorescência de raios X serviram de apoio na avaliação química. Todo o trabalho de síntese e caracterização pode ser consultado em Fraczak 2014, sendo este o trabalho que deu origem aos biocimentos utilizados neste estudo (o método de obtenção e caracterização não será descrito neste estudo).

**Tabela 1** – Biomateriais fornecidos pelo Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC-Joinville (CCT) e suas composições.

Biomaterial	Composição
Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
Hidroxiapatita 99% + Magnésio 1%	99% $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ + 1% MgO
Hidroxiapatita 95% + Alumina 5%	95% $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ + 5% $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-}\alpha$

Fonte: próprio autor

## 4.2 ANIMAIS

Para o presente estudo, a amostra foi composta por 14 coelhos machos da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), com idade de aproximadamente 6 meses e massa corporal média de  $3,28 \pm 0,44$  Kg, oriundos do colégio agrícola Caetano Costa, localizado na cidade de São José do Cerrito, Santa Catarina.

Todas as unidades experimentais passaram por exame físico, onde se aferiu temperatura corporal, frequência cardíaca e frequência respiratória, além da palpação de linfonodos e realização de exame visual dos membros visando excluir a presença de pododermatites. Os animais foram contidos manualmente para a coleta de sangue venoso, através da veia auricular marginal, para realização de hemograma completo. Todos estes procedimentos foram adotados para que se pudesse confirmar a higidez dos animais.

Os coelhos foram acondicionados em gaiolas individuais específicas para a espécie, confeccionadas em malha galvanizada (figura 1), suspensas 0,8m do chão e atapetadas com maravalha de pinus. Cada gaiola foi identificada conforme o número do animal e o peso. Os mesmos receberam água *ad libitum* e ração peletizada



comercial específica para coelhos, administrada duas vezes ao dia.

**Figura 1** - Coelho da raça Nova Zelândia acondicionado em gaiola galvanizada específica para a espécie, em período de ambientação (30dias).



Fonte: Próprio autor.

Após recebidos e alocados no Hospital Veterinário do Centro de Ciências Agroveterinárias - CAV/UEDESC em Lages, SC, todos os animais foram everminados, utilizando ivermectina na dose de 0,4mg/Kg, por via subcutânea e passaram por um período de 30 dias de ambientação.

#### 4.3 PREPARO PRÉ-OPERATÓRIO

Previamente ao ensaio cirúrgico, os animais permaneceram em jejum alimentar e hídrico de 12 e 6 horas, respectivamente.

A medicação pré-anestésica foi composta pela associação de cetamina (15 mg/kg), midazolam (2 mg/kg) e morfina (2mg/Kg), administrada por via intramuscular, 15 minutos antes da indução, onde o animal permanecia em ambiente calmo e escuro para que houvesse adequado efeito. Antes da indução anestésica, realizada com o uso de propofol 6mg/Kg ou 4,4V% de isoflurano, os mesmos passaram por

tricotomia de toda a região craniana e orelhas. Após, foram submetidos à canulação da artéria auricular e veia auricular com cateter venoso periférico de calibre 22G, para aporte de fluidoterapia e demais fármacos. Na sequência, foram submetidos à anestesia geral inalatória com isoflurano 1 CAM diluído em oxigênio a 100% administrado via máscara laríngea ou mantidos sob anestesia total intravenosa com propofol na dose de 0,5mg/Kg/min (estudo paralelo).

Cerca de 15 minutos antes do procedimento cirúrgico, os animais receberam antibioticoterapia profilática à base de ceftriaxona, na dose de 40 mg/kg, por via intravenosa.

Os resgates analgésicos trans operatórios foram realizados com o uso de fentanil 5mcg/Kg pela via endovenosa, conforme necessidade. Na linha de incisão, foi realizada a anestesia local, através da infiltração de lidocaína, na dose de até 7mg/Kg.

#### 4.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico após estabilização dos parâmetros cardiorrespiratórios e confirmação de correto plano anestésico, garantindo ausência de resposta a estímulo doloroso.

Para o procedimento cirúrgico, cada coelho foi posicionado em decúbito esternal, sendo realizada a tricotomia de toda a região dorsal do crânio, desde as orelhas até o processo supraorbital rostral, com limite lateral sendo as pálpebras superiores. Na sequência, a cabeça do animal era posicionada em um suporte metálico em forma de calha, produzido pelo próprio grupo de pesquisa (figura 2), que tinha como finalidade promover melhor fixação da região craniana para diminuir sua oscilação, que poderia vir a interferir no posicionamento da sonda laríngea.

**Figura 2** - Unidade experimental com a região craniana apoiada e fixada com esparadrapos sobre o suporte metálico em forma de calha, preparação pré-operatória.

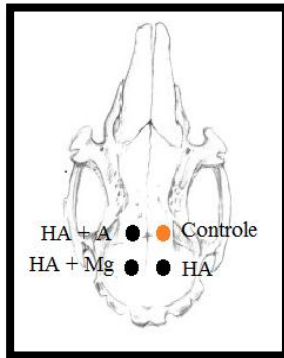


Fonte: Produção do próprio autor.

Cada composição de biocimento ou o controle possuíam um local fixo para a sua implantação, para que no momento da retirada da guia fosse possível identificar cada tratamento através da posição em que se encontrava alocado na calvária. No momento da cirurgia, um modelo idêntico ao da figura 3 era afixado próximo ao cirurgião para que o mesmo pudesse continuamente verificar a posição correta em que deveria implantar cada biocimento.

A antissepsia foi realizada à base de álcool e iodo, aplicados em toda a região craniana. Os panos de campo foram posicionados de forma a expor a região da calvária, até os limites tricotomizados.

**Figura 3** – Modelo utilizado para ilustrar a posição em que cada biomaterial deveria ser implantado, sempre da mesma forma, em todas as unidades experimentais.



Fonte: Produção do próprio autor.

Realizou-se incisão retilínea rostro-caudal com 4 cm de comprimento, sobre a crista sagital do crânio, desde a região interorbital até a região occipital. Após afastamento lateral da pele, o perióstio foi incisado com o mesmo comprimento e rebatido lateralmente com auxílio de elevador periosteal (Figura 4).

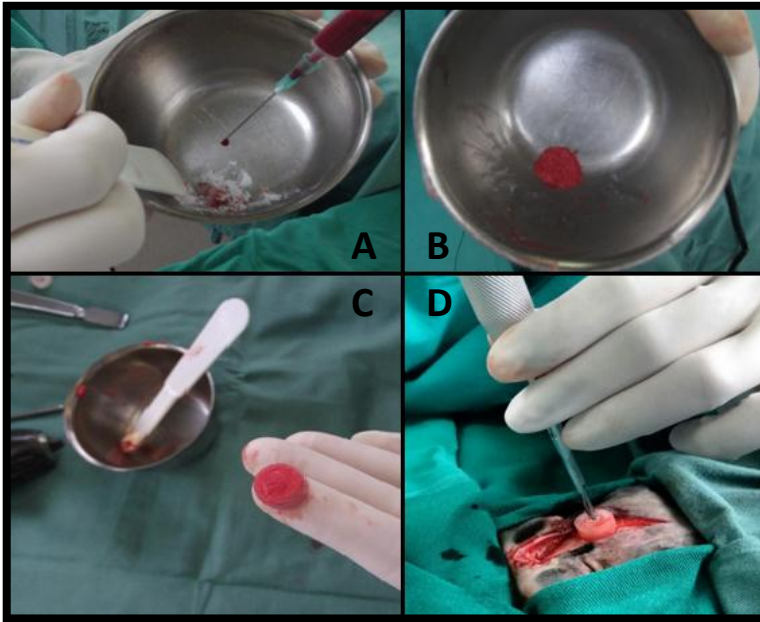
**Figura 4** – Rebatimento do perióstio com auxílio de elevador periosteal, após incisão de pele.



Fonte: Produção do próprio autor.

A região craniana foi dividida visualmente em quatro quadrantes, onde, em cada um, o crânio foi perfurado com profundidade de 1,5mm, utilizando-se furadeira e broca de 1,5mm de diâmetro. Na sequência, uma chave macho de tarracha de 2mm era introduzida no orifício para confecção do ponto de entrada do parafuso (rosca). Após, se preparava o biocimento, que ocorria da seguinte forma: no momento da cirurgia, cada biomaterial, inicialmente na forma de pó estéril, era misturado ao sangue do próprio animal (Figura 5A) até se atingir uma consistência pastosa (Figura 5B). Após o preparo de cada biocimento, uma guia cilíndrica de poliamida de 6mm de altura e 12mm de diâmetro era preenchida com uma das composições (Figura 5C) ou o coágulo sanguíneo para o grupo controle, sendo então fixada ao crânio do animal com um parafuso de aço inoxidável de 2mm de diâmetro e 8mm de comprimento (Figura 5D), sempre averiguando o local adequado para implante de cada variedade de biocimento ou controle e tomando-se o cuidado de não perfurar a calota craniana em sua espessura total.

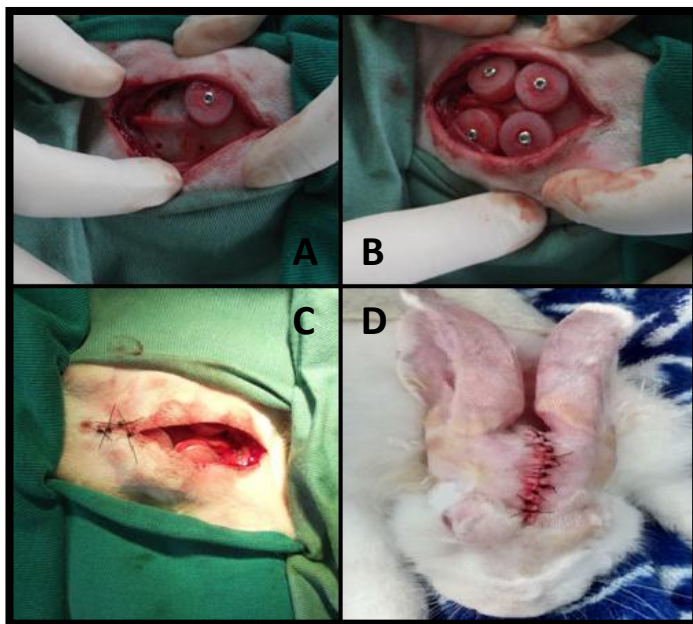
**Figura 5** - Observa-se a sequência de preparo do biocimento, onde inicialmente se mistura o pó com o sangue do próprio animal (A), até a obtenção de uma pasta cimentícia (B), para posterior preenchimento da guia de crescimento (C). Em D se observa a fixação da guia de crescimento à calvária do coelho, com uso de parafuso de aço inoxidável de 8mm de comprimento e 2mm de diâmetro:



Fonte: Produção do próprio autor.

Após a fixação das 4 guias de crescimento (Figuras 6A e 6B), a incisão cirúrgica era suturada utilizando-se fio mononylon agulhado de calibre 3-0, com pontos isolados simples, ocluindo totalmente a ferida cirúrgica (Figura 6C e 6D).

**Figura 6** - Observa-se o aspecto da calvária após fixação com parafuso de aço inoxidável de uma guia de crescimento (A) e posteriormente as quatro guias implantadas (B). A sutura ocorreu com pontos isolados simples e com o uso de mononylon de diâmetro 3-0 (C). Aspecto final da unidade experimental após a finalização da anestesia e cirurgia (D).



Fonte: Produção do próprio autor.

#### 4.5 PÓS OPERATÓRIO

No dia de cada procedimento cirúrgico e nos três dias seguintes, cada animal recebeu analgesia, administrada a cada 8 horas (Cloridrato de Tramadol, na dose de 7,5 mg/kg por via subcutânea). Empregou-se também o uso de antiinflamatório não esteroidal por 3 dias consecutivos, sendo utilizado o meloxicam, 0,2 mg/kg, por via subcutânea, uma vez ao dia e

dipirona 25mg/Kg, três vezes ao dia, também por via subcutânea. A Antibioticoterapia a base de ceftriaxona 40mg/Kg, aplicada por via subcutânea, a cada 12 horas, durante 5 dias, também foi utilizada. Os cuidados tópicos de higienização da ferida cirúrgica foram realizados com solução de cloreto de sódio a 0,9%, duas vezes ao dia até retirada dos pontos cutâneos, após 10 dias do procedimento cirúrgico.

#### **4.5.1 Avaliação Clínica**

A avaliação clínica foi realizada através de inspeção diária da ferida cirúrgica e das condições dos animais nos primeiros seis dias de pós-operatório. Foram avaliados os seguintes quesitos: ingestão de alimento, ingestão de água, apatia, movimentação, presença de urina, presença de fezes, deiscência da sutura, presença de exsudato na ferida cirúrgica, edema e dor à palpação. Para os parâmetros ingestão de alimento, ingestão de água, apatia e movimentação, se graduava diariamente como ausente, moderado e intenso. Para os parâmetros presença de urina, presença de fezes, deiscência da sutura, presença de exsudato na ferida cirúrgica, edema e dor à palpação se graduava diariamente como presente ou ausente. Para esta avaliação, seguiu-se o modelo de Pazzini (2014) com algumas modificações (Tabela 2). Realizou-se acompanhamento diário dos animais, registrando-se alterações comportamentais e fisiológicas que poderiam vir a comprometer a evolução do estudo e acarretar o descarte do animal do grupo de avaliações.



**Tabela 2** – Tabela modificada de Pazzini (2014), utilizada para avaliação pós-operatório dos coelhos submetidos à implantação de guias de crescimento na região da calvária, graduando como ausente, moderado ou intenso os seguintes parâmetros: ingestão de alimento, ingestão de água, apatia, movimentação e graduando como presente ou ausente os seguintes parâmetros: presença de urina, presença de fezes, deiscência da sutura, presença de exsudato na ferida cirúrgica, edema e dor à palpação (n = 14).

	AUSENTE	MODERADO	INTENSO
<b>INGESTÃO DE ALIMENTO</b>			
<b>INGESTÃO DE ÁGUA</b>			
<b>APATIA</b>			
<b>MOVIMENTAÇÃO</b>			
	PRESENTE	AUSENTE	
<b>PRESENÇA DE URINA</b>			
<b>PRESENÇA DE FEZES</b>			
<b>DEISCÊNCIA</b>			
<b>EXSUDATO</b>			
<b>EDEMA LOCAL</b>			
<b>DOR À PALPAÇÃO</b>			

Fonte: Modificada de Pazzini, 2014.

