

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**NEOFORMAÇÃO ÓSSEA EM UM SISTEMA GUIADO *IN VIVO* EM
CALVÁRIAS DE COELHOS COM O EMPREGO DE
HIDROXIAPATITA, BIO OSS® E BONEFILL® ASSOCIADOS OU NÃO COM
PLASMA RICO EM PLAQUETAS**

Luciana Alves Prati

Orientador: Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes

Lages, 2023

LUCIANA ALVES PRATI

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA- UDESC

**NEOFORMAÇÃO ÓSSEA EM UM SISTEMA GUIADO *IN VIVO* EM
CALVÁRIAS DE COELHOS COM O EMPREGO DE
HIDROXIAPATITA, BIO-OSS® E BONEFILL® ASSOCIADOS OU NÃO COM
PLASMA RICO EM PLAQUETAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes

**LAGES - SC
2023**

Luciana Alves Prati

**NEOFORMAÇÃO ÓSSEA EM UM SISTEMA GUIADO *IN VIVO* EM
CALVÁRIAS DE COELHOS COM O EMPREGO DE
HIDROXIAPATITA, BIOSS® E BONEFILL® ASSOCIADOS OU NÃO COM
PLASMA RICO EM PLAQUETAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal

Banca examinadora:

Orientador: _____

Prof Dr. Aury Nunes de Moraes
CAV/ UDESC/ Lages – SC

Membros:

Membro: _____

Profa. Dra Francielli Cordeiro Zimmerman
UFSC /Curitibanos – SC

Membro: _____

Profa. Dra. Daiara Floriano da Silva
DNPRIME – Pesq. & desenvolv. de nano materiais – Joinville SC

Membro: _____

Prof. Dr. Aldo Gava
CAV/ UDESC/ Lages – SC

Membro: _____

Prof. Dr. Ademar Luiz Dallabrida
CAV/ UDESC/ Lages-SC

Lages, 23 de fevereiro de 2023,

*Dedico este trabalho a meus amores Diego e Genésio,
Meus incentivadores e inspiradores, Tereza e Leo, Alice e Miro.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Pai de infinito amor e bondade, sem a vontade do qual não cairia uma folha de uma árvore;

À Fundação Universidade do Estado de Santa Catarina, em especial ao Presidente Genésio Téo, por sempre favorecer aos colaboradores a busca de aprimoramento profissional;

À Universidade do Oeste de Santa Catarina, em especial ao Reitor, Dr. Aristides Cimadom, pelo incentivo, confiança e oportunidade;

À Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC e ao Hospital de Clínicas Veterinárias que proporcionaram aprendizado e estrutura adequada para a realização do experimento, em especial ao Dr. Aury Nunes de Moraes, orientador desta pesquisa, pela oportunidade e dedicação a este trabalho; ao professor Dr. Adson Costa, pela execução da parte laboratorial; aos professores Dr. Felipe Comassetto, Dr. Nilson Oslenowski, Dr. Ademar Dalabrida, pela dedicação que têm com a Medicina Veterinária e aqueles que querem se aventurar na pesquisa, pelo convívio valioso que oportunizaram. Em seus nomes agradeço a todos professores da Pós-graduação em Ciência Animal, foram fundamentais nessa jornada estudo e crescimento profissional;

À Universidade Federal de Santa Catarina, em especial ao co-orientador Dr. Adriano Tony Ramos, pela participação, paciência e valorosos ensinamentos, além da realização das análises histológica e histomorfométrica; a Dra. Suzane Lopes, colaboradora na execução das análises de microscopia eletrônica de varredura; ao Dr. Nelson Camargo, pelos conhecimentos transmitidos em sua disciplina, pelo Mestre inspirador que foi e pelo seu legado;

Ao Coordenador de Campus das Universidade do Oeste de Santa Catarina – UNOESC, Prof. Realdo Tavares, pelo incentivo e compreensão, em seu nome estendo meus agradecimentos aos colegas de Curso de Medicina Veterinária e Hospital Veterinário;

À Universidade Federal de Santa Maria, onde tudo se iniciou, com o convívio com excelentes Mestres e estrutura que fomenta a pesquisa e ciência, em especial aos eternos professores e exemplos: Dr. Alceu Gaspar Raiser, obrigada pelos sete anos de convívio e aprendizado, sempre o exemplo a ser seguido de profissional e pessoa; Dr. Ney Luiz Pippi, obrigada pelos

ensinamentos técnicos fundamentais, mas em especial pelo de “nunca desistir de um projeto iniciado”; Dr. Claudio Barros e Dra. Dominguita Lüthers da Graça, obrigada pelo privilégio de transmitir-nos seus conhecimentos e pelas cobranças, com toda delicadeza de sempre; Dr. Rafael Fighera, amigo, colega de graduação, exemplo de profissional e de entrega pelo estudo, obrigada pelo incentivo e generosidade;

Às colaboradoras na execução do experimento bolsista Alice Prochnov e mestrandas Vanessa da Rocha, em seus nomes estendo meus sinceros agradecimentos a todos pós-graduandos e graduandos e que auxiliaram com tanta dedicação e responsabilidade.

Ao Coordenador de Campus das Universidade do Oeste de Santa Catarina – UNOESC, Prof. Realdo Tavares, pelo incentivo e compreensão, em seu nome estendo meus agradecimentos aos colegas de Curso de Medicina Veterinária e Hospital Veterinário;

Aos alunos do Curso de Auxiliar de Veterinário, pela compreensão e dedicação inspiradoras;

Às colaboradoras do Pet da Lu, pela compreensão pelas minhas ausências e dedicação ao trabalho realizado entregue aos clientes;

Aos amigos, irmãos de caminhada do Lar de Jesus, obrigada por tanto amor e benevolência e por compreenderem a necessidade de minha ausência por um tempo;

Afortunada sou pela quantidade de anjos amigos nesta caminhada, fato pelo qual não citarei nomes para não cometer a injustiça de não mencionar algum. Meus sinceros e profundos agradecimentos por todo carinho, toda doce palavra de conforto e incentivo proferida.

O Senhor é o meu pastor, nada me faltará.

Deitar-me faz em verdes pastos; guia-me mansamente a águas tranquilas.

Refrigera a minha alma; guia-me pelas veredas da justiça, por causa do seu nome.

Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum, porque tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam.

Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos; unges a minha cabeça com óleo; o meu cálice transborda.

Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida, e habitarei na casa do Senhor para sempre.

RESUMO

PRATI, Luciana Alves. **Neoformação óssea em um sistema guiado *in vivo* em calvárias de coelhos com o emprego de hidroxiapatita, bio-oss® e bonefill® associados ou não com plasma rico em plaquetas.** 2023. 154 fls. Tese (Doutorado em Ciência Animal – Área: Cirurgia Veterinária) - Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2023.

A busca por condutas terapêuticas que potencializem o processo de reparação óssea, de forma prática, segura, pouco onerosa, com o emprego de substitutos ósseos biocompatíveis que sejam gradualmente absorvidos e substituídos por novo tecido ósseo, sem a ocorrência de complicações, tem inspirado muitas pesquisas. As biocerâmicas nanoestruturadas de fosfato de cálcio e os nanocompósitos com matriz de fosfatos de cálcio têm se destacado na área de biomateriais de reconstituição óssea pela sua semelhança química e cristalográfica com a apatita óssea do esqueleto. O plasma rico em plaquetas (PRP) tem sido utilizado em diversas áreas, como na cirurgia plástica reconstrutiva, para auxiliar na hemostasia, estimular o crescimento de tecidos moles e a cicatrização óssea, para favorecer a aderência de enxertos cutâneos, união de enxertos ósseos, fixação de implantes em crânio ou em ossos planos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o comportamento *in vivo* durante o processo de neoformação óssea da hidroxiapatita, biooss® e bonefill® isolados e com a associação com plasma rico em plaquetas (PRP) em crescimento ósseo guiado em calvárias de coelhos, em diferentes tempos de evolução, 60 e 90 dias. Foram estudados vinte coelhos mestiços, machos, com média de idade de oito meses e peso médio de 4Kg, considerados saudáveis. Foram separados em quatro grupos de cinco animais, dois para coleta de amostras aos 60 dias de pós-operatório e dois para coleta aos 90 dias. O grupo 60 dias consistiu de 10 animais, destes 5 receberam o tratamento com os biomateriais somente, e 5 receberam os biomateriais acrescidos por plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo. De forma análoga os dez animais do grupo 90 dias de avaliação receberam os mesmos tratamentos. Terminado o período proposto para o estudo de cada grupo, os animais passaram por eutanásia para coleta de amostras para: teste de dureza, estudos histológicos e de histomorfometria, além de microscopia eletrônica de varredura. Os dados obtidos através da análise histológica foram analisados por meio do teste estatístico de Kruskal-Wallis. Foi considerado um nível de significância de 5% e, quando rejeitada a hipótese nula, os tratamentos foram comparados pelo teste de comparação de mediana. Já para a variável biomaterial remanescente (BR) os resultados foram analisados pelo teste exato de Fisher ($\alpha=5\%$). Para isso, foi utilizado o programa estatístico R Studio. Com relação aos resultados oriundos da histomorfometria, as preposições de normalidade e independência dos resíduos, assim como a homogeneidade das variâncias foram previamente testados. Após, foi realizada análise de variância satisfazendo o seguinte modelo estatístico: $y_{ijk} = \mu + \text{biomaterial}_i + \text{PRP}_j + \text{biomaterial} \times \text{PRP}_{ij} + \epsilon_{ijk}$, no qual y_{ijk} : variáveis analisadas (área (μm^2) e porcentagem); μ : média geral de todas n observações; biomaterial: biomateriais utilizados (hidroxiapatita, biooss® e bonefill®); PRP_j : presença ou ausência de PRP; biomaterial \times PRP_{ij} : interação entre biomaterial e presente ou ausência de PRP e ϵ_{ijk} : erro experimental ($N \sim (0, \sigma^2)$). Como foi observada

diferença estatística, os tratamentos foram comparados por meio do teste de Tukey, utilizando nível de significância de 5%. Para isso, foi utilizado o programa estatístico R Studio. Concluiu-se que o delineamento e o modelo experimental adotados permitiram a promoção do crescimento ósseo guiado em calvárias de coelhos para a comparação de diferentes tratamentos; o acréscimo do plasma rico em plaquetas aos diferentes biomateriais (HA, bio-oss® e bonefill®) não promoveu melhora no processo de reparação óssea, levando a uma maior formação de tecido mieloide, menor formação de tecido ósseo e piora na infiltração celular entre os poros dos biomateriais; com relação aos diferentes biomateriais, na comparação entre si sem PRP, o que proporcionou maior percentual de osso neoformado mediante as análises empregadas, no período de 90 dias foi o bio-oss®, sobre a variável biomaterial remanescente o estudo não evidenciou diferenças significativas, muito embora para esta a comparação, que diz respeito a absorção dos biomateriais são necessários experimentos com períodos mais prolongados de avaliação.