#### 4.6 EUTANÁSIA E COLETA DE MATERIAL

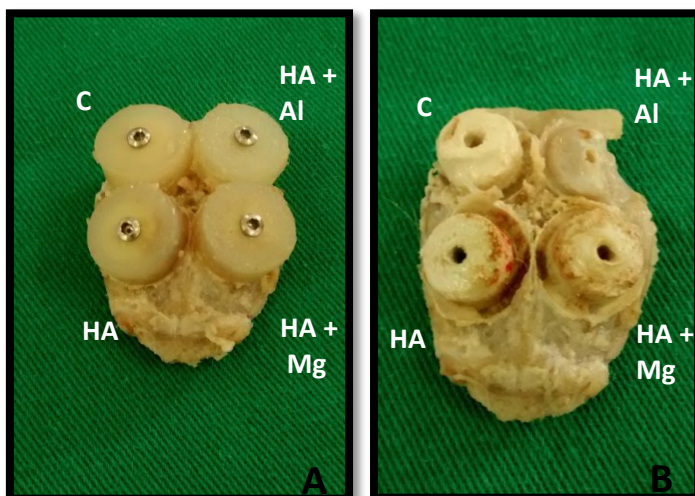
Conforme cada grupo, os animais foram submetidos à eutanásia aos 60 (n=7) e 90 (n=7) dias de pós-operatório, para coleta das amostras de tecido formado. Para realização do procedimento, seguiu-se o guia brasileiro de boas práticas para eutanásia em animais, que tem como base a Resolução Normativa do CONCEA, de 13 de setembro de 2013.

Realizou-se a eutanásia dos animais através da administração de medicação pré-anestésica composta por cetamina 20mg/Kg associado a midazolam 2mg/Kg aplicados por via intramuscular. Após 15 minutos da aplicação, seguiu-se com a indução anestésica a base de propofol 6m/Kg por via endovenosa. Na sequência, realizou-se a administração de 10ml de cloreto de potássio por via intravenosa, confirmando-se o óbito após ausência de atividade elétrica do coração, acompanhada por meio de eletrocardiografia.

Após confirmado o óbito do animal, a pele da região da calvária foi incisada sobre a cicatriz da cirurgia, expondo a calota craniana e as quatro guias de crescimento. A musculatura foi dissecada e a calota então extraída, com o uso de um disco diamantado montado em um mandril e acoplado a um micromotor elétrico.

Cada calvária foi então conservada em formaldeído tamponado a 10% por 15 dias, ainda com as quatro guias de crescimento e seus respectivos biomateriais (Figura 7A). Após este período, as guias foram desparafusadas e cada fragmento contendo uma variação de biocimento ou o controle foram serrados, acondicionados e identificados separadamente, permanecendo ainda em formaldeído tamponado por 15 dias e enviados para análise através de MEV ou análise histológica (Figura 7B).

**Figura 7** - Aspecto da calvária com as quatro guias de crescimento após permanecer 15 dias conservada em formaldeído 10% (A) e após a remoção das guias de crescimento, observa-se a disposição dos tratamentos (B).



Fonte: Produção do próprio autor.

#### 4.6.1 Avaliação Histológica

A avaliação histológica dos biocimentos e respectivas neoformações ósseas, assim como do controle, foram realizadas pelo laboratório de Histologia Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias do Centro de Ciências Agroveterinárias - CAV/UEDESC, Lages.

Após permanecerem por 15 dias em formaldeído tamponado a 10% ainda com as guias de crescimento, as amostras foram separadas e identificadas conforme cada biomaterial e tempo de implantação (a calvária foi serrada em 4 partes) e as guias retiradas, mantendo o material por mais 15 dias em formaldeído 10%. Posteriormente, amostras foram descalcificadas utilizando ácido nítrico a 10% por um período

de até 5 dias. Na sequência, foram processadas em histotécnico, onde foram desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e então incluídas em blocos de parafina. Os blocos foram seccionados em micrótomo, em cortes com espessura de 4 a 5  $\mu\text{m}$ . Após, os cortes foram corados pelo método de hematoxilina e eosina (H&E) descrito por Prophet et al. (1992) e então avaliados através de microscopia óptica.

Para avaliação e quantificação da neoformação óssea, o histologista utilizou critérios baseados em cruces, estes adaptados de Valiati (2011). Os critérios sob análise foram: neoformação de tecido ósseo, deposição de fibras colágenas, preenchimento das lacunas osteocíticas, presença de osteoclastos, presença de células de limpeza, biomaterial remanescente, presença de osso primário e presença de osso secundário. O histologista, que era cego aos tratamentos, analisava todas as lâminas de cada variação de tratamento, aos 60 e aos 90 dias após a implantação, atribuindo cruces ao grupo, onde a graduação variava de zero cruces para ausência e 4 cruces para presença muito acentuada (Tabela 3).

**Tabela 3-** Tabela modificada de Valiati (2011), atribuindo graus, expressados por cruzes, no que diz respeito ao grau de presença ou ausência dos seguintes parâmetros nos biocimentos aplicados: neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), lacunas osteocíticas (PLO), presença de osteoclastos (PO), presença de células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), presença de osso primário (OP) e presença de osso secundário (OS):

	NTO	DFC	PLO	PO	CL	BR	OP	OS
<b>AUSÊNCIA</b>	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>LEVE</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>MODERADO</b>	++	++	++	++	++	++	++	++
<b>ACENTUADO</b>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++ +	++ +
<b>MUITO ACENTUADO</b>	++++	++++	++++	+++ +	+++ +	+++ +	++ ++	++ ++

Fonte: Modificado de Valiati, 2011.

#### 4.6.2 Avaliação através de Microscopia Eletrônica por Varredura.

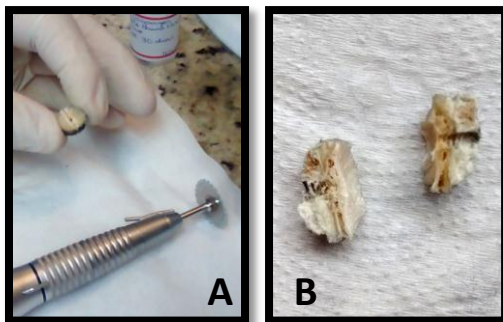
A microscopia eletrônica por varredura (MEV) permitiu a avaliação morfológica e microestrutural dos biomateriais, na forma de biocimentos, recuperados após 60 e 90 dias de implantação, na calvária de coelhos.

A técnica posteriormente descrita foi realizada pelo grupo de pesquisa em biomateriais do Centro de Ciências tecnológicas (CCT) – UDESC, Joinville. A análise das micrografias obtidas deu-se a partir do citado grupo em conjunto com a autora desta dissertação.

Para preparação dos fragmentos para análise através de MEV, as amostras, previamente conservadas em formaldeído tamponado a 10%, foram submetidas a um processo de

desidratação utilizando álcool 70% e 100%, por cerca de cinco dias. Na sequência, as amostras eram diafanizadas em xilol por um período de 8 a 12 horas. Com o auxílio de um disco de diamante acoplado a um motor de alta rotação, foram confeccionadas pequenas fissuras na amostra, a fim de se produzir pontos de fragilidade que permitissem a secção do material, para posterior análise (Figuras 8A e 8B).

**Figura 8** – (A), observa-se o disco de diamante acoplado a um motor de alta rotação, utilizado para criar um ponto de fragilidade nas amostras. (B) observa-se a peça dividida em duas partes.

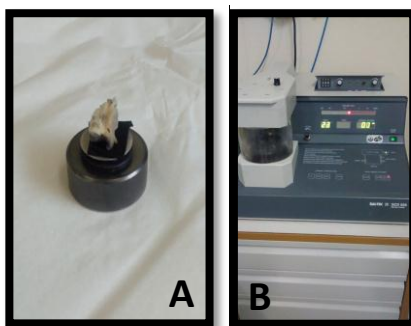


Fonte: Produção do próprio autor.

Na sequência, os fragmentos divididos foram acondicionados em um porta-amostra, composto por um disco em liga de alumínio com superfície lisa, onde uma fita de carbono dupla face foi fixada para a deposição do fragmento (figura 9A). As amostras eram então alocadas em metalizador e submetidas ao processo de metalização por pulverização catódica, com deposição de um filme de ouro sobre o fragmento a ser analisado (figura 9B). A deposição iônica ocorreu sobre os seguintes parâmetros: temperatura da câmara de metalização de 25 graus Celsius, corrente de 40mA, tensão

de 2kV e tempo de deposição de 140 segundos, fornecendo 30nm de filme de ouro na superfície das partículas.

**Figura 9** - Fixação da peça a ser analisada em um porta-amostra (A) para posterior metalização por pulverização catódica, utilizando um metalizador (B):



Fonte: Produção do próprio autor.

A técnica de microscopia eletrônica por varredura foi realizada com o aparelho marca ZEISS modelo DSM 940, por meio do método com elétrons secundários (SE) e retro-espehados (BSE), com distância de trabalho entre 10 e 15mm e tensão de aceleração dos elétrons de 15kV.

Cada amostra, devidamente identificada, foi submetida à análise descritiva morfológica utilizando-se o método visual da interface entre o biocimento implantado e a superfície receptora, bem como a exploração do material remanescente e pesquisa por depósitos de linhagens de células osteogênicas que poderiam estar promovendo a formação de tecido ósseo na região implantada.





## 5 RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os 14 animais utilizados no estudo receberam avaliação diária através de inspeção da ferida cirúrgica e análise comportamental, por seis dias consecutivos após o procedimento cirúrgico. Uma tabela, modificada de Pazzini (2014) foi preenchida diariamente, onde se pode observar que os animais não apresentaram quaisquer alterações em relação à sutura ou alterações inflamatórias na ferida cirúrgica.

Com relação aos parâmetros fisiológicos, observou-se pequena diminuição na ingestão de alimento nos primeiros três dias de pós-operatório, porém sem alterações no que concerne a presença de fezes e urina nas gaiolas e também à ingestão de água e estado geral dos animais (Tabela 4 e Tabela 5).

**Tabela 4** – Frequência média observada no primeiro, segundo e terceiro dia de pós-operatório após implantação de guias de crescimento na região da calvária de coelhos, segundo os seguintes parâmetros avaliados: ingestão de alimento, ingestão de água, apatia, movimentação, presença de urina, presença de fezes, deiscência da sutura, presença de exsudato na ferida cirúrgica, edema e dor à palpação (n = 14).

	<b>AUSENTE</b>	<b>MODERADO</b>	<b>INTENSO</b>
<b>INGESTÃO DE ALIMENTO</b>	0/14	7/14	7/14
<b>INGESTÃO DE ÁGUA</b>	0/14	5/14	9/14
<b>APATIA</b>	6/14	8/14	0/14
<b>MOVIMENTAÇÃO</b>	0/14	7/14	7/14
	<b>PRESENTE</b>	<b>AUSENTE</b>	<b>---</b>
<b>PRESENÇA DE URINA</b>	14/14	0/14	---
<b>PRESENÇA DE FEZES</b>	14/14	0/14	---
<b>DEISCÊNCIA</b>	0/14	14/14	---
<b>EXSUDATO</b>	0/14	14/14	---
<b>EDEMA LOCAL</b>	0/14	14/14	---
<b>DOR À PALPAÇÃO</b>	0/14	14/14	---

Fonte: Modificado de Pazzini, 2014.

**Tabela 5** – Frequência média observada no quarto, quinto e sexto dia de pós operatório após implantação de guias de crescimento na calvária de coelhos, segundo os seguintes parâmetros avaliados: ingestão de alimento, ingestão de água, apatia, movimentação, presença de urina, presença de fezes, deiscência da sutura, presença de exsudato na ferida cirúrgica, edema e dor à palpação (n = 14).

	<b>AUSENTE</b>	<b>MODERADO</b>	<b>INTENSO</b>
<b>INGESTÃO DE ALIMENTO</b>	0/14	3/14	11/14
<b>INGESTÃO DE ÁGUA</b>	0/14	0/14	14/14
<b>APATIA</b>	8/14	6/14	0/14
<b>MOVIMENTAÇÃO</b>	0/14	3/14	11/14
	<b>PRESENTE</b>	<b>AUSENTE</b>	---
<b>PRESENÇA DE URINA</b>	14/14	0/14	---
<b>PRESENÇA DE FEZES</b>	14/14	0/14	---
<b>DEISCÊNCIA</b>	0/14	14/14	---
<b>EXSUDATO</b>	0/14	14/14	---
<b>EDEMA LOCAL</b>	0/14	14/14	---
<b>DOR À PALPAÇÃO</b>	0/14	14/14	---

Fonte: Modificado de Pazzini 2014.

## 5.2 RESULTADOS HISTOLÓGICOS E ATRAVÉS DE MEV

A avaliação dos biomateriais micronanoestruturados na forma de biocimento, empregados neste estudo, realizada através da microscopia eletrônica por varredura, revelou variadas presenças de deposição óssea e prolongamentos osteoblásticos, bem como variedade na presença de biomaterial remanescente e tecido fibroso.

As análises histológicas revelaram diferença nos tempos de absorção e de indução de neoformação óssea, conforme cada biomaterial e o controle, bem como diferenças

quanto a presença de células mononucleares de limpeza, presença de osteoclastos e formação óssea primária e secundária, conforme discutido individualmente a seguir.

### 5.2.1 Controle

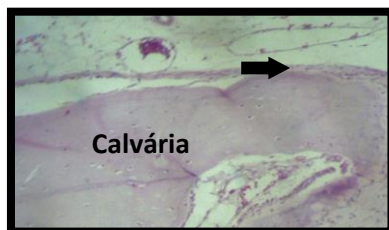
Apresentou ínfimo neocrescimento ósseo e acentuada presença de tecido fibroso, tanto aos 60 quanto aos 90 dias. A pequena quantidade de tecido ósseo novo foi formado predominantemente sobre a calota craniana e em sua quase totalidade por osso primário desorganizado.

#### 5.2.1.1 60 DIAS

Os resultados encontrados através da análise das amostras controle (C), pertencentes ao grupo eutanasiado aos 60 dias, indica pouco crescimento ósseo (Figura 10).

As amostras contêm grande quantidade de fibras colágenas e tecido conjuntivo, com fraca presença de células mononucleares de limpeza e também de células gigantes multinucleadas (osteoclastos). Apresenta quantidade moderada de células adiposas nas amostras.

**Figura 10** - Imagem histológica do tratamento controle, indicando presença de pequena camada de deposição óssea, ocorrendo com grande proximidade ao tecido ósseo da calvária (seta preta) aos 60 dias após a implantação. H&E, Obj. 10.



Fonte: Laboratório de histologia CAV/UDESC.

Quando presente, a neoformação óssea se dá predominantemente por osso do tipo primário, formado muito próximo ao osso da calvária. A tabela 6 ilustra a avaliação histológica aos 60 dias.

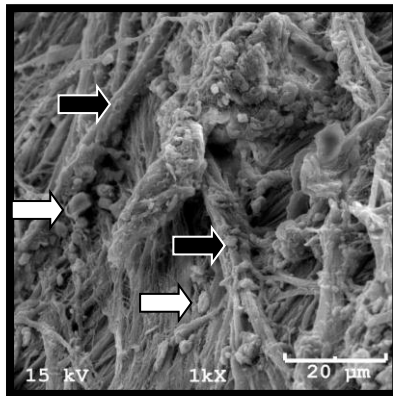
**Tabela 6** - Resultados médios obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), preenchimento de lacunas osteocíticas (PLO), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo controle, após 60 dias de implante.

NTO	DFC	PLO	PO	CL	BR	OP	OS
+	+++	+	0	0	-	+++	+

Fonte: Produção do próprio autor.

Observa-se intensa presença de tecido fibroso entremeado em células da linhagem sanguínea (Figura 11). Pode-se observar pequeno neocrescimento ósseo muito próximo à calvária, sendo em sua maioria composto por fibras colágenas.

**Figura 11** – Imagem obtida através de MEV, demonstrando o neocrescimento na cúpula preenchida por coágulo sanguíneo (grupo controle), evidenciando intensa presença de tecido fibroso (seta pretas) entremeado por células da linhagem sanguínea (seta branca), aos 60 dias após a implantação.



Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT-Joinville.

### 5.2.1.2 90 Dias

Aos 90 dias de evolução, observou-se pequena quantidade de neoformação óssea na amostra composta pelo coágulo (controle) em todos os animais pertencentes a este grupo. Este novo tecido ósseo apresentou-se depositado sobre o osso da calvária e organizou-se de modo a demonstrar maior quantidade de osso secundário em relação ao primário, conforme ilustrado através da tabela 7.

Moderada presença de tecido fibroso encontrou-se presente aos 90 dias após a implantação, em quantidade menor que a observada aos 60 dias neste mesmo grupo.

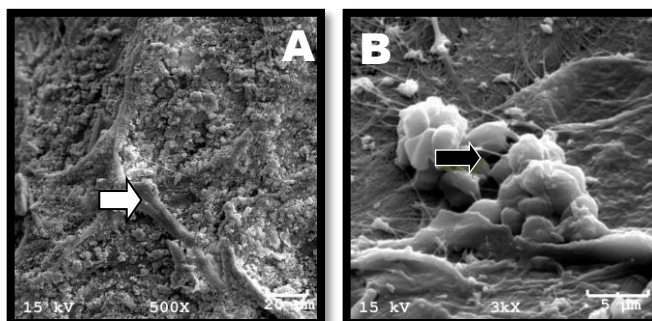
**Tabela 7** - Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), preenchimento de lacunas osteocíticas (PLO), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo controle, após 90 dias de implante.

NTO	DFC	PLO	PO	CL	BR	OP	OS
+	++	+	0	0	-	+	+++

Fonte: Produção do próprio autor.

Observou-se pequena quantidade de neocrescimento ósseo na superfície (Figura 12A), entremado às fibras colágenas, bem como atividade osteoblástica na região (Figura 12B). Observa-se o neocrescimento de forma mais central e próxima à calvária.

**Figura 12** – Imagem obtida através de MEV evidenciando a superfície do neocrescimento contendo coágulo sanguíneo (controle) aos 90 dias de pós operatório (A) demonstrando a presença de pequena neoformação óssea (seta branca) e alta celularidade na superfície. Em (B) observa-se osteoblastos emitindo prolongamento (seta preta) para posterior formação óssea.



Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT-Joinville.

## 5.2.2 Hidroxiapatita (HA)

De forma geral, o biocimento hidroxiapatita 100%, composta por finos cristais e agregação destes na ordem de 50µm, apresentou bom crescimento ósseo, mostrando ser bastante osseindutor.

Tanto aos 60 quanto aos 90 dias, observou-se neocrescimento tanto na base quanto no topo da guia de crescimento, indicado ser satisfatoriamente ossecondutor.

O crescimento mostrou-se moderado aos 60 dias e intenso aos 90 dias, indicando uma velocidade de formação óssea crescente.

### 5.2.2.1 60 Dias

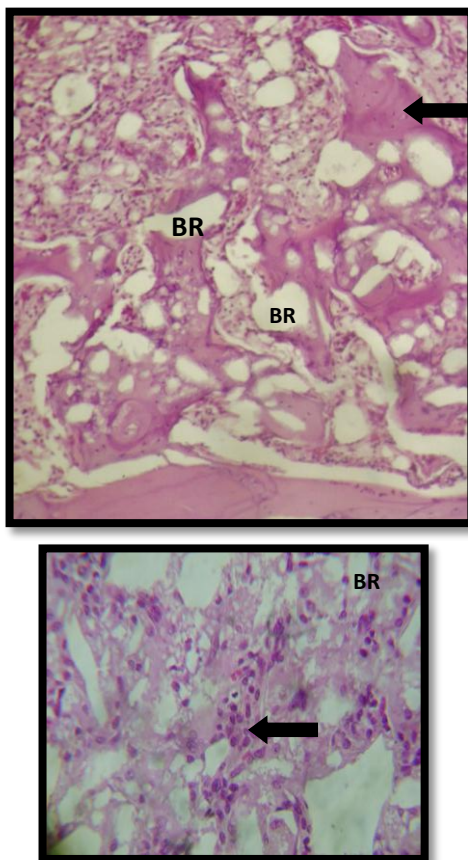
Aos 60 dias de pós-operatório, as amostras formadas pelo biocimento contendo apenas hidroxiapatita levaram à moderada neoformação de tecido ósseo, sendo na sua maioria formada por osso do tipo primário.

Constatou-se moderada presença de fibras colágenas nas amostras deste grupo. Ao se observar as células de limpeza na amostra, foi encontrada acentuada presença de células mononucleares, na maioria formada por macrófagos com citoplasma vacuolizado e linfócitos em menor quantidade. Células gigantes multinucleadas, compatíveis com osteoclastos, estavam presentes em pequena quantidade.

Foram encontradas formações ósseas isoladas tanto na base quanto na superfície da amostra, demonstrando que o crescimento não ocorreu apenas na direção da calota craniana para o topo da cúpula e sim em qualquer direção (osseindução). Presença de osso secundário organizado, com osteócitos aprisionados também foi observada (Figura 13A). Pode-se constatar também quantidade acentuada de biomaterial remanescente nas amostras (Figura 13B)



**Figura 13** - (A) Imagem histológica obtida do tratamento HA 100% após 60 dias de implantação, demonstrando o neocrescimento ósseo distribuído desde a base até a superfície da cúpula, a presença consistente de biomaterial remanescente (BR) e a presença de osteócitos aprisionados. H&E Obj, 10. (B) a imagem histológica foi obtida do topo do processo, demonstrando a grande quantidade de células de limpeza, exemplificadas pela seta preta. H&E, Obj. 40.



Fonte: Laboratório de histologia CAV/UDESC.

A tabela 8 ilustra a avaliação histológica aos 60 dias, referente ao biocimento composto por hidroxiapatita a 100%.

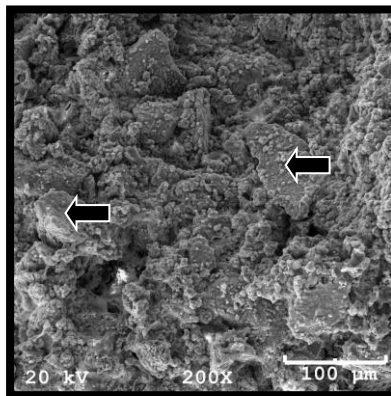
**Tabela 8** - Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), preenchimento de lacunas osteocíticas (PLO), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo Hidroxiapatita 100%, após 60 dias de implante.

NTO	DFC	PLO	PO	CL	BR	OP	OS
++	++	+	+	+++	+++	+++	+

Fonte: Produção do próprio autor.

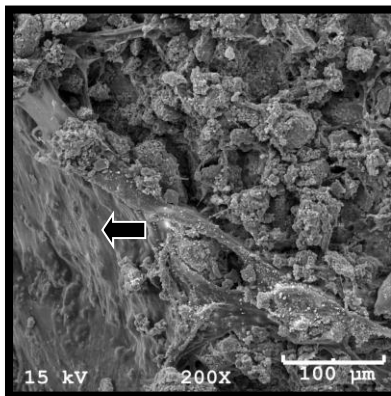
Observando a figura 14, fica claro a presença de grande quantidade de biomaterial remanescente aos 60 dias, a figura 15 ilustra a grande quantidade de formação tecidual.

**Figura 14** – Micrografia obtida através de MEV ilustrando a grande quantidade de biomaterial HA 100% presente aos 60 dias após o implante (seta preta).



Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT-Joinville.

**Figura 15** – Micrografia obtida através de MEV demonstrando a moderada presença de neoformação óssea do biocimento composto por HA 100% aos 60 dias pós-implante (seta preta).



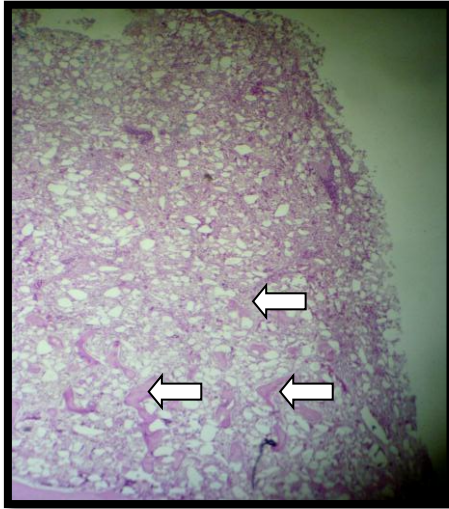
Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT-Joinville.

#### 5.2.2.2 90 Dias

Aos 90 dias, houve presença intensa de crescimento de novo tecido ósseo, quantidade esta superior às amostras de 60 dias (Figura 16). A deposição de tecido fibroso mostrou-se moderada nesta ocasião, não diferindo da análise aos 60 dias. Uma quantidade acentuada de osteoclastos foi observada nas amostras, assim como moderada presença de células mononucleares de limpeza.

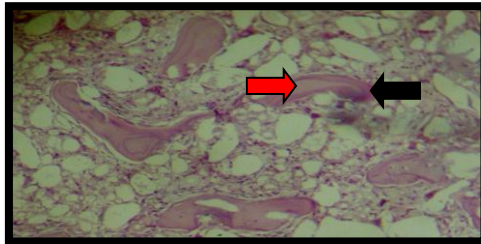
O osso neoformado tornou-se mais maduro em comparação as amostras de hidroxiapatita a 100% com 60 dias de pós-operatório, mostrando moderada presença tanto de osso primário quanto secundário, mais organizado (Figura 17).

**Figura 16** - Imagem histológica de toda a peça, pertencente ao grupo HA 100%, aos 90 dias após a implantação, demonstrando a quantidade de tecido ósseo neoformado (seta branca). H&E, Obj. 4.



Fonte: Laboratório de histologia CAV/UEDESC.

**Figura 17** - Imagem histológica demonstrando a presença de tecido ósseo tanto primário (seta preta) quanto secundário (seta vermelha) no neocrescimento ósseo do biomaterial HA 100% aos 90 dias após a implantação. H&E, Obj. 10.



Fonte: Laboratório de histologia CAV/UEDESC.

Grande parte do biomaterial ainda se encontrava presente quando observadas as amostras aos 90 dias. O crescimento ósseo continuou se dando de forma aleatória em relação ao local de crescimento, formando-se em qualquer direção e não apenas de baixo (calvária) para cima (topo da guia de crescimento).

O resumo dos eventos ocorridos para este grupo, aos 90 dias, pode ser observado na tabela 9.

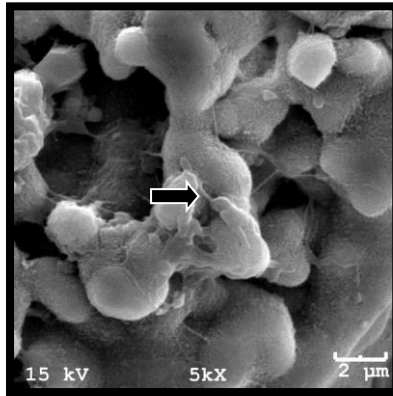
**Tabela 9** - Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), preenchimento de lacunas osteocíticas (PLO), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo Hidroxiapatita 100%, após 90 dias de implante.

NTO	DFC	PLO	PO	CL	BR	OP	OS
+++	++	+	+++	++	+++	++	++

Fonte: Produção do próprio autor

Os osteoblastos aparecem em grande quantidade (Figura 18), demonstrando continuidade na formação óssea. Alta celularidade também é observada nas amostras do grupo HA 100% aos 90 dias após implantação.

**Figura 18** - Micrografia obtida através de MEV, do biocimento HA 100% aos 90 dias após implantação, demonstrando a atividade de osteoblastos e a emissão de prolongamentos nesta amostra (seta preta).



Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT-Joinville.

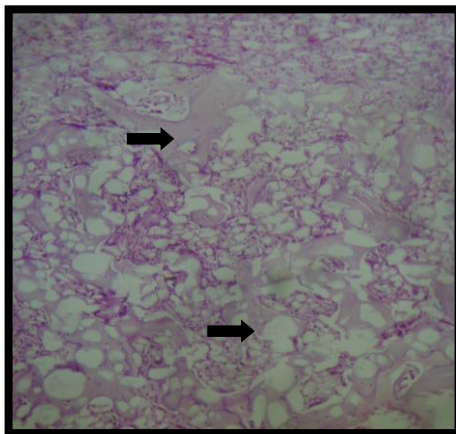
### 5.2.3 Hidroxiapatita 99% + Magnésio 1% (HA + Mg)

De uma forma geral, o biocimento bifásico micronanoestruturado formado pela combinação de 99% de hidroxiapatita e 1% de magnésio, com aglomerados microporosos na ordem de 100 $\mu$ m, se mostrou bastante osseointegrador e osseointegrador, sem apresentar qualquer indício de rejeição ou reação inflamatória.