Palavras-chave: Cicatrização óssea. Biomateriais. Fatores de crescimento. Histonorfometria. Microscopia eletrônica de varredura.

SUMMARY

PRATI, Luciana Alves. **Bone neoformation *in vivo* guided system in rabbit calvaria using hydroxyapatite, bio-oss®, and bonefill® associated or not with platelet-rich plasma.** 2023. 154 pages. Thesis (Doctorate in Animal Science – Veterinary Surgery) – State University of Santa Catarina. Postgraduate Program in Animal Science, Lages, 2023.

The search for therapeutic procedures that enhance the bone repair process in a practical, safe, and inexpensive way, using biocompatible bone substitutes that are gradually absorbed and replaced by new bone tissue without the occurrence of complications, has inspired many studies. Calcium phosphate nanostructured bioceramics and nanocomposites with calcium phosphate matrix have stood out in bone reconstitution biomaterials due to their chemical and crystallographic similarity with skeletal bone apatite. The PRP has been used in several areas, such as reconstructive plastic surgery, to aid in hemostasis, stimulate soft tissue growth and bone healing, favor the adhesion of skin grafts, the union of bone grafts, and fixation of implants in the skull or flat bones. The objective of the present work was to evaluate the *in vivo* behavior during the bone neoformation process of hydroxyapatite, biooss® and bonefill® alone and with the association with platelet-rich plasma (PRP) in guided bone growth in rabbit calvaria at different times of evolution, 60 and ninety days. Twenty male crossbred rabbits, with an average age of eight months and an average weight of 4 kg, considered healthy, were studied. They were separated into four groups of five animals, two for sample collection at 60 days postoperatively and two for collection at 90 days. The 60 days group consisted of 10 animals, of which 5 received treatment with biomaterials only, and five received biomaterials plus autologous platelet-rich plasma (PRP). Analogously, the ten animals in the 90-day evaluation group received the same treatments. At the end of the period proposed for the study of each group, the animals underwent euthanasia to collect samples for hardness tests, histological and histomorphometry studies and scanning electron microscopy. Data obtained through a histological analysis were analyzed using the Kruskal-Wallis statistical test. A significance level of 5% was considered, and when the null hypothesis was rejected, the treatments were compared using the median comparison test. As for the remaining biomaterial variable (BR), the results were analyzed using Fisher's exact test ($\alpha=5\%$). For this, the statistical program R Studio was used. Regarding the results from the histomorphometry, the prepositions of normality and independence of the residues, as well as the homogeneity of the variances, were previously tested. Afterward, analysis of variance was performed satisfying the following statistical model: $y_{ijk} = \mu + \text{biomaterial} + \text{PRP}_j + \text{biomaterial} \times \text{PRP}_{ij} + \varepsilon_{ijk}$, in which y_{ijk} : analyzed variables (area (μm^2) and percentage); μ : overall mean of all n observations; biomaterial: biomaterials used (hydroxyapatite, biooss®, and bonefill®); PRP_j : presence or absence of PRP; biomaterial \times PRP_{ij} : interaction between biomaterial and presence or absence of PRP and ε_{ijk} : experimental error ($N \sim (0, s^2)$). As a statistical difference was observed, the treatments were compared using Tukey's test, using a significance level of 5%. For this, the statistical program R Studio was used. It was concluded that the experimental design and model adopted allowed the promotion of guided bone growth in calvaria of rabbits for the comparison of different treatments; the addition of platelet-rich plasma to different biomaterials (HA, bio-oss®, and bonefill®) did not promote improvement

in the bone repair process, leading to the more significant formation of myeloid tissue, less formation of bone tissue, and worsening of cell infiltration between the pores of biomaterials; concerning the different biomaterials, in the comparison between themselves without PRP, which provided the highest percentage of newly formed bone through the analyzes employed, in 90 days was bio-oss®, regarding the remaining biomaterial variable, the study did not show significant differences. However, experiments with more extended evaluation periods are necessary for this comparison, which concerns the absorption of biomaterials.

Key words: Bone healing. Biomaterials. Growth factors. Histomorphometry. Scanning electron microscopy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Histologia do tecido ósseo, evidenciando os diferentes tipos celulares, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos.....	28
Figura 2: Terapias mais utilizadas na regeneração e reparo ósseo.....	44
Figura 3: Arranjo anatômico da hidroxiapatita.....	48
Figura 4: Imagens representativas da superfície de grânulos de hidroxiapatita sinterizada a 1300°C durante 1 hora (A) e 4 horas (B). Pode-se observar que a amostra tratada durante 1 hora teve uma boa sinterização nos pontos de contato dos particulados, formando uma rede de porosidade interconectada com tamanhos submicrométricos, servindo de arcabouço para o desenvolvimento celular em meio fisiológico.....	53
Figura 5: A- Aspecto do PRP autólogo processado a partir de 3ml de sangue; B- O mesmo coágulo fracionado em três partes para a adequação em três campânulas com os diferentes biomateriais.....	85
Figura 6: Alojamento de coelhos em gaiolas suspensas com ração e água <i>ad libitum</i>	86
Figura 7: A- Contenção física do paciente para a administração de medicação pré-anestésica; B- Acesso da artéria auricular mediante anestesia e antisepsia para a coleta de sangue.....	87
Figura 8: A- Paciente em decúbito lateral direito, com acesso venoso para fluidoterapia e administração de medicamentos e máscara inserida e conectada ao sistema de Baraka. B- Modelo da máscara V-gel empregada na intubação,C- Paciente em decúbito esternal, anestesiado no sistema de baraka. D-Infiltração de anestésico local em campo cirúrgico após a antisepsia.....	88
Figura 9: A- Paciente posicionado, em plano anestésico, com campos cirúrgicos fixados; B- Periósteo sendo rebatido para a exposição óssea, mediante diérese de pele e subcutâneo prévias.....	89
Figura 10: A- Desenho representativo do dispositivo de náilon elaborado com dimensões de 5mm de altura e 10mm de diâmetro interno, formando um volume interno de 0,314cm ³ . B- Guia de crescimento de náilon. Observar orifício central através do qual era conduzida a fixação óssea mediante introdução de parafuso cortical.....	90
Figura 11: A- Campânula preenchida por biomaterial, para o implante na superfície óssea já preparada; B- Fixação da campânula com parafuso...	91
Figura 12: Sequência de campânulas fixadas contendo diferentes biomateriais, pela ordem de rostral para caudal, hidroxiapatita, bioss®, bonefill® (A, B, C); aspecto de três campânulas fixadas e início da aproximação cutânea (D) e dermorrafia concluída com fio mononáilon 2.0 (E).....	91
Figura 13: (A) Dispositivo empregado para microchipagem; (B) Conferência do procedimento no pós-operatório imediado.....	92
Figura 14: Aspecto da amostra contendo as campânulas imediatamente após a coleta. Observar tecido cicatricial envolvendo os dispositivos.....	93

Figura 15: A- Amostra fixada para remoção de parafusos e tecidos moles adjacentes. Figura: B- Aspecto da amostra após a remoção das campânulas; C- Amostra fixada para aferição de dureza.....	94
Figura 16: A- Secção da amostra com disco diamantado acoplado a motor elétrico; B- Pontos de secção para a separação dos crescimentos ósseos guiados com os diferentes biomateriais; C- Secção de um crescimento guiado para encaminhamento para estudos histológicos, histomorfométricos e de MEV.....	94
Figura 17: A e B- Amostras fixadas em stubs; C- A análise morfológica através de micrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura.....	97
Figura 18: Imagem de amostra preparada para processamento histológico em vista longitudinal (A) e transversal (B). Observar: seta azul apontando o biomaterial, linha vermelha mostrando a integração do biomaterial junto ao leito ósseo.....	97
Figura 19: Aspecto macroscópico de amostras coletadas aos 60 dias de evolução. A- Unidade experimental C1-6P. Notar presença de tecido com aparência de fibroso circundando o crescimento (seta laranja); B- Unidade experimental C3-6. Notar que parte do biomaterial permaneceu no interior da câmpanula 3 bonefill (Seta azul); C- Unidade experimental C3-6P. Notar que parte dos biomateriais permaneceram no interior das três câmpanulas (setas azuis, campânula 1, hidroxiapatita; campânula 2, bio-oss®; campânula 3, bonefill®) D- Unidade experimental C5-6P. Notar que parte dos biomateriais permaneceram no interior das três câmpanulas, (setas azuis campânula 1, idroxiapatita; campânula 2, bio-oss®; campânula 3, bonefill®).....	102
Figura 20: Imagem histológica com coloração de hematoxilina/ eosina (HE) de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias (A) e 90 dias (B) com tratamento com HA sem PRP. Observar: biomaterial remanescente (setas azuis); matriz óssea (setas verdes); osteoblastos (setas amarelas); osteócitos (setas vermelhas). Aumento 40X.....	106
Figura 21: Imagem histológica com coloração de hematoxilina/ eosina (HE) de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias (A) e 90 dias (B) com tratamento envolvendo HA acrescida de PRP. Observar biomaterial remanescente (setas azuis); matriz óssea (setas verdes); osteoblastos (setas amarelas); osteócitos (setas vermelhas); tecido mieloide (setas pretas). Aumento 40X.....	107
Figura 22: Imagem histológica com coloração de hematoxilina/ eosina (HE) de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias (A) e 90 dias (B) com tratamento com bio-oss® sem PRP. Observar: biomaterial remanescente (setas azuis); tecido conjuntivo (setas marrom); matriz óssea (setas verdes); osteoblastos (setas amarelas); tecido mieloide (setas pretas). Aumento 40X.....	107
Figura 23: Imagem histológica com coloração de hematoxilina/ eosina (HE) de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias (A) e 90 dias (B) com tratamento envolvendo bio-oss® acrescido de PRP. Observar: biomaterial	

- remanescente (setas azuis); tecido conjuntivo (setas marrom); matriz óssea (setas verdes); osteoblastos (setas amarelas); osteócitos (setas vermelhas); tecido mieloide (setas pretas). Aumento 40X..... 108
- Figura 24:** Imagem histológica com coloração de hematoxilina/ eosina (HE) de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias (A) e 90 dias (B) com tratamento com bonefill® sem PRP. Observar: biomaterial remanescente (setas azuis); tecido conjuntivo (setas marrom); osteoblastos (setas amarelas); osteócitos (setas vermelhas); tecido mieloide (setas pretas). Aumento 40X..... 108
- Figura 25:** Imagem histológica com coloração de hematoxilina/ eosina (HE) de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias (A) e 90 dias (B) com tratamento envolvendo bonefill® acrescido de PRP. Observar: biomaterial remanescente (setas azuis); tecido conjuntivo (setas marrom); matriz óssea (setas verdes); osteoblastos (setas amarelas); osteócitos (setas vermelhas); tecido mieloide (setas pretas). Aumento 40X..... 109
- Figura 26:** Imagem obtida com coloração Picrosírius de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias (A) e 90 dias (B) com tratamento com HA sem PRP. Onde: setas brancas - biomaterial remanescente (BR). Observar a presença de fibras colágenas organizadas em lamelas paralelas umas às outras e sua disposição em camadas concêntricas formando o sistema de Havers. Notar a presença de tecido ósseo imaturo e/ ou tecido conjuntivo em coloração vermelha e tecido ósseo em coloração verde. Aumento 40X... 109
- Figura 27:** Imagem obtida com coloração Picrosírius de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias (A) e 90 dias (B) com tratamento com HA acrescida por PRP. Onde: setas brancas - biomaterial remanescente (BR). Notar a presença de tecido ósseo imaturo e/ ou tecido conjuntivo em coloração vermelha e tecido ósseo em coloração verde. Aumento 40X..... 111
- Figura 28:** Imagem obtida com coloração Picrosírius de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias (A) e 90 dias (B) com tratamento com bio-oss® sem PRP. Onde: setas brancas - biomaterial remanescente (BR). Notar a presença de tecido ósseo imaturo e/ ou tecido conjuntivo em coloração vermelha e tecido ósseo em coloração verde. Aumento 40X..... 112
- Figura 29:** Imagem obtida com coloração Picrosírius de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias (A) e 90 dias (B) com tratamento com bio-oss® acrescido por PRP. Onde: setas brancas - biomaterial remanescente (BR). Notar a presença de tecido ósseo imaturo e/ ou tecido conjuntivo em coloração vermelha e escasso tecido ósseo em coloração verde. Aumento 40X..... 112
- Figura 30:** Imagem obtida com coloração Picrosírius de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias (A) e 90 dias (B) com tratamento com bonefill® sem PRP. Onde: setas brancas - biomaterial remanescente (BR). Notar a presença de tecido ósseo imaturo e/ ou tecido conjuntivo em coloração vermelha e tecido ósseo em coloração verde. Aumento 40X..... 113

- Figura 31:** Imagem obtida com coloração Picosirius de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias (A) e 90 dias (B) com tratamento com bonefill® acrescido por PRP. Onde: setas brancas - biomaterial remanescente (BR). Notar a presença de tecido ósseo imaturo e/ ou tecido conjuntivo em coloração vermelha e tecido ósseo em coloração verde. Aumento 40X..... 113
- Figura 32:** Imagem de microscopia eletrônica de varredura de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias, do tratamento com HA sem PRP. Observar: grânulos do biomaterial (setas verdes); calvária (setas vermelhas); tecido fibrocolagenoso (setas azuis; proliferações citoplasmáticas (setas amarelas); osteócitos (seta laranja). Aumentos de 20x (A), 250x (B), 1000x (C). Grupo 60 dias..... 115
- Figura 33:** Imagem de microscopia eletrônica de varredura de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias, com tratamento com HA com PRP. Observar: grânulos do biomaterial (setas verdes);calvária (setas vermelhas); tecido de aspecto membranoso (setas azuis). Aumentos de 20x (A), 250x (B), 1000x (C). Grupo 60 dias..... 116
- Figura 34:** Imagem de microscopia eletrônica de varredura de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias, do tratamento com bio-oss® sem PRP. Observar: grânulos do biomaterial (setas verdes); calvária (setas vermelhas); proliferações citoplasmáticas (setas amarelas); osteócitos (seta laranja). Aumentos de 20x (A), 250x (B), 1000x (C). Grupo 60 dias..... 118
- Figura 35:** Imagem de microscopia eletrônica de varredura de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias, do tratamento com bio-oss® com PRP. Observar: grânulos do biomaterial (setas verdes); calvária (setas vermelhas); crescimento tecidual disperso (setas brancas); presença de emaranhado desorganizado de formação tecidual (setas roxas). Aumentos de 27x (A), 250x (B), 1000x (C). Grupo 60 dias..... 119
- Figura 36:** Imagem de microscopia eletrônica de varredura de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias, do tratamento com bonefill® sem PRP. Observar: grânulos do biomaterial (setas verdes); calvária (setas vermelhas); formação fibrocolagenosa (setas azuis); proliferações citoplasmáticas (setas amarelas). Aumentos de 20x (A), 250x (B), 1000x (C). Grupo 60 dias..... 121
- Figura 37:** Imagem de microscopia eletrônica de varredura de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias, do tratamento com bonefill® com PRP. Observar: grânulos do biomaterial (setas verdes); calvária (setas vermelhas); formação tecidual de aspecto desorganizado (setas roxas). Aumentos de 20x (A), 250x (B), 1000x (C). Grupo 60 dias..... 122
- Figura 38:** Imagem de microscopia eletrônica de varredura de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 90 dias, do tratamento com HA sem PRP. Observar: grânulos do biomaterial (setas verdes); calvária (setas vermelhas);

fibrocolagenoso (setas azuis); proliferações citoplasmáticas (setas amarelas). Aumentos de 20x (A), 250x (B), 1000x (C). Grupo 90 dias.....	124
Figura 39: Imagem de microscopia eletrônica de varredura de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 90 dias, do tratamento com HA com PRP. Observar: grânulos do biomaterial (setas verdes); calvária (setas vermelhas); tecido fibrocolagenoso (setas azuis); proliferações citoplasmáticas (setas amarelas). Aumentos de 20x (A), 250x (B), 1000x (C). Grupo 90 dias.....	125
Figura 40: Imagem de microscopia eletrônica de varredura de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 90 dias, do tratamento com bio-oss® sem PRP. Observar: grânulos do biomaterial (setas verdes); calvária (setas vermelhas); tecido fibrocolagenoso (setas azuis); proliferações citoplasmáticas (setas amarelas); presença de osteócitos (seta laranja). Aumentos de 20x (A), 250x (B), 1000x (C). Grupo 90 dias.....	127
Figura 41: Imagem de microscopia eletrônica de varredura de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 90 dias, do tratamento com bio-oss® com PRP. Observar: grânulos do biomaterial (setas verdes); calvária (setas vermelhas); crescimento tecidual disperso (setas brancas); presença de emaranhado desorganizado de formação tecidual (setas roxas). Aumentos de 20x (A), 250x (B), 1000x (C). Grupo 90 dias.....	128
Figura 42: Imagem de microscopia eletrônica de varredura de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 90 dias, do tratamento com bonefill® sem PRP. Observar: grânulos do biomaterial (setas verdes) implantados em calvária de coelhos (setas vermelhas); tecido fibrocolagenoso (setas azuis); presença de osteócitos (seta laranja marrom). Aumentos de 20x (A), 250x (B), 1000x (C). Grupo 90 dias.....	130
Figura 43: Imagem de microscopia eletrônica de varredura de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 90 dias, do tratamento com bonefill® com PRP. Observar: grânulos do biomaterial (setas verdes) implantados em calvária de coelhos (setas vermelhas), envolvidos por tecido fibrocolagenoso (setas azuis); presença de emaranhado desorganizado de formação tecidual (setas roxas). Aumentos de 20x (A), 250x (B), 1000x (C). Grupo 90 dias.	131

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Requisitos e propriedades necessárias ao uso da HA.....	47
Quadro 2: Diferentes formas da HA e suas respectivas aplicações em medicina e odontologia.....	55
Quadro 3: Características dos biomateriais comerciais empregados no presente trabalho.....	61
Quadro 4: Fatores de crescimento e citocinas envolvidas na regeneração tecidual.....	68
Quadro 5: Protocolos para a obtenção do PRP, segundo diferentes autores.....	70
Quadro 6: Demonstração do delineamento experimental.....	82
Quadro 7: Modelo de critérios de avaliação histológica baseado em atribuição de cruzes para a quantificação de biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), presença de osteoblastos (POT), formação de tecido mieloide (FTM), presença de macrófagos (MA) e neoformação vascular (NFV).....	95
Quadro 8: Incrementos obtidos nas contagens de plaquetas (em vezes) através dos diferentes métodos (hemocitômetro, automatizado, lâmina) em relação a contagem basal de cada unidade experimental.....	100
Quadro 9: Resultados obtidos na avaliação de dureza das amostras do grupo 60 dias de avaliação, sem PRP.....	102
Quadro 10: Resultados obtidos na avaliação de dureza das amostras do grupo 60 dias de avaliação, com PRP.....	103
Quadro 11: Resultados obtidos na avaliação de dureza das amostras do grupo 90 dias de avaliação, sem PRP.....	103
Quadro 12: Resultados obtidos na avaliação de dureza das amostras do grupo 90 dias de avaliação, com PRP.....	103
Quadro 13: Resultados comparativos obtidos na avaliação de dureza das amostras dos grupos 60 dias de avaliação, com e sem PRP.....	104
Quadro 14: Avaliação histológica das amostras obtidas de pacientes dos grupos 60 dias de avaliação pós-operatória, sendo cinco com os biomateriais acrescidos por PRP (C1-6P a C5-6P) e cinco com tratamento somente com biomateriais (C1 6 a C5 6). Onde: HA- hidroxiapatita; BIO- bioss®; BON- bonefill®.....	105
Quadro 15: Avaliação histológica das amostras obtidas de pacientes dos grupos 90 dias de avaliação pós-operatória, sendo cinco com os biomateriais acrescidos por PRP (C1-9P a C5-9P) e cinco com tratamento somente com biomateriais (C1-9 a C5-9). Onde: HA- hidroxiapatita; BIO- bioss®; BON- bonefill®.....	105
Quadro 16: Numeração da sequência de figuras de resultados histológicos conforme os tratamentos que representam.....	106
Quadro 17: Numeração da sequência de figuras de resultados histomorfométricos conforme os tratamentos que representam.....	110
Quadro 18: Numeração da sequência de figuras de resultados de MEV conforme os tratamentos que representam.....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados obtidos das contagens de plaquetas basais e do plasma rico em plaquetas de cada unidade experimental.....	99
Tabela 2. Teste de comparação de média de Tukey entre os tratamentos avaliados para variável dureza (em unidades da escala Shore) nos 60 e 90 dias após as intervenções.....	132
Tabela 3: Teste de comparação de medianas entre os tratamentos avaliados para as variáveis histológicas nos períodos 60 e 90 após as intervenções.....	132
Tabela 4: Frequência relativa para a variável biomaterial remanescente (BR) nos períodos 60 e 90 após as intervenções.....	134
Tabela 5: Teste de comparação de média de Tukey entre os tratamentos avaliados para as variáveis histomorfométricas (tipo I) nos períodos 60 e 90 após as intervenções.....	136
Tabela 6. Teste de comparação de média de Tukey entre os tratamentos avaliados para as variáveis histomorfométricas (tipo III) nos dias 60 e 90 após a intervenção.....	137