#### 5.2.3.1 60 Dias

Foi observada nas amostras, aos 60 dias de pós-operatório, a presença de um tecido ósseo com crescimento acentuado e também mais organizado em relação à hidroxiapatita a 100% e ao controle (Figura 19).

**Figura 19** - Projeção histológica demonstrando a quantidade de tecido ósseo neoformado (seta preta) aos 60 dias após implantação do biocimento formado por HA 99% + Mg 1%. H&E, Obj. 10.



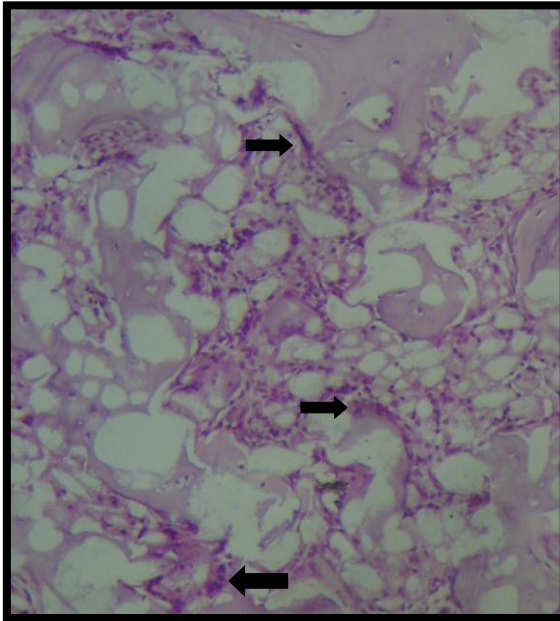
Fonte: Laboratório de histologia CAV/UDESC.

Grande quantidade de osteoclastos mostrou-se presente, com pequena presença de células mononucleares de limpeza, indicando grande atividade de remodelação óssea (ver Figura 20).

A quantidade de biomaterial remanescente mostrou-se acentuada, apesar do promissor crescimento ósseo, indicando o uso do biomaterial como arcabouço para o crescimento ósseo.

Na tabela 10, pode-se observar a representação da avaliação histológica aos 60 dias de pós-operatório.

**Figura 20** - A imagem histológica demonstra a grande quantidade de osteoclastos presentes na amostra (seta preta), representando o grupo HA99% + Mg1% aos 60 dias após a implantação. H&E, Obj. 10.



Fonte: Laboratório de histologia CAV/UEDESC.

**Tabela 10** - Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), preenchimento de lacunas osteocíticas (PLO), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo Hidroxiapatita 99% + Magnésio 1%, após 60 dias de implante.

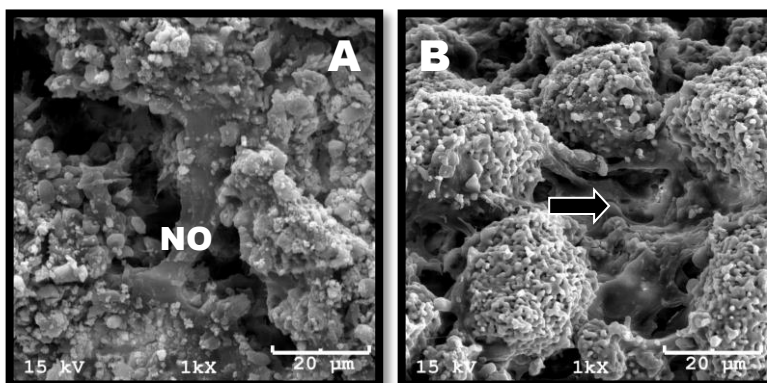
NTO	DFC	PLO	PO	CL	BR	OP	OS
+++	+	++	+++	+	+++	+++	+

Fonte: Produção do próprio autor.



A figura 21 (A) ilustra a grande formação óssea na superfície da cúpula, bem como a alta celularidade presente. Na figura 21(B) pose-se observar o osso neoformado entremeado por biomaterial remanescente.

**Figura 21** - Micrografia (A), representando o compósito HA 99% + Mg 1% aos 60 dias após implantação, demonstra a evidente neoformação óssea (NO) no topo da cúpula e alta celularidade presente. Na figura B, observa-se o crescimento ósseo entre os grânulos, representado pela seta preta.

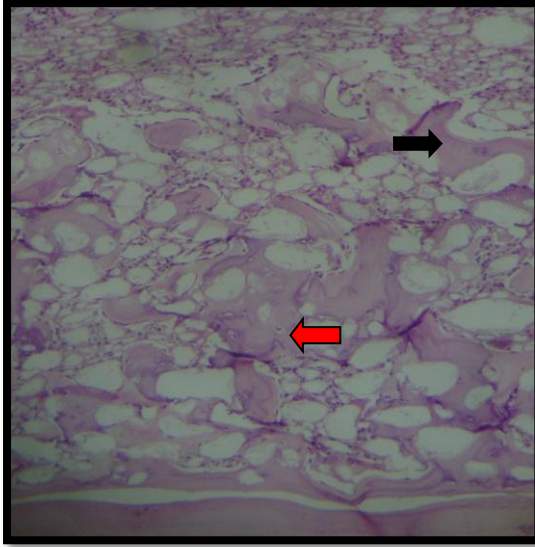


Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT-Joinville.

### 5.2.3.2 90 Dias

Observa-se acentuada presença de tecido ósseo neoformado, assim como observado aos 60 dias após a implantação, porém mais organizado. Presença de quantidades equivalentes de tecido ósseo primário e secundário, indicando maturação e neoformação concomitantes (Figura 22).

**Figura 22** - Imagem obtida através de microscopia óptica, onde se evidencia a presença de osso primário e osso secundário maduro (seta preta), com osteócitos aprisionados (seta vermelha), nas amostras contendo HA + Mg aos 90 dias após implantação na calvária de coelhos. H&E. Obj 10.



Fonte: Laboratório de histologia CAV/UEDESC.

A quantidade de osteoclastos se mostrou constante em relação a sua presença aos 60 dias, já as células de limpeza tiveram um pequeno incremento. Grande parte do biomaterial presente aos 60 dias ainda se mantinha aos 90 dias.

Foi observada intensa atividade de formação óssea aos 60 dias e poucas modificações aos 90 dias, com maturação de boa parte do tecido ósseo (osso primário se transformou em secundário) sem grandes neoformações (Tabela 11).

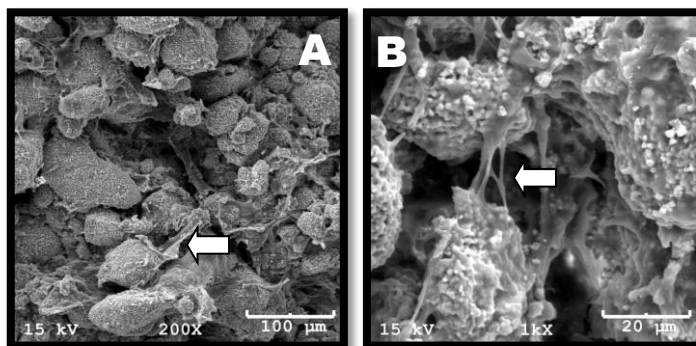
**Tabela 11** - Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), preenchimento de lacunas osteocíticas (PLO), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo Hidroxiapatita 99% + Magnésio 1% após 90 dias de implante.

NTO	DFC	PLO	PO	CL	BR	OP	OS
+++	+	+	+++	++	+++	++	++

Fonte: Produção do próprio autor.

Aos 90 dias se observa, através da microscopia eletrônica por varredura, os biomateriais implantados e o englobamento quase completo destes pelo tecido ósseo neoformado (Figura 23).

**Figura 23** - As micrografias obtidas através de MEV, obtidas do composto HA99% + Mg 1%, 90 dias após a implantação, demonstram a interligação de tecido ósseo neoformado entre os grânulos do biomaterial (seta branca).



Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT-Joinville.

### **5.2.4 Hidroxiapatita 95% + Alumina 5% (HA + Al)**

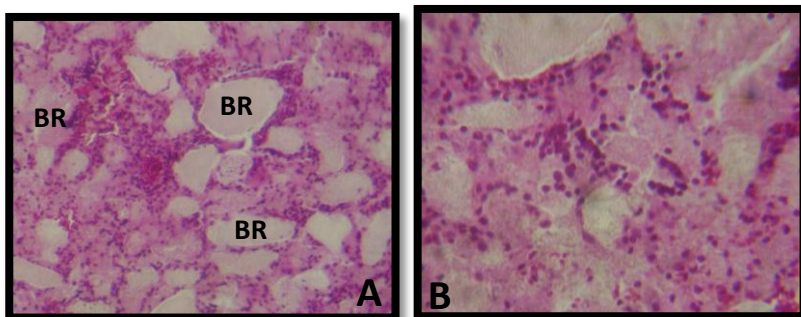
Considerando as amostras obtidas aos 60 e 90 dias contendo hidroxiapatita 95% + Alumina 5%, onde a morfologia do pó é formada por fragmentos de cristais microporosos com formas e tamanhos variados, fica claro que este biomaterial não apresentou boas qualidades quanto à indução de neoformação óssea em um sistema guiado, até a quantidade de dias supracitados.

#### **5.2.4.1 60 Dias**

Aos 60 dias pós-implante, observou-se discreto crescimento ósseo nas amostras contendo hidroxiapatita 95% + Alumina 5%, quantidade muito acentuada de biomaterial estava presente (Figura 24A).

Observou-se moderada deposição de fibras colágenas e também moderada presença de células inflamatórias, bem como fraca presença de osteoclastos e moderada quantidade de células de limpeza (Figura 24B). A tabela 12 ilustra a avaliação histológica aos 60 dias.

**Figura 24** - Imagens de microscopia óptica onde em (A) observa-se a grande quantidade de biomaterial remanescente (BR) (Obj 10). Na figura B, evidencia-se a grande quantidade de células de limpeza uninucleares e multinucleares (osteoclastos) presentes no implante formado por HA95% + Al5% aos 60 dias após implantação. H&E, Obj 40.



Fonte: Laboratório de histologia CAV/UDESC.

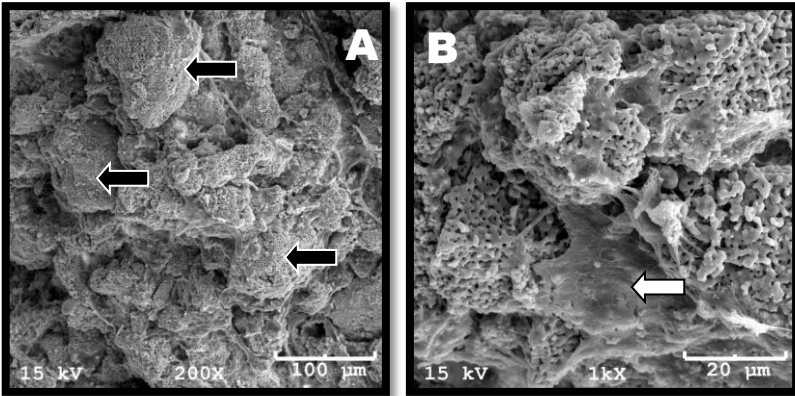
**Tabela 12** - Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), preenchimento de lacunas osteocíticas (PLO), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo Hidroxiapatita 95% + Alumina 5%, após 60 dias de implante.

NTO	DFC	PLO	PO	CL	BR	OP	O
+	++	+	+	++	++++	+	0

Fonte: Produção do próprio autor.

Observa-se grande quantidade de biomaterial sobre o osso da calvária, com leve presença de neoformação óssea sobre a superfície dos grânulos (Figura 25A e 25B).

**Figura 25-** A micrografia do compósito HA 95% + Al 5%, obtida através de MEV, demonstra em (A) a grande quantidade de biomaterial presente aos 60 dias após a implantação (seta preta). Em (B), observa-se que existe pequena neoformação óssea na superfície dos grânulos (seta branca).



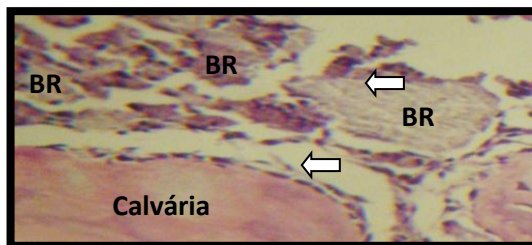
Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT-Joinville.

#### 5.2.4.2 90 Dias

Aos 90 dias, pequena quantidade de osso neoformado estava presente, basicamente composto por osso primário. Houve diminuição da presença de fibras colágenas em relação ao grupo com 60 dias de pós-operatório.

A presença de biomateriais continuou bastante acentuada e houve poucas alterações na quantidade de células de limpeza em relação aos 60 dias, havendo apenas um leve aumento na quantidade de osteoclastos (Figura 26).

**Figura 26** – Imagem histológica do compósito HA 95% + Al 5%, aos 90 dias após a implantação, demonstrando a presença acentuada de biomaterial remanescente (BR), bem como a grande quantidade de células de limpeza e macrófagos (seta branca). H&E. Obj. 10.



Fonte: Laboratório de histologia CAV/UEDESC.

Um material de aparência refringente estava presente no interior de grande parte dos macrófagos deste grupo, possivelmente sendo formado pelas partículas de alumina fagocitadas. Ao contemplar a tabela 13, se observa a avaliação histológica aos 90 dias.

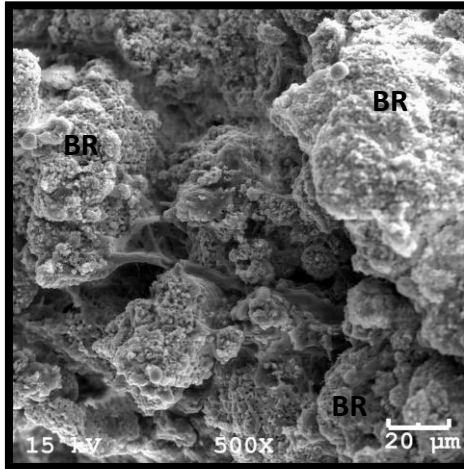
Observa-se na figura 27, pequena quantidade de tecido ósseo neoformado circundado o biomaterial implantado.