LISTA DE ABREVIATURAS

aFGF	fator de crescimento fibroplástico a
bFGF	fator de crescimento fibroplástico b
<i>ad libitum</i>	à vontade
anti-SDE-1	antagonista do fator um de células derivadas do estroma
BID	duas vezes ao dia
BMPs	proteínas morfogenéticas ósseas
CAM	concentração alveolar mínima
CAV	Centro de Ciências Agroveterinárias
CCT	Centro de Ciências Tecnológicas
CETEA	Comitê de Ética e Experimentação Animal
CGF	fator de crescimento derivado do cimento
CONCEA	Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal
CT	células-tronco
CTMadp	células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo
CTMs	células-tronco mesenquimais
EO	enxertia óssea
FCMMO	fração celular mononuclear de medula óssea
FGF	fator de crescimento de fibroblastos
GDF	fator de crescimento e diferenciação
HA	hidroxiapatita
IGF	fator de crescimento insulínico
IL	interleucina
IL-1RI	receptor de interleucina I
IL-1RII	receptor de interleucina II
LABOPAVE	Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Catarina
MCSF	fator estimulante de colônia de macrófagos
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MO	microscopia óptica
n6	náilon 6

noggin	antagonista de proteínas morfogenéticas
OPG	osteoprogesterina
PBS	soro fetal bovino
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE-1	prostaglandina 1
PGE-2	prostaglandina 2
PTHRP	proteínas relacionadas ao paratormônio
RANKL	receptor ativador do núcleo do fator kappa β ligante
RNAm	ácido ribonucleico mensamgeiro
ROG	regeneração óssea guiada
SDE-1	fator um de células derivadas do estroma
SID	uma vez ao dia
TGF β	fator de crescimento transformador tipo beta
TID	três vezes ao dia
TNF α	fator de necrose tumoral alfa
TNFR1	receptor expresso por osteoblastos
TNFR2	receptor expresso por osteoblastos
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
VEGF	fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	24
2- REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2- 1 Reparação óssea.....;	25
2- 1- 1 Tecido ósseo.....	25
2- 1- 2 Composição óssea.....	25
2- 1- 3 Anatomia óssea.....	26
2- 1- 3- 1 Vascularização óssea.....	26
2- 1- 3- 2 Histologia óssea.....	27
2- 1- 4 Fases da reparação óssea.....	29
2- 1- 4- 1 Resposta inflamatória aguda.....	30
2- 1- 4- 2 Superfamília do fator de crescimento transformador beta (TGF- β) na cicatrização da fratura.....	31
2- 1- 4- 2- 1 Proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs).....	32
2- 1- 4- 2- 2 Fator de crescimento transformador beta (TGF- β).....	33
2- 1- 4- 3 Recrutamento de células tronco mesenquimais (CTMs).....	34
2- 1- 4- 4 Formação de um calo ósseo cartilaginoso e periosteal.....	34
2- 1- 4- 5 Mineralização e reabsorção do calo cartilaginoso.....	36
2- 1- 4- 6 Revascularização e neoangiogênese no local a fratura.....	37
2- 1- 4- 7 Remodelação óssea.....	38
2- 2 Crescimento ósseo guiado.....	39
2- 3 Biomateriais substitutos ósseos.....	42
2- 3- 1 Hidroxiapatita.....	46
2- 3- 1- 1 Composição química da hidroxiapatita.....	47
2- 3- 1- 2 Obtenção de hidroxiapatita.....	48
2- 3- 1- 3 Métodos de caracterização da hidroxiapatita.....	50
2- 3- 1- 4 Aplicações da hidroxiapatita.....	52
2- 3- 1- 5 Hidroxiapatita em cicatrização óssea.....	53
2- 3- 2 Bio-oss® e bonefill®.....	57
2- 4 Promotores do crescimento ósseo.....	62
2- 4- 1 Plasma rico em plaquetas (PRP).....	62
2- 4- 1- 1 Obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP).....	65

2- 4- 1 -2 Aplicações de plasma rico em plaquetas (PRP).....	66
2- 4- 1- 3 Plasma rico em plaquetas em cicatrização óssea.....	67
3- 5 Biomateriais e plasma rico em plaquetas (PRP).....	68
2- 6 Análises empregas para o estudo da neoformação óssea.....	71
2- 6- 1 Análise histológica.....	71
2- 6- 2 Análise histomorfomérica.....	72
2- 6- 3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	73
2- 6- 4 Dureza Shore A.....	74
3- OBJETIVOS.....	77
3-1 Objetivo geral.....	77
3-2 Objetivos específicos.....	77
4- MATERIAL E MÉTODOS.....	78
4- 1- Biomateriais estudados.....	80
4-1- 1 Hidroxiapatita.....	80
4- 1-2 Bio-oss®.....	80
4-1-3 Bonefill®.....	81
4- 2- Plasma rico em plaquetas (PRP).....	81
4- 2- 1 Obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP).....	81
4- 2- 2 Contagem do número de plaquetas.....	82
4- 3 Modelos experimentais.....	82
4- 4 Procedimentos anestésicos e cirúrgicos.....	83
4-4-1 Preparo pré-operatório.....	83
4-4-2 Medicação pré-anestésica	84
4-4-3 Indução e manutenção anestésica.....	84
4-4-4 Técnica operatória.....	86
4-4-5 Pós-operatório..... ;	89
4-5 Preparo das amostras.....	90
4-5-1 Avaliação histológica.....	92
4- 5- 2 Histomorfometria.....	93
4- 5- 3 Avaliação através de microscopia eletrônica de varredura (MEV).	94
4- 6 Análise estatística.....	95
4- 6- 1 Teste de dureza.....	95

4- 6- 2 Análise histológica.....	95
4- 6- 3 Análise histomorfométrica.....	96
5- Resultados.....	97
5- 1 Plasma rico em plaquetas.....	97
5- 2 Procedimentos anestésicos.....	97
5- 3 Procedimentos cirúrgicos.....	98
5- 4 Crescimento ósseo guiado – avaliação macroscópica.....	98
5- 5 Avaliação de dureza.....	99
5- 6 Análise histológica	99
5- 7 Análise histomorfométrica.....	110
5- 8 Microscopia eletrônica de varredura.....	103
5- 9 Análise estatística.....	109
5- 9- 1 Análise histológica.....	109
5- 9- 2 Análise histomorfométrica.....	110
6-DISCUSSÃO.....	117
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	122
REFERÊNCIAS.....	121

....,

1 INTRODUÇÃO

A consolidação óssea após osteotomias, alongamentos ósseos, em artrodeses e outras complicações do processo de reparação, como osteomielite, não união óssea, retardo na cicatrização, continuam sendo um desafio em traumatologia e ortopedia, devido a vários fatores, que podem ser divididos em locais ou sistêmicos. Fatores locais incluem grau de energia causadora do trauma, vascularização sanguínea da região acometida, tipo de osso fraturado (esponjoso ou cortical), presença de infecção, falta de imobilização rígida do segmento ósseo; como fatores sistêmicos estão: diabetes melitus, doenças nutricionais e oncológicas, uso de corticosteroides, imunodepressão e idade. Nessas situações podemos ter complicações frequentes ao tratamento como o retardo de consolidação e pseudoartrose (CROCI *et al.*, 2003).

Apesar da efetividade de enxertos ósseos na consolidação óssea, quer sejam do mesmo indivíduo ou não, os mesmos possuem algumas limitações como: quantidade a ser obtida, maior tempo operatório e trauma adicional ao local doador nos autoenxertos (esponjosos), risco de transmissão de doenças, reações imunológicas e necessidade de manutenção de um banco de ossos em casos de aloenxertos (corticais) (KIRKER-HEAD *et al.*, 1995).

Vários materiais sintéticos já foram estudados como alternativas para substituir enxertos ósseos, incluindo: coral natural, hidroxiapatita, fosfatotricálcico e polímeros sintéticos, em estudos experimentais e clínicos, sendo estes considerados osteocondutores (EINHORN *et al.*, 1984).

O processo de produção de tecido ósseo a partir de células indiferenciadas, osteoindução, vem sendo muito estudado, principalmente no que tange ao emprego de proteínas indutoras de tecido ósseo e outros fatores de crescimento, os quais poderão ainda ser associados aos enxertos ósseos e biomateriais através da administração local ou de maneira sistêmica (KIRKER-HEAD *et al.*, 1995). O sistema de reação consiste de células do tecido mesenquimal com capacidade de se tornarem osteoblastos (TUOMINEN *et al.*, 2001).

Proteínas de baixo peso molecular podem ser extraídas da matriz óssea desmineralizada, as quais são nomeadas de proteínas ósseas morfogenéticas

(Bone Morphogenetic Proteins – BMP). As células mesenquimais não especializadas que se diferenciam em células formadoras de osso, em resposta a estimulação das proteínas morfogenéticas são denominadas células osteoprogenitoras indutíveis, estando presentes em abundância nos tecidos músculoesquelético e conjuntivo, locais onde a formação de osso parece poder ser induzida com maior facilidade (FORELL & STRAW, 1993).

Muitos estudos pesquisam o isolamento dos fatores osteoindutores e seu uso individualmente ou associados com biomateriais. O objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade osteoindutiva do plasma rico em plaquetas autólogo em associação com diferentes biomateriais (hidroxiapatita, bio-oss® e bonefill®) durante o processo de neoformação óssea, em crescimento ósseo promovido através do uso de campânulas em calvárias de coelhos, em diferentes tempos de evolução.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2- 1 Reparação óssea

Em função da sua capacidade regenerativa o tecido ósseo é, em muitas situações, capaz de restabelecer perfeitamente sua anatomia e suas propriedades mecânicas. No entanto, a capacidade regenerativa do tecido ósseo tem limites podendo não ser efetiva em certos casos. Algumas situações como falhas de vascularização, defeitos de tamanho crítico e a invasão de tecidos moles adjacentes podem explicar estas complicações (PIERI *et al.* 2010).

2- 1- 1 Tecido ósseo

2- 1- 2 Composição óssea

O osso é constituído basicamente por dois tipos de componentes: orgânicos e inorgânicos. A porção orgânica é formada por células (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos), fibras colágenas e substância base (proteoglicanos e glicoproteínas). A parcela orgânica da matriz óssea é formada principalmente pelos osteoblastos. O principal componente inorgânico é o fosfato de cálcio, responsável por dois terços do peso ósseo. O fosfato de cálcio interage com o hidróxido de cálcio transformando-se em hidroxiapatita. Conforme ocorre a

formação dos cristais de hidroxiapatita, outros materiais inorgânicos como o carbonato de cálcio, sódio, magnésio e fluoreto vão se incorporando a ele (CONSTANTINESCU, 2002). A hidroxiapatita (HA) é um constituinte mineral natural encontrado no osso, representando 30 a 70% da massa óssea e dentes (COSTA et al., 2009; RIGO et al., 2007).

2- 1- 3 Anatomia óssea

No desenvolvimento dos ossos longos, chamamos o corpo do osso de diáfise e as extremidades de epífises. A diáfise é formada por medula óssea circundada por osso compacto, que constitui uma densa barreira protetora. Geralmente mais larga que a diáfise, a epífise é formada principalmente de osso esponjoso, o qual é constituído por uma trama de ossos trabeculares e medula óssea amarela ou vermelha, bem como uma fina e externa camada de osso compacto. Nos ossos em crescimento, o ponto de união da diáfise com a epífise é denominado metáfise. Nesta junção, existe uma placa de crescimento formada por cartilagem hialina, chamada de placa epifiseal ou fise de crescimento. Quando o processo de desenvolvimento é finalizado, a placa epifiseal é substituída pela linha epifiseal (MARIEB & MALLATTI, 2003; FOSSUM 2005).

A superfície articular é constituída por uma fina camada de cartilagem hialina, a qual recobre a epífise dos dois ossos que mantêm contato. A superfície externa do osso não coberta por cartilagem articular está envolta por periósteo, que é constituído por membrana conjuntiva densa irregular e unido à base óssea pelas fibras de Sharpey, oriundas das fibras presentes na matriz óssea. O periósteo contém fibras nervosas, vasos linfáticos e sanguíneos. A superfície interna do osso é recoberta pelo endósteo, o qual envolve a cavidade medular dos ossos longos e as trabéculas dos ossos esponjosos (CONSTANTINESCU, 2002; MARIEB & MALLATTI, 2003).

2- 1- 3- 1 Vascularização óssea

A fisiologia óssea interna bem como os processos de reparação, dependem de um suporte sanguíneo adequado. Em ossos longos íntegros, a

circulação consiste de suprimento aferente da artéria nutriente principal, artérias metafiseais proximal e distal e artérias periosteais que penetram no osso em áreas de forte ligação fascial. O fluxo sanguíneo segue do canal medular para o periôsteo, ou seja, em direção centrífuga e a pressão medular, possivelmente, restringirá o fluxo sanguíneo periosteal para o terço externo do córtex. Em animais imaturos, encontramos inúmeras artérias em sentido longitudinal, que penetram no osso de formação recente, sobre a superfície periosteal. A metáfise e a epífise recebem suporte sanguíneo separadamente e não se comunicam através da fise cartilaginosa. A porção da circulação responsável pela nutrição da zona celular da reserva cartilaginosa e células fiseais em crescimento é o suprimento sanguíneo da epífise. A interrupção do aporte sanguíneo dessa porção resulta na morte das células em crescimento e suspensão da função fiseal. Entretanto, as células que participam da ossificação endocondral são supridas a partir das artérias metafiseais (FOSSUM, 2005).

2- 1- 3- 2 Histologia óssea

A unidade estrutural do osso compacto é denominada ósteon ou sistema haversiano. Cada ósteon aparece como uma unidade cilíndrica lamelar de matriz óssea que envolve os canais de Havers. O sistema haversiano corre paralelo ao eixo longo do osso e carrega pequenas artérias e veias. O canal de Volkmann se dispõe perpendicularmente ao eixo longo do osso, e está ligado a circulação sanguínea e aos nervos do periôsteo através do canal de Havers. Os canais de Havers e de Volkmann conectam a cavidade medular óssea a circulação por intermédio dos vasos sanguíneos, formando caminhos para que as células sanguíneas possam atingir a circulação (AKERS & DEBOW, 2008).

Encontramos nos ossos quatro principais tipos celulares (Figura 1): os osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e as células osteoprogenitoras (ANDIA, 2006; AKERS & DEBOW, 2008.).

Figura 1: Histologia do tecido ósseo, evidenciando os diferentes tipos celulares, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos.



Fonte: <http://www.https://anatomia-papel-e-caneta.com/tecido-osseo/osteoclastos-e-osteoblastos-3/> (acesso em 15/04/2023)

Osteoblastos são células secretoras de matriz óssea extracelular, além de colágeno e substâncias que constituem o osso não mineralizado. Durante a formação óssea, os osteoblastos secretam a matriz óssea. Porém, estas células mantêm contato com outra via de conexões que contém junção comunicante. Conforme a matriz endurece, os osteoblastos amadurecem e tornam-se osteócitos (ANDIA, 2006; AKERS & DEBOW, 2008).

Os osteócitos são células ósseas maduras de maior população, com formato de aranha, encontradas em pequenas cavidades das junções lamelares chamadas de lacunas. Somente um osteóctito é encontrado por lacuna e essas células não podem se dividir. Numerosos processos alongam-se de cada osteóctito para dentro dos canalículos, passando rapidamente pela matriz de mineralização e se conectando a uma lacuna adjacente. Portanto há uma rede de comunicação entre o canalículo e a lacuna, fazendo com que o processo ocorra em todo o osso mineralizado. O canalículo é importante porque é dele que provém a rota pela qual o(s) processo(s) de um osteóctito pode(m) se contactar aos outros adjacentes. Logo, todos os osteócitos são capazes de se comunicar entre si, carregando informações e nutrientes. Os osteócitos podem sintetizar ou absorver a matriz óssea e, caso sejam destruídos, a reabsorção da

matriz óssea ocorre devido a atividade do osteoclasto, que é sucedida pela reparação ou remodelação através da atividade osteoblástica (AKERS & DEBOW, 2008).

Os osteoclastos são células multinucleadas gigantes envolvidas na reabsorção do osso estando presentes em áreas nas quais o osso está sendo removido. O osso também contém um pequeno número de células mesenquimais conhecidas como células osteoprogenitoras, que estão localizadas na camada celular do periôsteo, no endósteo e na linha vascular de passagem da matriz medular. São dessas células que se originam os osteoblastos, sendo importantes para a reparação das fraturas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; ANDIA, 2006; AKERS & DEBOW, 2008).

2- 1- 4 Fases da reparação óssea

Histologicamente, em todos os animais nos quais a neoformação óssea foi observada, o osso recém-formado apresentou aspecto imaturo, acompanhado de intensa formação vascular e fibras colágenas organizadas irregularmente. Ao longo do tempo, o osso adquire aspecto de “osso maduro”, podendo-se identificar a presença de osteócitos e uma aparente estabilidade (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). O osso consolida formando um regenerado com basicamente todas as propriedades do tecido antigo, principalmente em jovens, o que lhe confere uma característica especial (EINHORN, 1998).

A consolidação indireta ou secundária é a forma mais comum de cicatrização das fraturas, e consiste de uma cicatrização óssea endocondral e intramembranosa (GERSTENFELD & ALKHIARY 2006). É caracterizada pela formação de um calo intermediário antes da formação do calo ósseo. Não exige redução anatômica e estabilização do foco de fratura. Pelo contrário, o foco de fratura é reforçado por micro movimentos. No entanto, muito movimento e/ou carga pode resultar em um atraso na cicatrização, ou até mesmo uma não união óssea. A cicatrização óssea indireta ocorre normalmente no tratamento não cirúrgico de fraturas, e em determinados tratamentos cirúrgicos em que ocorrem alguns movimentos no local da fratura, como a fixação intramedular, fixação

externa ou fixação interna de fraturas cominutivas complicadas (PERREN, 2002).

Na execução dos estudos envolvendo regeneração óssea as avaliações histomorfométricas são muito úteis para a análise de regeneração óssea, de modo análogo aos estudos de Borie *et al.* (2001) e Kim *et al.* (2012).

A consolidação das fraturas segue uma sequência bem determinada de fases contínuas e que se superpõem, podendo resumidamente serem divididas e quantificadas em termos do tempo total de consolidação em fase inflamatória (10%), fase de reparação (40%) e fase de remodelação (70%) (FROST, 1989).

Inicialmente há uma fase de resposta inflamatória imediata que leva ao recrutamento de células-tronco mesenquimais e subsequente diferenciação em condrócitos que produzem cartilagens e osteoblastos, que formam o osso. Depois é produzida uma matriz cartilaginosa, que mineraliza, e ocorre uma transição para osso, com início da reabsorção da cartilagem mineralizada. A formação do osso primário é seguida por remodelação, em que o calo ósseo inicial é modificado por formação e reabsorção óssea secundária para restaurar a estrutura anatômica capaz de suportar cargas mecânicas (GERSTENFELD, 2003).

Dessa forma, o reparo da fratura relembra o desenvolvimento embrionário normal com a participação coordenada de vários tipos de células provenientes do córtex, periôsteo, tecidos moles circundantes e medula óssea (GERSTENFELD, 2003).

2- 1- 4- 1 Resposta inflamatória aguda

Imediatamente após o trauma, ocorre a formação de um hematoma que é constituído por células do sangue periférico e intramedulares, bem como células da medula óssea. Esta resposta inflamatória inicial é fundamental para o processo de cicatrização. A resposta inflamatória faz com que o hematoma coagule entre e ao redor das extremidades da fratura, e dentro da medula formando um modelo para a formação do calo ósseo. Embora esteja claro que uma expressão prolongada e crônica de citocinas inflamatórias tem um efeito

negativo no osso, nas articulações e em presença de materiais implantados, uma secreção rápida e bem regulada de moléculas pró-inflamatórias após uma lesão aguda é fundamental para a regeneração do tecido (CARANO & FIRVAROFF, 2003; GERSTENFELD, 2003).

A resposta inflamatória aguda atinge seu pico nas primeiras 24 horas e se completa após sete dias, embora as moléculas pró-inflamatórias mais tarde continuem desempenhando um papel importante no final da regeneração (CHO *et al.*, 2006).

A resposta pró-inflamatória inicial envolve a secreção do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina (IL), IL-1, IL-6, IL-11 e IL-18, por macrófagos, células inflamatórias e células de origem mesenquimais. Esses fatores recrutam células inflamatórias, aumentam a síntese da matriz extracelular e estimulam a angiogênese (GERSTENFELD, 2003).

Reiterando, o pico de concentração dessas citocinas pode ser observado com 24 horas e retornam aos valores normais dentro de 72 horas após o trauma (CHO *et al.*, 2006; GERSTENFELD, 2003).

2- 1- 4- 2 Superfamília do fator de crescimento transformador beta (TGF- β) na cicatrização da fratura

Fatores de crescimento são proteínas secretadas por determinadas células que agirão em células alvo específicas, levando a uma ação igualmente específica. Existem três tipos de ação dos fatores de crescimento, de forma que podem ser classificados em: a) autócrinos, nos quais os fatores de crescimento agem nas células originais ou em outras células com o mesmo fenótipo, b) parácrinos, nos quais os fatores de crescimento agem em células vizinhas, porém com fenótipo diferente; e c) endócrinos, nos quais os fatores de crescimento agem em células com outro fenótipo e localizadas à distância. Portanto o fator de crescimento pode ter efeitos em múltiplas células e induzir várias funções em vários tecidos (LIEBERMAN *et al.*, 2002).

Os fatores de crescimento que agem na consolidação óssea são as proteínas morfogenéticas ósseas (BPMs), o fator de crescimento de fibroblastos

(FGF), o fator de crescimento transformador tipo beta (TGF- β), o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator de crescimento insulínico (IGF), as prostaglandinas (PGE-1 e PGE-2), as somatomedinas, o fator de crescimento epidermal, os fatores angiogênicos, a fibronectina, as interleucinas 1 e 2 (IL-1 e IL-2), o fator ativador de osteoclastos, as bradicininas e o fator de necrose tumoral (LIEBERMAN et al., 2002; CROCI et al., 2003).