**Tabela 13** - Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), preenchimento de lacunas osteocíticas (PLO), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo Hidroxiapatita 95% + Alumina 5%, após 90 dias de implante.

NTO	DFC	PLO	PO	CL	BR	OP	OS
+	++	+	++	++	++++	+	0

Fonte: produção do próprio autor.

**Figura 27** - Micrografia do biomaterial formado por HA 95% + Al 5%, após 90 dias de implante, evidenciando a pequena quantidade de prolongamentos e neoformações ósseas, bem como a grande quantidade de biomaterial remanescente (BR).



Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT-Joinville.

### 5.3 RESULTADOS COMPARATIVOS

A tabela 14 ilustra a comparação entre todos os biomateriais, de acordo com os parâmetros histológicos observados, aos 60 dias. A tabela 15 apresenta os mesmo parâmetros acima citados, porém aos 90 dias.



**Tabela 14** - Resultados médios por grupo, aos 60 dias após a implantação, obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), preenchimento de lacunas osteocíticas (PLO), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS). Quadro representativo por cruzes, onde 0 seria a ausência e 4 cruzes a presença muito acentuada.

	NTO	DFC	PLO	PO	CL	BR	OP	OS
<b>CONTROLE</b>	+	+++	+	<b>0</b>	<b>0</b>	-	+++	+
<b>HA</b>	++	++	+	+	+++	+++	+++	+
<b>HA + MG</b>	+++	+	++	+++	+	+++	+++	+
<b>HA + AL</b>	+	++	+	+	++	++++	+	<b>0</b>

Fonte: Produção do próprio autor.

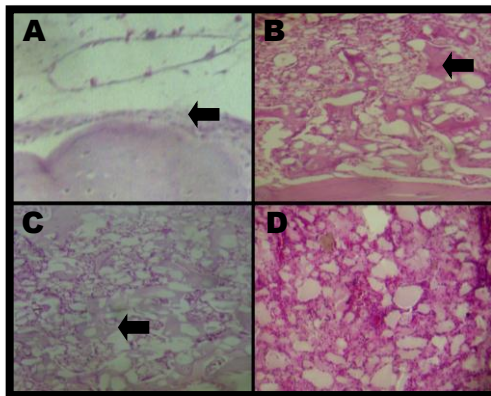
**Tabela 15** - Resultados médios por grupo, aos 90 dias após a implantação, obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), preenchimento de lacunas osteocíticas (PLO), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS). Quadro representativo por cruces, onde 0 seria a ausência e 4 cruces a presença muito acentuada.

	NTO	DFC	PLO	PO	CL	BR	OP	OS
<b>CONTROLE</b>	+	++	+	<b>0</b>	<b>0</b>	-	+	+++
<b>HA</b>	+++	++	+	+++	++	+++	++	++
<b>HA + MG</b>	+++	+	+	+++	++	+++	++	++
<b>HA + AL</b>	+	++	+	++	++	++++	+	<b>0</b>

Fonte: produção do próprio autor.

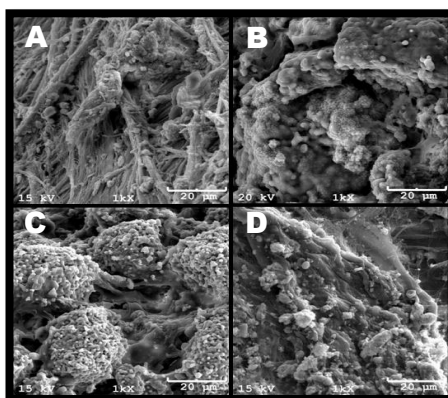
As figuras 28 e a figura 29 ilustram o comparativo histológico e através de MEV dos tratamentos, aos 60 dias após a implantação. As figuras 30 e 31 ilustram o mesmo comparativo, porém aos 90 dias após a implantação.

**Figura 28** – Imagens histológicas comprando os tratamentos após 60 dias de implantação, (A) grupo controle; (B) HA 100%; (C) HA99% + Mg1% e (D) HA95%+Al5%. As setas pretas indicam neocrescimento ósseo. H&E 10X.



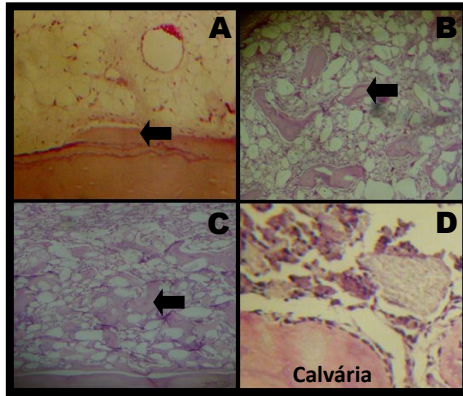
Fonte: Laboratório de histologia CAV/UEDESC.

**Figura 29** – Imagens obtidas através de MEV, comparativas dos tratamentos após 60 dias de implantação, (A) grupo controle; (B) HA 100%; (C) HA99% + Mg1% e (D) HA95%+Al5%.



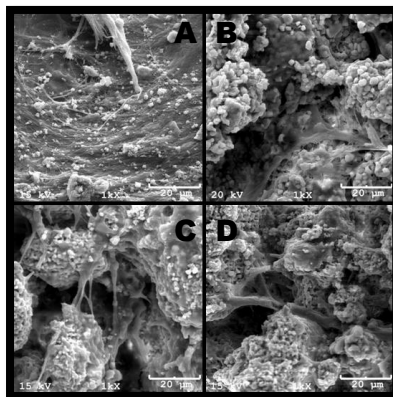
Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UEDESC/CCT-Joinville.

**Figura 30** – Imagens histológica comparativa dos tratamentos após 90 dias de implantação, (A) grupo controle; (B) HA 100%; (C) HA99% + Mg1% e (D) HA95%+Al5%. As setas pretas indicam neocrescimento ósseo. H&E 10X.



Fonte: Laboratório de histologia CAV/UEDESC.

**Figura 31** – Imagens obtidas através de MEV, comparando os tratamentos após 90 dias de implantação, (A) grupo controle; (B) HA 100%; (C) HA99% + Mg1% e (D) HA95%+Al5%.



Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UEDESC/CCT-Joinville.

## 6 DISCUSSÃO

Os modelos animais ainda são uma ferramenta imprescindível no estudo de diversas áreas da saúde. Mesmo sendo o modelo animal a maior aproximação com a realidade, deve-se sempre buscar a utilização do menor número de animais possível e minimizar ao máximo seu sofrimento, utilizando-os somente quando se necessitar uma padronização impossível de ser alcançada por outros métodos ou forem relevantes os dados que poderão ser obtidos (STEIN, 2009), como é o acaso deste estudo, onde os resultados serão promissores para o uso na medicina, odontologia e medicina veterinária.

O uso de coelhos como modelo experimental utilizado neste estudo ocorreu devido à facilidade no manuseio, pelo pequeno porte, por serem relativamente dóceis e de baixo custo e manutenção. Além do exposto, a disponibilidade de informações básicas de fácil acesso sobre a espécie também torna uma vantagem a utilização de coelhos para este tipo de estudo, assim como relatadas por Calasans-Maia *et al.* (2009) em sua revisão sobre a utilização de coelhos como modelos experimentais para cirurgia.

O crânio encefálico, ou calvária, estende-se da cavidade supraorbital à protuberância occipital externa (PROLO, 1982). A região foi escolhida para este estudo por possuir um formato que permite a fixação das guias de crescimento, além de possuir pouco suprimento sanguíneo, sendo rotineiramente utilizada pra estudo de defeito crítico e crescimento ósseo guiado (EZIRGANLI, 2013; LEVANDOWSKI, 2014).

A utilização de guias de crescimento, sem a confecção de um defeito ósseo, permite a avaliação do crescimento ósseo de forma vertical, sem a interferência das células e fatores de crescimento presentes nas bordas de uma fratura, além de permitir avaliar o potencial de um neocrescimento ósseo sem a presença de um defeito, ou seja, um crescimento exoesquelético.

A confecção de um defeito na região da calvária culmina com rompimento vascular que promove o extravasamento sanguíneo, liberação de citocinas inflamatórias, formação de coágulo, inflamação aguda e inflamação crônica (ANDERSON, 2008). Busei e colaboradores (1995) descrevem que a criação de um defeito ósseo facilitaria a angiogênese e a migração de células osteoprogenitoras, por este motivo se optou por não criar um defeito ósseo neste estudo, visto que não se almejava esta interferência dos mecanismos biológicos naturais nos resultados do estudo.

A técnica de crescimento ósseo guiado também foi utilizada por Ezirganli e colaboradores (2013), onde os mesmos utilizaram guias de crescimento de politetrafluoretileno para avaliar o crescimento ósseo na calvária de coelhos, também por Busenlechner (2008), utilizando as guias na calvária de mini porcos e Yoon e colaboradores (2014), que utilizaram guias de crescimento de titânio como barreira para avaliar a influência do plasma rico em plaquetas sobre a angiogênese na regeneração óssea guiada usando substitutos ósseos xenogênicos. Em todos os estudos citados, o uso da técnica de crescimento ósseo guiado se mostrou eficaz e promissora.

Neste estudo, o material utilizado para confecção das guias de crescimento foi a poliamida, devido a característica de não ser incorporado pelo hospedeiro, servindo somente como arcabouço para a regeneração tecidual. Esta observação, aliada a sua resistência física e boa tolerância por parte do receptor permitiram sua utilização com sucesso em meio cirúrgico (Mrué, 1996).

Levandowski (2009) cita que a técnica cirúrgica utilizada em seu ensaio, esta muito próxima a técnica utilizada no presente estudo, que constava em fazer uma incisão de pele sobre a calvária de coelhos e fixar quatro guias de crescimento, com o auxílio de parafusos, mostrou-se bastante simples e eficaz, mesmo sendo uma área bastante sensível devido à baixa

espessura da calvária e proximidade com o tecido cerebral. Neste estudo, 1 dos animais veio a óbito no trans cirúrgico após a confecção da “rosca” utilizando a chave macho de tarracha, o que indica que é necessário treinamento prévio em cadáveres para se ter uma boa noção da espessura da calvária e da força a ser empregada no momento da confecção dos orifícios para os parafusos. Diferentemente do que seria o ideal, em ambiente experimental muitas vezes ocorre óbito de animais devido a problemas na técnica ou manejo pós operatório, assim como observado neste estudo e como observado por Cunha (2012), perdendo 6 de 70 coelhos utilizados em seu estudo e Stein (2009) onde 8 de 14 ratos sofreram fratura de fêmur após criação de defeito ósseo e implante de biomaterial bilateralmente.

Os biocimentos são biomateriais que misturam uma fase sólida e uma líquida para dar origem a uma composição que adquire consistência rígida quando implantado. Camargo, (2007), em suas observações, descreve como promissores em aplicações cirúrgicas maxilofacial e na fixação de implantes, também como elemento matricial na eliminação de defeitos e na reparação e reconstrução de tecidos ósseos. No presente estudo, pode-se observar que os biocimentos apresentam boas condições quanto ao manuseio e facilidade em se moldar à guia de crescimento antes de sua implantação, bem como serviram como bons arcaibouços para o crescimento ósseo. Alonso (2011) avaliou cimentos ósseos de fosfato de cálcio com adições de aluminato e silicato de cálcio, onde também pôde observar as citadas características. No estudo de Todtmann (2013) e sua equipe, foram utilizados biocimentos aplicados em defeitos ósseos, onde também descrevem fácil manuseio intra-operatório, boa moldabilidade, estabilidade da estrutura, bem como uma adaptação exata aos defeitos ósseos.

Em relação às formulações de biocimentos utilizados neste estudo, uma delas era composta apenas por um tipo de matriz mineral e outras duas por uma matriz mineral e um

segundo composto, em menor quantidade (chamado de segunda fase nanométrica), formando um compósito. A resposta biológica incluindo uma segunda fase composta por biomateriais nanoestruturados pode ser associada a modificações morfológicas de superfície, de microestrutura, de tamanho de grãos, e área de superfície. Estas modificações podem oferecer melhores condições de interação das células formadoras de osso com a superfície do biomaterial (WEBSTER, 2009; DAVIES, 2014; ZHANG, 2014). Em um estudo comparando o uso de cerâmicas contendo uma matriz e uma segunda fase em escala nanométrica, em comparação com cerâmica convencionais (apenas uma fase), revelou-se que a adesão de células osteoblásticas à cerâmica com uma nanofase era maior do que a convencional, resultando assim em maior osseointegração (WEBSTER, et al 2000). No presente estudo, resultado bastante satisfatório foi encontrado ao se implantar o compósito HA + Mg, com grande formação óssea, com presença abundante de osteoblastos e ausência de rejeição, corroborando a literatura, fato este não aparente no compósito HA + Al, conforme elucidado ao decorrer do texto.

Como grupo controle, preencheu-se uma guia de crescimento com coágulo sanguíneo do próprio animal. Levandowski (2009) utilizou o coágulo sanguíneo como grupo controle em um estudo utilizando guias de crescimento ósseo implantadas na calvária de coelhos, sem a criação de defeito ósseo, onde observou que não houve um significativo neocrescimento. Neste estudo, tanto aos 60 quanto aos 90 dias após a implantação, também não se observou significativo neocrescimento ósseo, corroborando os achados do supracitado autor. Fica claro que em estudos guiados sem confecção de defeitos ósseos, é necessário o uso de biomateriais de preenchimento para se obter resultado expressivo, diferente de estudos não guiados onde se cria um defeito, no qual o coágulo pode apresentar resultados até mesmo superiores quando comparado ao uso de certos biomateriais (LAUREANO



FILHO, et al, 2007; NEVINS, 2013). Esta diferença provavelmente ocorre devido ao fato de que o defeito proporciona um arcabouço vascular e de células reparadoras para o local afetado.

Quando se utiliza um sistema guiado, sem a confecção de defeitos ósseos, se busca um crescimento exoesquelético, proporcionado pelas habilidades osseointrodutoras do próprio biocimento ou material de preenchimento, excluindo fatores externos (BUSENLECHNER 2008). Por este motivo se optou pela utilização da guia de crescimento ósseo neste estudo e se utilizou o coágulo como controle, provando que os resultados podem ser diretamente atribuídos às formulações, pois este estudo provou que apenas o coágulo não leva à crescimento ósseo expressivo. Caso alguma formulação comercial fosse utilizada como controle, haveria provavelmente, algum crescimento ósseo local, não sendo possível provar que, caso a guia não fosse preenchida com um biomaterial, não haveria crescimento ósseo.