2- 1- 4- 2- 1 Proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs)

Durante o reparo da fratura, são produzidas BMPs por células mesenquimais, osteoblastos e condrócitos. As diversas BMPs funcionam independentemente ou em colaboração umas com as outras, bem como com outros membros da superfamília TGF- β , para desencadear uma cascata de eventos que promovem a formação de cartilagem e osso. Os processos celulares estimulados incluem quimiotaxia, proliferação e diferenciação de células mesenquimais, angiogênese e síntese da matriz extracelular (BOSTROM et al., 1996; SAKOU, 1998).

Apesar das diversas BMPs estarem estruturalmente e funcionalmente relacionadas, elas exibem diferentes padrões de expressão nos diferentes estágios da consolidação da fratura, com base nos experimentos realizados em animais. Em estudos com murinos a consolidação da fratura mostrou níveis máximos da expressão de RNAm de BMP-2 dentro de 24 horas após a lesão, sugerindo que estas desempenham seu papel no início do reparo. Corroborando com estes achados, estudos recentes mostram que a BMP-2 é necessária para a reparação óssea pós-natal e está geneticamente associada com a manutenção da massa óssea normal. Ao contrário, a BMP-2 aparentemente não é necessária para a formação embriológica dos ossos (TSUJI et al., 2006).

Outros estudos *in vitro* examinam a diferenciação do estroma das células-tronco medulares e mostram que a BMP-2 controla a expressão de vários outras BMPs e quando sua atividade é bloqueada, os estromas de células-tronco medulares não conseguem se diferenciar em osteoblastos (KIRKER-HEAD, 1995).

As BMP-3, BMP-4, BMP-7 e BMP-8 se expressam por um limitado período durante a cicatrização da fratura (14 a 21 dias), quando a reabsorção da cartilagem calcificada e o recrutamento osteoblástico são ativados, e ocorre a formação óssea. BMP-5 e BMP-6 e outros membros da superfamília do TGF- β são expressos de três a 21 dias durante a fratura em camundongos, sugerindo que tenham um efeito regulador em ambas as ossificações intramembranosa e endocondral. Tem sido proposto que a BMP-2, BMP-6 e BMP-9 podem ser os indutores mais potentes da diferenciação de células mesenquimais para osteoblastos, enquanto as BMPs restantes promovem a maturação dos osteoblastos comprometidos (CHENG & JIANG, 2003).

Os antagonistas de BMPs também desempenham um papel importante na reparação da fratura. Yoshimura et al. (2001) afirmaram que a expressão de noggin bloqueia BMP-2, BMP-4 e BMP-7, e é modulada durante a consolidação da fratura. O padrão da expressão de noggin é semelhante a de BMP-4, sugerindo que o equilíbrio noggin/ BMP-4 poderia ser um fator importante na regulação da formação de calos durante a cicatrização da fratura. Na ausência de noggin, há excesso de osso e formação de cartilagem durante o desenvolvimento, indicando que o noggin desempenha um papel importante na limitação da formação destes tecidos (CHO et al., 2006).

2- 1- 4- 2- 2 Fator de crescimento transformador beta (TGF- β)

Todas as três isoformas (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3) deste grupo de proteínas estão envolvidas no reparo da fratura. Elas são produzidas por degranulação plaquetária após a lesão inicial, o que sugere o seu envolvimento com o início da formação de calos (BOLANDER, 1992). Certas proteínas também são produzidas pelos osteoblastos e condrócitos em fases posteriores, o que aumenta a proliferação destas células, bem como a de células mesenquimais e pré-osteoblastos (LIEBERMAN et al., 2002).

O TGF- β exerce um papel importante na condrogênese e formação endocondral. Ele também induz a expressão de proteínas da matriz extracelular. Em ratos, expressão de TGF- β 2 e TGF- β 3 atinge seu pico sete dias após a fratura, quando a expressão de colágeno tipo II se eleva, e parece estar

associada a formação de cartilagem. A expressão de TGF- β 1 permanece constante durante todo o processo de cicatrização da fratura. Isto sugere que o TGF- β 2 e TGF- β 3 podem desempenhar o papel mais importante durante o processo de cicatrização da fratura, uma vez que o pico de expressão ocorre durante a fase crítica da condrogênese (CHO *et al.*, 2006).

2- 1- 4- 3 Recrutamento de células-tronco mesenquimais (MSCs)

Para o osso se regenerar, células-tronco mesenquimais específicas devem ser recrutadas, proliferar, e se diferenciar em células osteogênicas. O local exato de onde essas células vêm não é totalmente esclarecido. A maioria dos dados indica que estas MSCs são derivadas da medula óssea e de tecidos moles adjacentes. Pesquisas recentes demonstram que o processo de recrutamento e circulação das MSCs para o local da injúria possa ser de grande importância para uma cicatrização ideal (GRANERO-MOLTO *et al.*, 2009; KITAORI *et al.*, 2009). A proteína óssea morfogenética-2 (BMP-2) tem um importante papel neste recrutamento, sendo essencial para a reparação óssea (TSUJI *et al.*, 2006; BAIS *et al.*, 2009). Outras BMPs, tais como a BMP-7 podem desempenhar um papel mais importante no recrutamento de células progenitoras (BAIS *et al.* 2009). Sugere-se que o fator-1 de células derivadas do estroma (SDF-1) e proteína-G acoplado ao receptor CXCR-4 formam um eixo (SDF-1/CXCR-4) que é um regulador chave de recrutamento específico das MSCs para o local do trauma (GRANERO-MOLTO *et al.*, 2009; KITAORI *et al.*, 2009).

Estudos mostram que a expressão de SDF-1 está aumentada no local da fratura, especialmente no periôsteo presente nas bordas da solução de continuidade óssea. A SDF-1 tem um papel específico no recrutamento de CXCR-4 expressando MSCs para o local da fratura durante a fase de cicatrização endocondral (KITAORI *et al.*, 2009). A importância deste eixo foi verificada durante um tratamento utilizando um antagonista anti-SDF-1 ou uma manipulação genética de SDF-1-4 e CXCR que demonstrou ser prejudicial para a consolidação da fratura (GRANERO-MOLTO *et al.*, 2009; KITAORI *et al.*, 2009).

2- 1- 4- 4 Formação de calo ósseo cartilaginoso e periosteal

Embora a consolidação da fratura consista de uma ossificação intramembranosa e endocondral, ocorre a formação de um calo cartilaginoso, que posteriormente sofre mineralização, reabsorção e é então substituído por osso que é a característica principal deste processo. Após a formação do hematoma primário, é formado um tecido de granulação rico em fibrina. Dentro desses tecidos, ocorre a formação endocondral entre as extremidades da fratura e o periôsteo. Essas regiões são mecanicamente menos estáveis e o tecido cartilaginoso forma um calo que promove maior estabilidade na região da fratura (DIMITRIOU & ELEFTHERIOS, 2005).

Em modelos animais (ratos, coelhos e camundongos) o pico de formação de calos moles ocorre em 7 a 9 dias após o trauma, com um aumento de pró-colágeno tipo II e de marcadores nucleares de proteoglicanos de proteínas extracelulares (EINHORN, 1998). Ao mesmo tempo, ocorre uma resposta subperiosteal de ossificação intramembranosa diretamente adjacente às extremidades distais da fratura, formando um calo duro. A transição do calo duro para o centro da fratura, fornece uma estrutura semirrígida que permite a sustentação do peso (GERSTENFELD & ALKHIARY, 2006).

A formação dos calos é dependente do recrutamento de MSCs dos tecidos moles adjacentes, córtex, periôsteo e medula óssea, bem como da mobilização sistêmica de células-tronco hematopoiéticas. Uma vez recrutadas, uma cascata molecular produz matriz de colágeno tipo I e de colágeno tipo II e sinaliza a participação de várias moléculas de peptídeos. Neste processo os integrantes da família do TGF- β têm se mostrado de grande importância. O TGF- β 2, TGF- β 3 e GDF-5 estão envolvidos na condrogênese e na ossificação endocondral, enquanto que BMP-5 e BMP-6 podem induzir proliferação celular na ossificação intramembranosa do periôsteo local (CHO *et al.*, 2006; MARSELL & EINHORN, 2009).

Além disso, como mencionado anteriormente, a BMP-2 tem se mostrado crucial no início do processo de cicatrização, como observado em camundongos com mutações inativadoras de BMP-2 que não são capazes de formar calos, impedindo a cicatrização das fraturas com sucesso (TSUJI *et al.*, 2006).

2- 1- 4- 5 Mineralização e reabsorção do calo cartilaginoso

Para que a regeneração óssea progride, o calo mole principal precisa ser reabsorvido e substituído por um calo ósseo. Esta etapa da consolidação da fratura, em certo ponto, lembra o desenvolvimento ósseo embriológico com uma combinação de proliferação e diferenciação celular, com aumento do volume celular e aumento da deposição de matriz (YUKO & HABAS, 2008).

A ligação entre a regeneração óssea e o desenvolvimento ósseo foi reforçada por um recente entendimento do papel da família de moléculas Wnt, que é de grande importância na embriologia e também mostrou ter um papel relevante na cicatrização óssea. Acredita-se que família Wnt regula a diferenciação de MSCs pluripotentes em linhagem osteoblástica, e em estágios mais avançados de desenvolvimento regula de forma positiva a formação óssea osteoblástica (CHEN & ALMAN, 2009). A via de sinalização Wnt (ou via de Wnt, via de transdução Wnt) regula diversos fenômenos e eventos durante o desenvolvimento embrionário como a organogênese, diferenciação, polarização e migração celular. Recentemente a via Wnt foi relacionada com a renovação de células-tronco (YUKO & HABAS, 2008).

No calo de fratura proliferam condrócitos, que se tornam hipertróficos e a matriz extracelular calcifica-se. O processo de cicatrização é ativado principalmente pelos seguintes fatores: fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF), receptor ativador do núcleo do fator kappa B ligante (RANKL), osteoprotegerina (OPG), e TNF- α , iniciando a reabsorção da cartilagem mineralizada (GERSTENFELD, 2003).

Durante este processo M-CSF, RANKL e OPG também ajudam a recrutar células ósseas e osteoclastos para formar o osso esponjoso. O TNF- α ainda promove o recrutamento de MSCs com potencial osteogênico, mas seu papel mais importante é iniciar a apoptose de condrócitos (GERSTENFELD & ALKHIARY, 2003).

O mecanismo de calcificação envolve a atividade mitocondrial que contém grânulos de cálcio, criando hipóxia no local da fratura. Depois de preparar o citoplasma, os condrócitos do calo da fratura e os grânulos de cálcio são transportados para a matriz extracelular onde se precipitam com o fosfato e

iniciam a formação de depósitos minerais. Esses depósitos de cálcio e fosfato se agrupam e formam cristais de apatita. O pico de formação do calo rígido é atingido geralmente em 14 dias em modelos animais, conforme definido pela histomorfometria de tecido mineralizado, mas também pela mensuração de marcadores de matriz extracelular, como o colágeno tipo I, osteocalcina, fosfatase alcalina e osteonectina (EINHORN, 1998).

Com o tempo o calo rígido e a cartilagem calcificada são substituídos por osso esponjoso, tornando-se mais sólido e mecanicamente rígido (GERSTENFELD & ALKHIARY, 2006).

2- 1- 4- 6 Revascularização e neoangiogênese no local a fratura

A consolidação das fraturas requer um adequado suprimento sanguíneo e a revascularização é essencial para o sucesso da reparação óssea (KERAMARIS *et al.*, 2008). Na cicatrização da fratura endocondral, isso não envolve apenas as vias angiogênicas, mas também a apoptose de condróцитos e a degradação cartilaginosa, bem como a remoção de células e matrizes extracelulares que são necessárias para permitir que ocorra o crescimento de vasos sanguíneos no local do reparo (AI-AQL *et al.*, 2008).

Pesquisas comparando o perfil da expressão dos reguladores de angiogênese demonstraram que os fatores expressos mais prevalentes ao longo do processo de cicatrização óssea foram angiopoietina-2, fator derivado do pigmento endotelial, pleiotrofina e o inibidor de crescimento vascular endotelial (GERSTENFELD, 2003).

Depois da injúria, os vasos existentes são primeiramente dissociados em um pool de células endoteliais não divisíveis através da ação da angiopoietina-2 e do inibidor de crescimento vascular endotelial, este último limitando a proliferação. No momento em que a reabsorção da cartilagem e a remodelação óssea são iniciadas, há um aumento dos níveis de VEGF, que estimulam células deste grupo de progenitores e promovem a participação destas células endoteliais na neoangiogênese. Estes resultados sugerem que a sinalização do TNF- α por condróцитos controla a vascularização da cartilagem através da

regulação da angiopoietina e do fator inibidor de crescimento vascular endotelial, que desempenham as funções de contrabalancear a supressão da indução do crescimento e a apoptose de células endoteliais (AL-AQL *et al.*, 2008).

Apesar da menor relação, o terceiro membro da família do sistema de sinalização angiogênico é o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). O PDGF comprehende um grupo de fatores que pertencem estruturalmente a uma maior família que incluem o VEGF e o fator de crescimento plaquetário (HELDIN & WESTERMARK, 1999). Os PDGFs são secretados a partir de grânulos alfa de plaquetas, bem como de células endoteliais, de células vasculares do músculo liso e de macrófagos (MEYER-INGOLD & EICHNER, 1995).

2- 1- 4- 7 Remodelação óssea

Embora o calo rígido seja uma estrutura que proporcione uma estabilidade biomecânica, ele não restaura completamente as propriedades biomecânicas do osso normal. Para alcançar isso, o processo de cicatrização da fratura inicia uma segunda fase de reabsorção, desta vez para remodelar o calo rígido em uma estrutura de osso lamelar com uma cavidade central medular (GERSTENFELD, 2003).

Esta fase é bioquimicamente ativada por IL-1 e TNF- α , que mostram altos níveis de expressão durante este período, em oposição a maioria dos integrantes da família TGF- β , que diminuem sua expressão neste momento (AI-AQL *et al.*, 2008; MOUNTZIARIS & MIKOS, 2008). Contudo, algumas BMPs como BMP-2 também estão aparentemente envolvidas nesta fase com níveis de expressão razoavelmente altos (MARSELL & EINHORN, 2009).

O tempo de consolidação das fraturas varia muito conforme o osso envolvido, e no mesmo osso conforme a localização (epifisária, metafisária ou diafisária). O retardo de consolidação é definido como o aumento do período de tempo para a consolidação de determinada fratura, ou seja, o processo de consolidação não avança no ritmo usualmente esperado para aquela fratura (CROCI *et al.*, 2003).

2-2 Crescimento ósseo guiado

O modelo de crescimento ósseo guiado *in vivo* é baseado na criação de um espaço segregado no qual há proliferação de neovascularização e células osteoprogenitoras, as quais criam uma barreira contra o crescimento de tecidos alheios ao tecido ósseo que possuem velocidade de migração maior que as células osteogênicas (DINATO *et al.*, 2007). Basicamente, o método consiste na implantação de barreiras mecânicas para isolamento do tratamento estudado e do defeito ósseo propriamente dito, permitindo, assim, que as células ósseas precursoras acessem um espaço isolado destinado à regeneração do tecido ósseo (HADDAD *et al.*, 2006; LEVANDOWSKI, 2009; KUCI, 2017). A técnica de regeneração óssea guiada (ROG) pode melhorar a qualidade óssea no processo regenerativo (STOCKMAN *et al.*, 2011).

Após o estabelecimento do crescimento ósseo guiado ocorre uma sequência específica de eventos. Nas primeiras 24 horas após um enxerto ósseo, o material de enxerto e o espaço criado pela barreira é preenchido por coágulo, o qual libera fatores de crescimento, citocinas, interleucinas para exercer quimiotaxia para neutrófilos e macrófagos. O coágulo é absorvido e substituído por tecido de granulação caracterizado por intensa angiogênese. Através destes vasos sanguíneos nutrientes e células-tronco mesenquimais capazes de diferenciação osteogênica podem ser transportadas e contribuir para a formação de matriz osteoide. A mineralização da matriz forma o tecido ósseo, o qual mais tarde serve como modelo para a aposição de osso lamelar (LIU & KERNS, 2014).

Histologicamente, em todos os animais nos quais a neoformação óssea foi observada, o osso recém-formado apresentou aspecto imaturo, acompanhado de intensa formação vascular e fibras colágenas organizadas irregularmente. Ao longo do tempo, o osso adquire aspecto de “osso maduro”, podendo-se identificar a presença de osteócitos e uma aparente estabilidade (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Aloise *et al.* (1995) compararam a RO (regeneração óssea) em calvária de coelhos utilizando a técnica de ROG. Utilizaram três grupos de seis coelhos cada, o primeiro grupo (Grupo Teste - GT) com a utilização de HA bovina

concomitantemente a CTMO cultivadas, o segundo grupo com osso autólogo puro (Grupo Controle Positivo - GCP) e o terceiro grupo, com apenas HA (Grupo Controle Negativo; GCN) utilizando em todos os animais, de forma randômica, uma membrana colágena em um dos lados das craniectomias realizadas (cada animal teve duas craniectomias de 12mm, uma em cada osso parietal). Encontraram igualdade estatística na quantidade de tecido mineralizado nos grupos GT e GCP e, considerado o fato de que a utilização de osso autólogo ainda é o padrão ouro em regeneração óssea, atribuíram o resultado às CTMO cultivadas. Além disto, demonstraram que no grupo em que as CTMO foram utilizadas, o uso de barreira mecânica não propiciou uma maior quantidade de tecido mineralizado vital ou não vital na calvária dos coelhos, inferindo que este efeito se deva ao fato de que as CTMO exerçam um papel de “barreira” contra as células indesejadas; todavia não uma barreira física e sim uma barreira fisiológica. Desta forma, sugeriram que mais estudos fossem realizados para elucidar o papel das CT atuando como barreiras.

Nos defeitos denominados críticos, que não reparam espontaneamente, a formação óssea limita-se às áreas periféricas, sendo preenchida, em toda extensão, por tecido conjuntivo fibroso. Isto faz com que a formação óssea total seja retardada ou nem ocorra (NAIR & NAURENCIN, 2007 e ZHAO, 2011).

A definição do tamanho do defeito para que seja considerado crítico ou não, é determinada pela relação do tamanho da área do defeito em relação ao tamanho da área total do osso onde ele foi realizado. Estudos baseados em defeitos ósseos críticos são os mais comuns para se analisar como atuam os biomateriais na regeneração tecidual (CONSOLARO, 2013; ZIGDON *et al.*, 2014),

Os defeitos críticos na calvária de coelhos podem chegar até 15mm de diâmetro, no entanto, com esta dimensão, apenas um defeito por calvária seria possível, uma vez que é imprescindível permitir um suprimento sanguíneo do periôsteo e um padrão membranoso de regeneração óssea. Esse tamanho de defeito foi aceito como um padrão no uso de defeito crítico no crânio de coelhos (GUPTA *et al.*, 1982; PALEY, 1986; CLOCKIE *et al.*, 2002).

Defeitos ósseos com 8mm e 10mm de diâmetro, contudo não podem ser considerados críticos, pois existe a formação óssea no centro do defeito, o que o descaracteriza como um defeito crítico (ZHAO, 2011).

Em estudos em que foram analisados defeitos críticos na calvária de coelhos de 15mm vazios (apenas coágulo sanguíneo), por um período de oito semanas verificou-se a formação de uma cicatriz fibrosa fina e flexível sobre o defeito, com pouca formação óssea apenas na margem do defeito (WOLFF *et al.*, 1994).

Alguns autores têm empregado calvária de coelhos como modelo experimental utilizando diversas cerâmicas para auxiliar o reparo ósseo, evidenciando capacidade osteogênica desses biomateriais, sendo considerados osteocondutores (LEVANDOWSKI, 2009; KUCI, 2017; VARGAS, 2018).

Para experimentos com propósito de avaliar substitutos ósseos são adequados desenhos metodológicos de investigação experimental em animal prospectivo, comparativo e aleatório, antes dos ensaios clínicos (JENSEN *et al.*, 2011).

O estudo em coelhos apresenta vantagens, como fácil manutenção e observação; o fato de possuírem ciclos vitais curtos, permitir o emprego de um número de animais grande, padronizando o ambiente e a genética; além de possibilitar a realização de transplantes e a existência de grande quantidade de informação disponíveis sobre esse modelo animal (ANDRADE & OLIVEIRA, 2002).

Apesar das diferenças entre o uso da calvária de coelhos e a ossificação em humanos, é muito frequente a sua utilização, como nos experimentos de Pelegrine *et al.* (2010) e Pelegrine *et al.* (2010)b. A calvária de coelho tem as mesmas características que o osso da mandíbula, como a sua origem embriológica intramembranosa, a presença de duas camadas corticais separadas por osso esponjoso e a fisiologia da reparação óssea (FRAME, 1980). Além disso, o crânio tem estrutura similar a todas as espécies mais desenvolvidas (FINDIKCIOGLU *et al.*, 2009).

A velocidade da regeneração óssea entre coelhos, outros animais e humanos é diferente, sendo o metabolismo ósseo do coelho é, aproximadamente, três vezes mais rápido do que dos humanos (DODGE *et al.*, 2000; CLOKIE *et al.*, 2002; GUO *et al.*, 2012).

Ranganath *et al.* (2022) desenvolveram um modelo bilateral de defeito ósseo de tamanho crítico de duplo sítio (calvarial e mandibular) em coelhos para avaliação de biomateriais. A calvária é um osso plano sem carga com origem mesodérmica paraxial embrionária, enquanto a mandíbula tem origem embrionária de células da crista neural.