A hidroxiapatita sintética é o análogo mais próximo química e cristalograficamente ao componente mineral do tecido ósseo. Em contraste com biomateriais inertes, a HA desenvolve uma ligação direta, aderente e forte com o tecido ósseo. Esta propriedade, denominada bioatividade, também leva a alta osseointegração e osse condução, que coloca HA como o biomaterial preferido para regeneração óssea (EPURE, 2007). Devido ao exposto e a vasta literatura sobre o assunto, foi escolhido como uma das composições teste deste estudo um biocimentos composto por matriz de hidroxiapatita com morfologia formada por finos cristais e agregação destes com tamanhos de até 50µm. Apesar de ter suas características bem descritas, uma apresentação contendo HA 100% implantada na forma de biocimento, com as dimensões citadas, sem defeito ósseo, na calvária de coelhos, através de um sistema guiado, ainda não havia sido descrita.

Aos 60 dias pós-implantação, se observou bom potencial da hidroxiapatita em relação à osseoindução, devido à moderada presença de neoformação óssea já presente neste pequeno intervalo de tempo e à grande quantidade de osteoclastos, os quais são responsáveis pela reabsorção do biomaterial para posterior formação óssea. Teixeira (2009) e Jensen et al. (2007), em seus respectivos estudos, também constataram bom potencial osseindutor em relação ao uso experimental na hidroxiapatita visando neocrescimento ósseo. Borges (2000) também observou grande quantidade de osteoclastos aos 60 dias após implantação de hidroxiapatita na tibia de cães.

Células de linhagem osteoclástica têm a mesma função dos macrófagos, ou seja, limpar a superfície dos enxertos para prepará-los para a deposição do novo tecido ósseo formado. Esse fato é confirmado através da observação frequente de células uni e multinucleadas adjacentes aos enxertos (JENSEN et al. 2007). Aos 60 dias após implantação, fica evidente uma grande quantidade de células de limpeza uninucleares, bem como sua união e transformação em células multinucleares (osteoclastos) aos 90 dias.

Aos 90 dias houve pequeno incremento na quantidade de tecido ósseo formado, observou-se também uma maturação do mesmo, que passou de predominantemente osso primário (60 dias), com grande quantidade de osteócitos jovens com núcleos grandes e citoplasma bem definido para osso secundário já bastante maduro e organizado. Aos 60 dias após a implantação de hidroxiapatita em defeitos ósseos na calvária de coelhos, Nogueira (2007) também observou predominância de tecido ósseo imaturo (primário). Esta característica indica que a hidroxiapatita 100% micronanoestruturada leva a um crescimento ósseo exponencial, com posterior maturação do tecido neoformado.

Na primeira análise, aos 60 dias pós-implante, a quantidade de grânulos de hidroxiapatita remanescente foi

grande, com leve diminuição aos 90 dias, corroborando o estudo de Regalin e colaboradores (2014), que observou grande quantidade de hidroxiapatita remanescente aos 60 dias pós-implantação na tíbia de ovelhas e que pouco diminuiu aos 90 dias e os estudos de Cho e colaboradores (2011), que também observaram lenta reabsorção da hidroxiapatita em meio biológico. Hasegawa e colaboradores (2006) implantaram 2 tipos de compostos contendo hidroxiapatita em fêmures de coelhos, analisando-os após o óbito natural dos animais, em uma média de 4 anos, e notaram que ambos os compostos foram apenas parcialmente absorvidos e que houve importante crescimento ósseo em volta das partículas não absorvidas de HA, demonstrando seu lento processo de reabsorção.

Pôde-se observar bom potencial osseocondutor deste biomaterial, pois tanto aos 60 quanto aos 90 dias houve formação óssea tanto a partir da base do osso da calvária quanto no ápice da guia de crescimento preenchida pelo biocimento, mostrando que o biocimento serviu de arcabouço físico para o neocrescimento ósseo. Levandowski (2014), também observou este potencial osseocondutor da hidroxiapatita quando implantada através e guias de crescimento na calvária de coelhos, porém com o biomaterial na forma granulada.

Tanto para o biomaterial HA 100% quanto para HA 99% + Mg 1%, aos 60 e 90 dias, se observa inúmeras projeções ósseas oriundas de osteoblastos ativos, que posteriormente se circundam destas projeções e formam os osteócitos. Hong e colaboradores (2010) descrevem que a apresentação de osteoblastos com abundantes projeções citoplasmáticas na superfície das biocerâmicas sugere que elas têm bioatividade mais elevada, porque apenas quando a superfície é favorável para o crescimento celular, os osteoblastos podem demonstrar suas projeções.

Apesar dos resultados promissores, há diversos estudos descrevendo a fragilidade desta cerâmica (AMINZARE et al,

2013, FRAN CZAK, 2014), por este motivo, busca-se o desenvolvimento e aperfeiçoamento de novos compósitos buscando este incremento em relação a suporte de carga por parte das cerâmicas para posterior uso em implantes que necessitem deste suporte. Com o intuito de melhorar as características de alguns biomateriais, foram desenvolvidos combinações dos mesmos em diferentes proporções e tipos, dando origem aos biomateriais compósitos (EPURE et al., 2007). Visando buscar este incremento em relação às propriedade de um biocimento formado apenas com o uso de uma biocerâmica, utilizou-se neste estudo dois compósitos, tendo a Hidroxiapatita como base e uma segunda fase do tipo Magnésio ou Alumina  $\alpha$ .

A adição do magnésio na fase apatita tem atraído pesquisadores devido ao seu significativo impacto no processo de mineralização e também sua influência na formação e crescimento de cristais da HA (GOUVEIA, 2008). Apesar de possuir propriedades conhecidas, uma vez instituídas estas incorporações na HA sintética, faz-se necessária a realização de novos estudos para avaliar seu comportamento *in vivo*, visto que estas substituições alteram a cristalinidade, a solubilidade, os parâmetros de rede, estabilidade térmica e reatividade superficial, a bioatividade, a biocompatibilidade e as propriedades de adsorção da estrutura da HA (SILVA, 2014).

Um compósito desenvolvido pela associação de 99% de hidroxiapatita (HA) e 1% de magnésio (Mg), na forma de biocimento, com aglomerados microporosos na ordem de 100 $\mu$ m, foi utilizado neste estudo, segundo a técnica supracitada. O mesmo se mostrou bastante osseointutor, com presença de acentuado crescimento ósseo, e este já bem organizado aos 60 dias, sendo constante aos 90 dias. Mestres e Ginebra (2011), descrevem que uma segunda fase do tipo Mg melhorara o processo de hidratação, pega e a atividade osseointutora do biomaterial, assim como constatado quando

se observa o neocrescimento ósseo estimulado por este compósito, nos tempos avaliados.

Quando se compara qualitativamente a formação óssea entre o grupo HA e o grupo HA+Mg, pode-se observar que inicialmente há maior formação óssea no segundo grupo em relação ao primeiro aos 60 dias e que se igualam aos 90 dias, o que também foi observado por Silva (2014), onde HA+Mg inicialmente formou maior quantidade de tecido ósseo em relação a HA, se igualando posteriormente, porém o autor utilizou discos constituídos pelos biomateriais, implantados na calvária de ratos. Este resultado pode ser atribuído ao fato de que este íon está intimamente associado ao mecanismo de mineralização, principalmente na fase inicial de osteogênese (GOUVEIA, 2008). Este resultado pode ser promissor quando se busca maior crescimento ósseo em pequeno intervalo de tempo.

Muitos biomateriais não apresentam propriedades osteoindutivas na ausência de agentes osteoindutores adicionais, tal qual proteínas morfogenéticas (KONDO et al. 2006). Ao se analisar os compósitos HA 100% e HA 99% + Mg 1%, fica claro que ambos promoveram o recrutamento de células precursoras de tecido ósseo gerando neoformação óssea, sem que houvesse adição de qualquer agente osteoindutivo, provando o potencial osteoindutor destes biocimentos.

A quantidade de osteoclastos mostrou-se acentuada principalmente aos 60 dias pós-implante. Esta característica pode ser atribuída à presença do magnésio no compósito, uma vez que é provado a sua influência sobre a mineralização e proliferação de osteoblastos (GOUVEIA, 2008; TAVARES, 2013), agindo nas fases iniciais do processo de mineralização tendo influência sobre a mitose dos osteoclastos (LAURENCIN, 2011). Epure (2007), em sua revisão, já descrevia que o uso de uma segunda fase do tipo Mg nanométrica na elaboração de biomateriais bifásicos está

associado a proporcionar uma estabilidade mecânica da fase hidroxiapatita e melhorar a bioatividade mantendo a sua biocompatibilidade.

Quantidade de biomaterial remanescente acentuada se mostrou presente tanto aos 60 quanto aos 90 dias após a implantação, não diferindo em relação à Hidroxiapatita a 100%, o que corrobora os estudos de Landi (2008) que avaliou grânulos de HA+ Mg e HA pura implantados nas tíbias de coelhos e mostrou que a degradação dos grânulos do compósito utilizado magnésio foi semelhante aquela observada nos grânulos de HA estequiométrica, porém o autor utilizou 4,5% de magnésio no compósito. Já Silva (2014), quanto implantou discos de HA+Mg em defeitos não críticos na calvária de ratos, observou maior velocidade de degradação para o compósito que para a HA pura. Sabe-se que diversos fatores tendem a influenciar a taxa de biodegradação, como porosidade, tamanho do cristal, número de cristais imperfeitos e tamanho do biomaterial (LU, 2002), além da espécie animal utilizada, por isso há dificuldade em correlacionar esta característica entre estudos diferentes.

A incorporação de nanopartículas de alumina- $\alpha$  numa matriz cerâmica de hidroxiapatita pode melhorar as características de propriedade mecânicas e da microestrutura da matriz cerâmica (BELLINI, 2007). Sob a forma de nanopartículas, pode apresentar boa bioatividade promovendo a proliferação do tecido ósseo sobre a superfície das nanopartículas, favorecendo a osseointegração, a osseoindução e adesão do tecido ósseo na interface do biomaterial (DELIMA, 2008; SOUZA, 2009). No presente estudo, porém, os resultados encontrados com o uso desta cerâmica não foram satisfatórios.

Um compósito, contendo 95% de hidroxiapatita e 5% de alumina  $\alpha$  foi utilizado neste estudo. Observando as amostras coletadas aos 60 dias após a implantação, ficou evidenciado uma moderada presença de tecido fibroso

desordenado e células inflamatórias, com ausência quase que completa de qualquer neoformação óssea, além de presença de grande quantidade de biomaterial remanescente recoberto por tecido fibroso. Regalin (2014), em seu estudo, onde implantou um biomaterial granulado contendo HA 95% + Al 5% na tíbia de ovelhas, descreve uma intensa proliferação de células fagocitárias e tecido fibroso, resultados bastante similares aos encontrados neste estudo. Aos 90 dias após implantação, houve pouca diferença nos aspectos gerais para o biocimento HA 95% + Al 5%, havendo apenas uma ligeira maturação no tecido ósseo depositado, sem que houvesse incremento na neoformação.

A quantidade de biomaterial remanescente foi bastante intensa, não sendo modificada aos 90 dias após a implantação, corroborando os achados de Regalin (2014) em relação a reabsorção do biomaterial nos mesmos tempos de pós-operatório.

O processo observado para o biocimento compósito formado pela associação de Hidroxiapatita e Alumina- $\alpha$  pode estar associado à presença da segunda fase alumina- $\alpha$  nanométrica em posição inter-intragranular na matriz hidroxiapatita. Durante o processo de fabricação e sinterização deste biomaterial, a alta temperatura favorece a desestabilização da fase hidroxiapatita e da alumina- $\alpha$ , para formação de fosfato tricálcio beta e aluminatos de cálcio. Sabe-se que alguns polítipos de aluminatos de cálcio podem se desestabilizar em meios biológicos e liberar íons de alumínio (EPURE 2007), um material metálico conhecido pela sua toxicidade em meio biológico (WALTON 2013, TOMLJENOVIC 2011). Choi (1998) cita que uma limitação desse compósito é a grande diferença de coeficiente de expansão térmica entre os dois materiais, justificando os argumentos supracitados.

Além da decomposição da Hidroxiapatita e da alumina, pode ocorrer a presença de microtrincas na interface entre a

fase de fosfato de cálcio e fase de aluminato de cálcio e também no contorno de grão na fase de fosfato de cálcio. Essas microtrincas provavelmente resultam das transformações de fase, evidenciando que o uso de altas temperaturas e tamanhos mais finos de partículas acentuam a reatividade entre as fases e a degradação do sistema (HUAXIA, 1992). Pode ter ocorrido também o aparecimento de tensões residuais termoelásticas na interface dos grãos, estas tensões são geradas durante o processo de sinterização e resfriamento do material e conduzem a uma excitação atômica superficial, o que pode inibir a proliferação celular na superfície do material, além de desencadear um processo de necrose inicial, posteriormente favorecendo a deposição de tecido fibroso na interface do biomaterial (SANTOS, 2009; CORRÊA, 2013). A presença de tecido fibroso juntamente com grande quantidade de células inflamatórias e de defesa e ínfimo neocrescimento ósseo, observado neste estudo, podem ser consequência dos eventos acima citados.

Baseado nos relatos presentes na literatura, os resultados presentes para este compósito podem ser associados a problemas no processo de sinterização e fabricação do mesmo, uma vez que o processo de implantação do biocimento, a técnica de preparo e aplicação utilizada para este compósito foi a mesma para HA 100% e HA 99% + Mg 1%, e estes apresentaram resultados promissores. Outro ponto que reforça esta ideia, é que diversos autores relataram bons resultados para o uso de alumina- $\alpha$  como biomaterial para uso em meio biológico (KNEPPER, 1998, EPURE 2007), o que leva a supor que o problema não seria a alumina- $\alpha$  por si só.

Devido ao exposto, acredita-se que mais estudos são necessários para validar ou não o uso da alumina  $\alpha$  como componente em composições bifásicas destinadas ao uso em meio biológico, como também deve-se investigar novas formas de produção deste compósito.



Este estudo teve como dificuldades iniciais a falta de estabilidade da cabeça do animal no momento da cirurgia, sendo resolvida com o desenvolvimento do suporte de cabeça descrito anteriormente. A quantidade de força empregada pelo cirurgião para a confecção do ponto de entrada do parafuso “rosca” foi um entrave, visto que um animal veio a óbito por este motivo, porém este problema logo foi resolvido após um maior tempo de treinamento.

Visando aplicações clínicas posteriores e mesmo comercialização dos biocimentos, tanto para uso como preenchimento bucomaxilfacial quanto para uso em ortopedia, o estudo mostrou-se bastante promissor, uma vez que demonstrou o potencial de promoção de formação óssea, além da ausência de rejeição de duas formulações de biocimento e demonstrou também o resultado negativo de uma das formulações (HA + Al), servindo como ponto de pesquisa tanto para a medicina veterinária, quanto odontologia e medicina.

Por serem formulações novas, com granulometrias na escala nanométrica e na forma de biocimento, foi necessária a utilização do estudo guiado sem a confecção de defeitos ósseos, uma vez que neste tipo de estudo os resultados podem ser atribuídos diretamente à formulação testada, sem maiores interferências do meio biológico (ou seja, se houve crescimento ósseo ele pode ser atribuído diretamente ao biomaterial). Porém, esta é a maior limitação do estudo, uma vez que há ainda a necessidade de testar as referidas formulações em interação com o meio biológico, para que seja comprovada a sua aplicabilidade clínica.

Futuramente, um estudo aplicando os biocimentos em defeitos ósseos, com respaldo deste trabalho e utilizando as formulações que obtiveram melhores resultados, poderia fornecer informações sobre a interação das testadas formulações com o meio biológico. Além disso, novas formas de produção do biocimento HA + Al poderiam ser testadas,

pois a literatura relata resultados promissores para este compósito, porém não foi o que se observou neste estudo.

## 7 CONCLUSÃO

Através da metodologia empregada e dos resultados obtidos neste estudo, constatou-se que os biocimentos formados pela hidroxiapatita 100% e pelo compósito Hidroxiapatita 99% + Magnésio 1% se mostraram bastantes promissores para uso em meio biológico, pois possibilitaram a formação óssea através da sua estrutura e o neocrescimento ósseo em regiões onde normalmente seriam desprovidas de osso (crescimento exoesquelético), provando seu potencial osseointegrador e osseointegrador. Ambos não apresentaram qualquer indício de rejeição, avaliados através da histologia e microscopia eletrônica por varredura, aos 60 e 90 dias após a implantação.

A composição HÁ 99% + Mg 1% apresentou um crescimento ósseo inicial superior aos demais grupos avaliados.

O compósito formado por Hidroxiapatita 95% somado a Alumina  $\alpha$  5% não atingiu resultados satisfatórios, levando a ínfima formação óssea e sinais de rejeição.



## REFERÊNCIAS

ALIEVI, M. M., SCHOSSLER, J. E. W., GUIMARAES, L. D., OLIVEIRA, A. N. C., TRAESLEL, C. K., FERREIRA, P. A. Implante ósseo cortical alógeno conservado em mel na reconstrução de falha óssea diafisária em fêmur de cães: avaliação clínica e radiográfica. *Ciência Rural*, v. 37, n. 2, p. 450-457, 2007.

ALONSO, L. M. **Avaliação de cimentos ósseos de Fosfatos de Cálcio com adições de Aluminato e Silicato de Cálcio.** 2011. 175f. Tese (Doutorado em engenharia) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

AMINZARE, M., ESKANDARI, A., BAROONIAN, M. H., BERENOV, A., HESABI, Z. R., TAHERI, M., & SADRNEZHAAD, S. K. Hydroxyapatite nanocomposites: Synthesis, sintering and mechanical properties. *Ceramics International*, v. 39, n. 3, p. 2197-2206, 2013.

ANDERSON, J. M., RODRIGUEZ, A., CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in Immunology*, v. 20, n. 2, p. 86-100, 2008.

BELLINI, O. J. **Síntese e Caracterização de uma Matriz Óssea de Fosfato de Cálcio e Nanocompósitos Fosfato de cálcio/SiO<sub>2</sub>n para Substituição e Regeneração Óssea.** 2007. 97f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville, 2007.

BERTINETTI, L., TAMPIERI, A., LANDI, E., MARTRA, G., COLUCCIA, S. Punctual investigation of surface sites of HA

and magnesium-HA. *Journal of the European Ceramic Society*, v. 26, p. 987-91, 2006.

BOHNER, M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury*, v. 31, n. 1, p. 37-47, 2000.

BOHNER, M. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: a critical assessment. *Biomaterials*, v. 26, p. 6423-6429, 2005.

BORGES, A., REZENDE, C., RIBEIRO, M., MELO, E., & NÓBREGA, P. Hidroxiapatita sintética como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia em cão: aspectos à microscopia eletrônica de transmissão. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 52, n. 6, p. 616-620, 2000.

BREW, M. C.; FIGUEIREDO, J. A. C. **Histologia geral para odontologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 148p. 2003.

BUSEI, D., DULA, K., BELSER, U. C., HIRT, H. P., & BERTHOLD, H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. II. Surgical procedure in the mandible. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, v. 15, n. 1, 1995.

BUSENLECHNER D., TANGL S., MAIR B. Simultaneous in vivo comparison of bone substitutes in a guided bone regeneration model. *Biomaterials*, v.29, n.22, p.3195-3200, 2008.

BUSENLECHNER D., TANGL S., MAIR B. Simultaneous in vivo comparison of bone substitutes in a guided bone

regeneration model. *Biomaterials*, v.29, n.22, p.3195-3200, 2008.

CALASANS-MAIA, M. D., MONTEIRO, M. L., ÁSCOLI, F. O., & GRANJEIRO, J. M. The rabbit as an animal model for experimental surgery. *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 24, n. 4, p. 325-328, 2009.

CAMARGO, N. H. A., SOARES, C., GEMELLI, E. Elaboration and Characterization of Nanostructured Biocements for Biomedical Applications. *Materials Research*, Vol. 10, n. 2, p. 135-140, 2007.

CARNEIRO, E., GARCIA, R. B., OLIVEIRA, R. C. Microscopic and radiographic analysis of the effect of particle size of demineralized bovine cancellous bone matrix on the repair of bone defects in femurs of rabbits. *Journal of Applied Oral Science*, v.13, n. 2, p. 157-162, 2005.

CARRODEGUAS, R. G., OLIVEIRA, L. C., SANTOS, L. A.; RIGO, E. C. S., BOSCHI, A. O., MONDÉJAR, S. P. Cimentos de alfa-Fosfato Tricálcico de Fraguado Doble. *Revista CENIC – Ciências Químicas*, v. 30, n. 3, p. 153-158, 1999.

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

CHEN, K. Y., SHYU, P. C., DONG, G. C., CHEN, Y. S., KUO, W. W., YAO, C. H. Reconstruction of calvarial defect using a tricalcium phosphate-oligomeric proanthocyanidins cross-linked gelatin composite. *Biomaterials*, v.30, n. 9, p. 1682-1688, 2009.

CHO, J. S., CHUNG, C., RHEE, S. Bioactivity and osteoconductivity of biphasic calcium phosphates. *Bioceramics Development and Applications*, v. 1, n. 1, p. 1-3, 2011.

CHOI, J. W., KONG, Y. M., KIM, H. E., LEE, I. S. Reinforcement of hydroxyapatite bioceramic by addition of Ni<sub>3</sub>Al and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *Journal of the American Ceramic Society*, v. 81, n. 7, p. 1743-1748, 1998.

CORRÊA, P. **Síntese e Caracterização de Nanocompósitos HA/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>- $\alpha$  sol-gel para Aplicações na Reconstrução Óssea**, 2013. 143 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais – Área: Cerâmica) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Joinville, 2013.

CROCI, A. T. Efeito do concentrado de plasma em falhas ósseas provocadas em fêmures de camundongos como estimulação de formação óssea. Estudo experimental. *Acta Ortopédica Brasileira*, v. 11, n. 4, 2003.

CUNHA, O. D. **Interação biológica de membranas poliméricas bioativas em falhas ósseas induzidas em tíbias de coelhos**. 2012. 159f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo. 2012.

DACULSI, G. Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials*, v. 19, n. 16, p. 1473-1478, 1998.

DALAPICULA, S. S., VIDIGAL JUNIOR, G. M., CONZ, M. B., & CARDOSO, E. Características físico-químicas dos biomateriais utilizados em enxertias ósseas. Uma revisão crítica. *Implant News*, v. 3, n. 5, p. 487-491, 2006.



DAVIES, J. E., MENDES, V. C., KO, J. C. H., AJAMI, E. Topographic scale-range synergy at the functional bone/implant interface. *Biomaterials*, 35, p. 25-35, 2014.

DELGADO-RUIZ, R. A., CALVO-GUIRADO, J. L., & ROMANOS, G. E. Critical size defects for bone regeneration experiments in rabbit calvariae: systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines. *Clinical Oral Implants Research*, v. 26, n. 8, p. 915-930, 2015.

DELIMA, S.A., CAMARGO, N.H.A., SOUZA, J.C.P. GEMELLI, E. Synthesis and Characterization of Nanocomposites Powders Calcium Phosphate/Titanium Oxide for Biomedical Applications. *Congresso Internacional PTECH*, v 1, p. 913-918, São Paulo, 2009.

DRIESSENS F. C. M., PLANELL J. A., BOLTONG M. G., KHAIROUN I., GINEBRA M. P. Osteotransductive bone cements. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers*, v. 212, p. 427-453, 1998.

DRIESSENS, F. C. M., FERNÁNDEZ, E., GINEBRA, M. P., BOLTONG, M. G., PLANELL, J. A. Calcium phosphates and ceramic bone cements vs. acrylic cements. *Anales de Química Internacionale*, v. 93, p. 38-43, 1997.

DORNAS, R. F. **Cimento a base de  $\beta$ -fosfato tricálcico em defeitos ósseos produzidos no crânio de coelhos**. 2013. 79f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2013.

DOS SANTOS, E., A., PINTO, V., B., B. Materiais cerâmicos. In: GRANJEIRO, José Mauro; SOARES, Glória D. A. *Biomateriais em Odontologia: princípios, métodos*

*investigativos e aplicações*. São Paulo: VM Cultural Editora Ltda., p. 207, 2011.

EPURE, L. M., DIMITRIEVSKA, S., MERHI, Y., & YAHIA, L. H. The effect of varying Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> percentage in hydroxyapatite/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> composite materials: Morphological, chemical and cytotoxic evaluation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 83, n. 4, p. 1009-1023, 2007.

EZIRGANLI, Ş., POLAT, S., BARIŞ, E., TATAR, İ., & ÇELİK, H. H. Comparative investigation of the effects of different materials used with a titanium barrier on new bone formation. *Clinical oral implants research*, v. 24, n. 3, p. 312-319, 2013.

FRANCZAK, Priscila Ferraz. **Síntese e caracterização de biocimentos de fosfatos de cálcio para uso na reparação do tecido ósseo**, 2014. 120 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais –Área: Cerâmica) –Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Joinville, 2014.

FRANCZAK, P. F., CAMARGO, N. H., FLORIANO-SILVA, D., DALMÔNICO, G. M., GEMELLI, E. Hydration study from different calcium phosphate biocements with microstructure and nanostructure. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v.-, n-, 2016.

FUCHS, B., OSSENDORF, C., LEERAPUN, T., SIM, F.H. Intercalary segmental reconstruction after bone tumor resection. *European Journal of Surgical Oncology*, v. 34, n. 12, p. 1271–1276, 2008.

GOUVEIA, D. S. **Obtenção de pós nanométricos de hidroxiapatita sintetizados com magnésio utilizando ultrassom.** 2008. 140f. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GUASTALDI, A. C. Engenharia de superfície do titânio para aplicações biomédicas. *Metalurgia e Materiais*. v. 59, n. 535, p. 442-444, 2003.

GUASTALDI, A. C., APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Química Nova*. v.33, n.6, p.1352-1358, 2010.

HASEGAWA, S., ISHII, S., TAMURA, J., FURUKAWA, T., NEO, M., MATSUSUE, Y., NAKAMURA, T. A 5–7 year in vivo study of high-strength hydroxyapatite/poly (L-lactide) composite rods for the internal fixation of bone fractures. *Biomaterials*, v. 27, n. 8, p. 1327-1332, 2006.

HENCH, L.L. Bioceramics: from concept to clinic. *Journal of the American Ceramic Society*, v.74, n.7, p.1487-1510, 1991.

HONG, Y., FAN, H., LI, B., GUO, B., LIU, M., ZHANG, X. Fabrication, biological effects, and medical applications of calcium phosphates nanoceramics. *Materials Science and Engineering*, v. 70, p. 225-242, 2010.

HUAXIA, J. I., MARQUIS, P. M. Preparation and characterization of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> reinforced hydroxyapatite. *Biomaterials*, v. 13, n. 11, p. 744-748, 1992.

JENSEN, S. S., YEO, A., DARD, M., HUNZIKER, E., SCHENK, R., BUSER, D. Evaluation of a novel biphasic calcium phosphate in standardized bone defects. A histologic

and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clinical Oral Implants Research*, v. 18, n. 6, p. 752-760, 2007.

JENSEN, S. S., BORNSTEIN, M. M., DARD, M., BOSSHARDT, D. D., BUSER, D. Comparative Study of Biphasic Calcium Phosphates With Different HA/TCP Ratios in Mandibular Bone Defects. A Long-Term Histomorphometric Study in Minipigs. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v.90, n.1, p. 171–181, 2009.

KALITA, S. J., BHATT, H. A. Nanocrystalline hydroxyapatite doped with magnesium and zinc: Synthesis and characterization. *Materials Science and Engineering: C*, v. 27, n. 4, p. 837-848, 2007.

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

KHAIROUN, I., DRIESSENS, F. C. M., BOLTONG, M. G., PLANELL, J. A., WENZ, R. Addition of cohesion promoters to calcium phosphate cements. *Biomaterials*, v. 20, n. 4, p. 393-398, 1999.

KNEPPER, M., MILTHORPE, B. K., MORICCA, S. Interdiffusion in shortfibre reinforced hydroxyapatite ceramics. *Journal of Material Science: Materials and Medicine*, v. 9, p. 589–596, 1998.

KOKUBO, T., KIM, H. M., KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*. v.24, n.13, p. 2161-2175, 2003.

KONDO, N., OGOSE, A., TOKUNAGA, K., UMEZU, H., ARAI, K., KUDO, N., MERA, H. Osteoinduction with highly purified b-tricalcium phosphate in dog dorsal muscles and the proliferation of osteoclasts before heterotopic bone formation. *Biomaterials*. v. 27, n. 25, p.4419-4427, 2006.

KUMTA, P. N., SFEIR, C., LEE, D. H., OLTON, D., CHOI, D. Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: novel synthesis and characterization. *Acta Biomaterialia*, v. 1, n. 1, p. 65-83, 2005.

LANDI, E., LOGROSCINO, G., PROIETTI, L., TAMPIERI, A., SANDRI, M., SPRIO, S. Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: from synthesis to in vivo behaviour. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 19, n. 1, p. 239-247, 2008.

LAUREANO FILHO, J. R., BRANCO, C., DE LIRA, B., ANDRADE, E. S. S., BARBOSA, J. R. D. A. Histological comparison of demineralized bone matrix and the Ricinus communis polymer on bone regeneration. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v. 73, n. 2, p. 186-192, 2007.

LAURENCIN, D., ALMORA-BARRIOS N., DE LEEUW, N. H., GERVAIS, C., BONHOMME, C., MAURI, F., CHRZANOWSKI, W., KNOWLES, J. C., NEWPORT, R. J., WONG, A., GAN, Z., SMITH, M. E. Magnesium incorporation into hydroxyapatite. *Biomaterials*. v. 32, n. 7, p. 1826-37, 2011.

LEGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v. 395, p. 81-98, 2002.

LEMAITRE, J., MUNTING, E. MIRTCHI, A. Setting, hardenring and reabsorption of calcium phosphate hydraulic cements. *Revue de Stomatologieet de chirurgiemaxillo-faciale*. v. 93, n. 3, p. 163-165, 1992.

LEVANDOWSKI-JR, N. **Análise comparativa de diferentes substitutos ósseos sintéticos microporosos em calvária de coelhos**. 2014. 153f. Tese (Doutorado)- Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC Centro de Ciências Tecnológicas – CCT, Joinville. 2014

LEVANDOWSKI-JR, N. **Biocerâmicas nanoestruturadas para aumento ósseo guiado: um estudo comparativo in vivo**. 2009. Dissertação (Mestrado)- Universidade de Santo Amaro, 2009.

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

LIU, X., MA, P. X. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, v.32, n.3, p.477-486, 2004.

LU, J., DESCAMPS, M., DEJOU, J., KOUBI, G., HARDOUIN, P., LEMAITRE, J., PROUST, J. P. The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone. *Journal of Biomedicine Baterials Research*. 2002;63(4):408-12.

LUNDGREN, A. K., SENNERBY, L., LUNDGREN, D. Guided jaw-bone regeneration using an experimental rabbit model. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 27, n. 2, p. 135-140, 1998.

LUNDGREN, A. K., LUNDGREN, D., HÄMMERLE, C. H., NYMAN, S., SENNERBY, L. Influence of decortication of the donor bone on guided bone augmentation. *Clinical Oral Implants Research*, v. 11, n. 2, p. 99-106, 2000.

LYNCH, S. E., GENKO, R., MARX, R. Grafting materials in repair and restorations. *Tissue Engineering Application in Maxillofacial Surgery and Periodontics*, v.5, p.93-112, 1999.

MAIA, M., KLEIN, E. S., MONJE, T. V., PAGLIOSA, C. Reconstrução da estrutura facial por biomateriais: revisão de literatura. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*, v.25, n.3, p.566-72, 2010.

MELO, E.G., REZENDE, C. M. F., BORGES, A. P. B., NOBREGA NETO, P. I. Aloenxerto ósseo cortical: avaliação do seu emprego em tibia de cão. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 50, n. 4, p. 385-394, 1998.

MESTRES, G., GINEBRA, M. Novel magnesium phosphate cements with high early strength and antibacterial properties. *Acta Biomaterialia*, v. 7, n. 4, p. 1853-1861, 2011.

MORAES, P. **O uso do ultra-som pulsado de baixa intensidade em falhas ósseas produzidas experimentalmente em coelhos, preenchidas ou não com cimento de fosfato de cálcio.** 2006. 44f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP). 2006.

MRUÉ, F. **Substituição de esôfago cervical por prótese bio sintética de látex: estudo experimental em cães.** 1996. 105 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) Faculdade de

Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1996.

MURUGAN, R., RAMAKRISHNA, S. Development of nanocomposites for bone grafting. *Composites Science and Technology*, v. 65, p. 2385-2406. 2005.

NEVINS, M. A Prospective, Randomized Controlled Preclinical Trial to Evaluate Different Formulations of Biphasic Calcium Phosphate in Combination With a Hydroxyapatite Collagen Membrane to Reconstruct Deficient Alveolar Ridges. *Journal of Oral Implantology*, vol. 39, n. 2, p. 133–139, 2013.

NOBLE, B. S. The osteocyte lineage. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v. 473, n. 2, p. 106-111, 2008.

NOGUEIRA, F. P. **Regeneração óssea com hidroxiapatita granulada: estudo experimental em calvária de coelhos.** 2007. 102f. Dissertação (Mestrado em Biologia Oral) – Universidade Sagrado Coração, Bauru, São Paulo, 2007.

NOVAES JR. Recursos e soluções em implantes. In **Periodontia/Cirurgia/Cirurgia para implantes.** Artes médicas, p. 447-66. 2000.

OLIVEIRA, S. M., MIJARES, D. Q., TUMER, G., AMARAL, I. F., BARBOSA, M. A., TEIXEIRA, C. C. Engineering endochondral bone: in vivo studies. *Tissue Engineering. Part A*, New York, v. 15, n. 3, p. 635-643, 2009.

PADILHA FILHO, J. G., CANOLA, J. C., SANTOS, L. A. D., FERREIRA, A. L., CRISCI, A. R., NOGUEIRA, G. M., FERMOSELI, W. A. D. O. Uso do ultra-som de baixa intensidade em falhas osseas produzidas experimentalmente em



radios de coelhos, preenchidas ou não com cimento de fosfato de calcio. *Veterinaria Noticias*, v. 13, n.1, p. 67-74, 2007.

PASSONI, L. S., FEIT, G., CAMARGO, N. H. A. Síntese e caracterização de alumina-sol-gel nanométrica: para elaboração de biomateriais nanoestruturados para aplicações biomédicas. *19º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais*, p. 2465-2472, 2010.

PAZZINI, J. M. **Plasma rico em plaquetas empregado na cirurgia reconstrutiva em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*): avaliação da exequibilidade da técnica, achados macroscópicos e histopatológicos**. 2014. 104f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, São Paulo. 2014.

PEARCE, A. I., RICHARDS, R. G., MILZ, S., SCHNEIDER, E., PEARCE, S. G. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *European Cells & Materials Journal*. v. 2, n. 13, p. 1-10, 2007.

PRECHEUR, H. V. Bone graft materials. *Dental Clinics of North American*, Philadelphia, v.51, p.729-746, 2007.

PRIPATNANONT, P., NUNTANARANONT, T., VONGVATCHARANON, S., LIMLERTMONGKOL, S. Osteoconductive effects of 3 heat-treated hydroxyapatites in rabbit calvarial defects. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 65, n. 12, p. 2418-2424, 2007.

PROLO, D. J. superior osteogenesis in transplanted allogenic canine skull following chemical sterilization. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, n. 168, p. 230-342, 1982.

PROPHET, E. B.; **Laboratory methods in histotechnology. Armed Forced Institute of Pathology.** American Registry of Pathology, Washington. 279, 1992.

REGALIN, B. D. C. **Comportamento da neoformação óssea e osteointegração de biomateriais micro e nano estruturados em ovinos.** 2014. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2014.

REICHERT, J. C., SAIFZADEH, S., WULLSCHLEGER, M. E., EPARI, D. R., SCHÜTZ, M. A., DUDA, G. N., HUTMACHER, D. W. The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials*. v. 30, n. 12, p. 2149–2163, 2009.

RIPAMONTI, U., RICHTER, P. W., NILEN, R. W. N., RENTON, L. The induction of bone formation by smart biphasic hydroxyapatite tricalcium phosphate biomimetic matrices in the non-human primate *Papio ursinus*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. v. 12, n. 6B, p. 2609-2621, 2008.

ROBBINS, S. L., COTRAN, R. S. **Patologia: bases patológicas das doenças.** 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

SANCHES, J. F. **Biomateriais substitutos ósseos na implantodontia.** 2010. 49f. Monografia (Especialização em Implantodontia) - Faculdades Unidas do Norte de Minas - Funorte/soebras, Manaus, 2010.

SANTOS, C., TEIXEIRA, L. H. P., DAGUANO, J. K. M. F., ROGERO, S. O., STRECKER, K., ELIAS, C. N. Mechanical properties and cytotoxicity of 3Y-TZP bioceramics reinforced

with Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles. *Ceramics International*, v. 35, n. 2, p. 709-718, 2009.

SCHMID, J., HÄMMERLE, C. H. F., OLAH, A. J., LANG, N. P. Membrane permeability is unnecessary for guided generation of new bone. *Clinical Oral Implants Research*, v. 5, p. 125–130, 1994.

SENCIMEN, M., AYDINTUG, Y. S., ORTAKOGLU, K. Histomorphometrical analysis of new bone obtained by distraction osteogenesis and osteogenesis by periosteal distraction in rabbits (Comparative Study Evaluation Studies). *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 36, n. 3, p. 235–242, 2007.

SILVA, J. D. A. **Avaliação do reparo de defeito ósseo não crítico com a utilização de hidroxiapatita dopada ou não com magnésio.** 2014, 72f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias da Saúde) – Escolha Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Bahia, 2014.

SOARES, C. **Síntese e caracterização de biocimentos nanoestruturados para aplicações biomédicas.** 2006. 91 f. Dissertação (mestrado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais, Joinville, 2006.

SOUZA, J. C. P. **Estudo de caracterização de pós nanoestruturados de fosfatos de cálcio e nanocompósitos fosfato de cálcio/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>- $\alpha$  sol-gel para aplicações biomédicas.** 2009, 102f. Dissertação (Mestrado) – Universidade do estado de Santa Catarina, Joinville, 2009.

STEIN, R. S. **Estudo comparativo da neoformação óssea utilizando-se o enxerto autógeno e três substitutos - defeitos**

**ósseos em ratos.** 2009. 59f. Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SUCHANEK, W., YOSHIMURA, M. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *Journal of Materials Research*, v. 13, p. 94–117, 1998.

WEBSTER, T. J., ERGUN, C., DOREMUS, R. H., SIEGEL, R. W., TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *Journal of the Royal Society Interface*, London, v. 6, n. 3, p. 311-324, 2009.

TAVARES, D. DOS S., CASTRO, L. DE O., SOARES, G. D., ALVES, G. G., GRANJEIRO, J. M. Synthesis and cytotoxicity evaluation of granular magnesium substituted  $\beta$ -tricalcium phosphate. *Journal of Applied Oral Science*, v. 21, n. 1, p.37-42, 2013.

TEIXEIRA, L. J. C. **Potencial osteocondutor de grânulos de hidroxiapatita em defeitos críticos na calvária de ratos.** 2009. Tese (Doutorado). Duque de Caxias: Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Rio de Janeiro, 2009.

TODTMANN, N., LODE, A., MANN, R., MAI, R., LAUER, G., WIECZOREK, K., ECKELT, U. Influence of different modifications of a calcium phosphate cement on resorption and new bone formation: An in vivo study in the minipig. *Journal of Biomedical Materials Research b: Applied Biomaterials*, v. 101, n. 8, p. 1410-1418, 2013.

TOMLJENOVIC, L. Aluminum and Alzheimer's disease: after a century of controversy, is there a plausible link. *Journal of Alzheimers Disease*, v. 23, n. 4, p. 567-598, 2011.

URIST, M. R. Bone: Formation by Autoinduction. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v. 395, p. 4-10, 2002.

VALIATI, R. **Análise do efeito da laserterapia na incorporação de aloenxerto ósseo em blocos processados por congelamento profundo – estudo em coelhos.** 2011. 124f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2011.

VITAL, C. C., BORGES, A. P. B., FONSECA, C. C., TSIOMIS, A. C., CARVALHO, T. B., FONTES, E. B., SENA, M. P., FÓFANO, G. Biocompatibility and behavior of hydroxyapatite on bone defect on rabbit's ulna. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 2, p. 175-183, 2006.

WALTON, J. R. Aluminum involvement in the progression of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimers Disease*, v. 35, n. 1, p. 7-43, 2013.

WEBSTER, T. J., ERGUN, C., DOREMUS, R. H., SIEGEL, R. W., & BIZIOS, R. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials*, v. 21, n. 17, p. 1803-1810, 2000.

YAMADA, Y. Correlation in the densities of augmented and existing bone in guided bone augmentation. *Clinical Oral Implants Research*, v. 23, p. 837–845, 2012.

YAMAMOTO, Y., UDAGAWA, N., MATSUURA, S., NAKAMICHI, Y., HORIUCHI, H., HOSOYA, A., NAKAMURA, M., OZAWA, H., TAKAOKA, K., PENNINGER, J. M., NOGUCHI, T., TAKAHASHI, N.

Osteoblasts provide a suitable microenvironment for the action of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand.

*Endocrinology*. V. 147, n. 7, p.3366-74, 2006.

YOON, J. S., LEE, S. H., YOON, H. J. The influence of platelet-rich fibrin on angiogenesis in guided bone regeneration using xenogenic bone substitutes: A study of rabbit cranial defects. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, v. 42, n. 7, p. 1071-1077, 2014.

YOUNG, S., BASHOURA, A. G., BORDEN, T., BAGGETT, L. S., JANSEN, J. A., WONG, M., MIKOS, A. G.

Development and characterization of a rabbit alveolar bone nonhealing defect model. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. v. 86, n. 1, p. 182–194, 2008.

ZHANG, J., LUO, X., BARBIERI, D., BARRADAS, A. M. C., DE BRUIJN, J. D. VAN BLITTERSWIJK, C. A., YUAN, H. Dimension of surface microstructure as an osteogenic factor in calcium phosphate ceramics. *Acta Biomaterialia*, v. 10, n. 7, p. 3254-3263, 2014.