Várias técnicas foram propostas para regeneração óssea vertical, e muitas delas usam enxertos ósseos e alogênicos ósseos. Em seus estudos Lima *et al.* (2018) compararam os aloenxertos ósseos congelados desmineralizados os aloenxertos congelados frescos com os enxertos ósseos autógenos para encontrar diferenças entre o volume, a histologia da formação óssea e a dinâmica do crescimento ósseo vertical. Para isso um modelo ósseo de regeneração tecidual vertical foi realizado em calvarias de coelho onde quatro cilindros ocos de titânio puro foram parafusados. Cada um dos cilindros foi preenchido aleatoriamente com uma intervenção (aloenxertos ósseos congelados desmineralizados, aloenxertos congelados frescos, enxertos ósseos autógenos) ou com coágulo sanguíneo como controle. O volume vertical foi calculado após a medição, por meio de sonda milimetrada, do novo tecido formado dentro dos cilindros e após a remoção dos cilindros de titânio. Histomorfometria e coloração com fluorocromios foram utilizadas para analisar a quantidade e a dinâmica da formação óssea. Os resultados mostraram que aloenxertos ósseos congelados desmineralizados e osso fresco congelado melhoraram a velocidade e a quantidade de deposição óssea em porções distantes do plano basal de enxerto. O material remanescente nos grupos de aloenxerto foi mais intenso do que em grupo autógeno. Ambos os aloenxertos podem ser indicados como alternativas confiáveis para ganho de volume e aumento ósseo vertical.

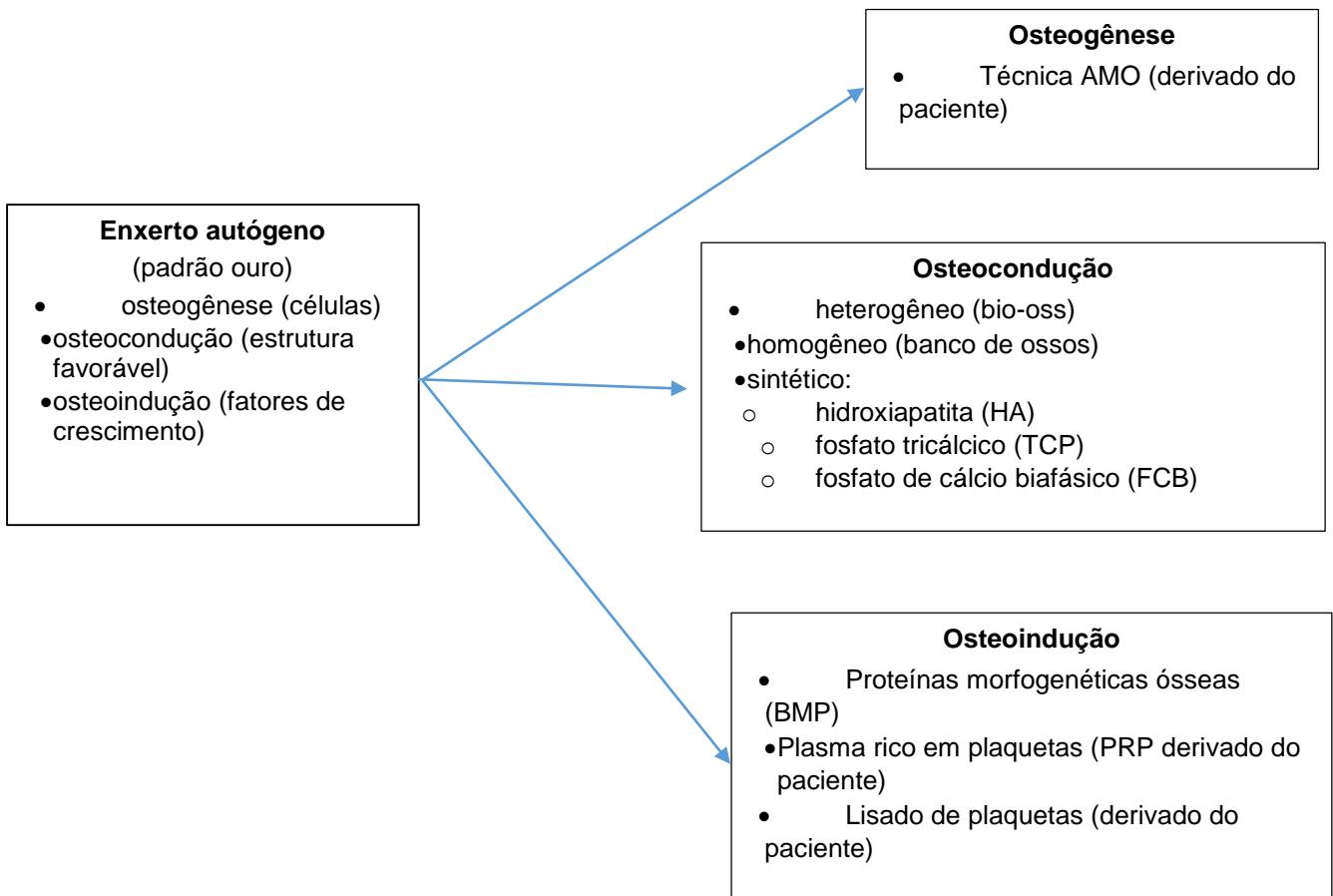
2- 3 Biomateriais substitutos ósseos

O enxerto ósseo autógeno ainda é considerado o melhor para a substituição de perdas ósseas, acima do limite crítico necessário a reparação e, apesar de suas vantagens indiscutíveis, tem-se também algumas desvantagens, dentre elas uma maior morbidade e ser um recurso de fonte esgotável, motivando diversas especialidades a procurar biomateriais substitutos ósseos que aliem vantagens, minimizando as desvantagens (COSTA *et al.*, 2009). A capacidade regenerativa do tecido ósseo tem limites podendo falhar em certos casos. Como mencionado, algumas situações podem explicar estas complicações como: falhas de vascularização, defeitos de tamanho crítico e a invasão de tecidos moles adjacentes (ROKN & KHODADOOSTAN, 2011; PIERI *et al.* 2010).

Os biomateriais podem ser definidos como uma substância ou combinação de duas ou mais substâncias, farmacologicamente inertes, de natureza sintética ou natural, que são utilizados para melhorar, aumentar ou substituir parcial ou integralmente tecidos e órgãos (WENZ & OESH, 2001). São materiais projetados para além de substituir partes do corpo, permitir a recuperação de funções biológicas afetadas por doenças ou acidentes. Biocompatibilidade e biofuncionalidade são as principais características necessárias para que esses materiais exerçam essas funções. A biocompatibilidade é a aceitação do biomaterial pelo corpo, já a biofuncionalidade representa a habilidade do material desempenhar a função desejada (MISCH & DIETSH, 1993).

Segundo os mesmos autores o emprego de substâncias químicas que facilitem a reparação óssea, permitindo adequada osteogênese, osteoindução e osteocondução, vem sendo estudado como alternativa em várias situações clínicas que cursam com perda óssea significativa (Figura 2). Tais materiais podem ser adicionados aos enxertos autógenos em casos com limitada quantidade tecidual das áreas doadoras, muitas vezes funcionando como arcabouços, potencializando o crescimento ósseo (MISCH & DIETSH, 1993; NISHIBORI *et al.*, 1994; HALLMAN *et al.*, 2002; YILDIRIM, 2001; BOECK-NETO *et al.*, 2002).

Figura 2: Terapias mais utilizadas na regeneração e reparo ósseo.



Fonte: Adaptado de Camargo *et al.* (2014)

Um material de implante deve ser biocompatível, ter resistência mecânica necessária, ser estéril e deve ser incorporado num dispositivo para que seu desempenho no paciente vivo possa ser monitorado, além de apresentar propriedades osteoindutoras e osteocondutoras (CAMARGO *et al.*, 2014; FRAME, 1980).

A osteogênese ocorre quando o enxerto é suprido de células capazes de formar tecido ósseo, pela presença de osteoblastos viáveis do próprio enxerto. Na osteoindução o enxerto tem a capacidade de estimular a atividade osteoblástica do tecido ósseo adjacente, com neoformação óssea a partir da ativação de células progenitoras, através da ação de agentes indutores. Na osteocondução, a maioria das células que chegam até o enxerto já se diferenciaram, conduzindo desenvolvimento de um novo tecido ósseo através de suas matrizes de suporte, os arcabouços. Esta matriz é reabsorvida e

simultaneamente substituída por tecido ósseo neoformado (CAMPOS JR. *et al.*, 1990).

Histologicamente, a neoformação óssea se estabelece por mecanismos osteogênicos, osteoindutores e osteocondutores (BOYNE & SHABAHANG, 2001). A matriz orgânica do enxerto ósseo contém substância indutora, transformando células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, com efeito tanto osteocondutor quanto osteoindutor. Os biomateriais devem ser caracterizados considerando algumas propriedades, como: composição química, morfologia, cristalinidade, área superficial específica e expectativa de degradação. Baseado nas propriedades acima descritas, o biomaterial utilizado como enxerto deve demonstrar: biocompatibilidade, osteocondutividade, área superficial suficiente, afim de permitir uma adequada revascularização para o sítio ósseo do hospedeiro, alta porosidade, para ser completamente incorporado ao novo osso e moderada reabsorção, permitindo ao longo do tempo a remodelação óssea (ARTZI, 2001).

Os biomateriais para enxertos ósseos podem ser divididos em três grupos: metálicos, poliméricos e cerâmicos (GREGHI & CAMPOS, 1994; FURUSAWA & MISUNUMA, 1997; CANCIAN, 1999;).

O desenvolvimento de pós de fosfatos de cálcio nanoestruturados é um tema de pesquisa atual e tem gerado novas perspectivas no desenvolvimento de biomateriais para substituições de tecido ósseo. Esses novos biomateriais podem ser utilizados em ortopedia, traumatologia e odontologia, como elemento matricial no preenchimento de defeitos e regeneração do tecido ósseo.

As biocerâmicas nanoestruturadas de fosfato de cálcio têm se destacado na área de biomateriais de reconstituição óssea pela sua semelhança química e cristalográfica com a apatita óssea do esqueleto humano, reforçando sua importância na ortopedia, odontologia, fixação de implantes e regeneração do tecido ósseo (CAMARGO *et al.*, 2007). Também se destacam por apresentarem a capacidade de hidratação, pega e endurecimento a temperatura ambiente ou corpórea. Outro aspecto a considerar-se no que se refere aos biocimentos de HA está associado ao favorecimento da neoformação óssea, osteointegração e reparação óssea precoce (ROKN *et al.*, 2012; PITTIS & KABAN, 1990).

O tipo de sintetização, no qual os biomateriais são submetidos, pode originar diferentes tipos de material (grânulos, membranas, blocos, cimento e outros) e possuir composições únicas ou combinadas. O formato a ser utilizado no osso será determinado de acordo com o defeito ósseo. Reconstruções tridimensionais exigem um formato estrutural maior, sendo os blocos os melhores indicados, enquanto os grânulos são indicados para defeitos cirurgicamente criados (ALMEIDA *et al.*, 2014).

As características físicas dos materiais cerâmicos nos permitem classificá-los nas formas densa e porosa. A forma densa apresenta microporosidades, graças ao processo de sinterização que o material é submetido durante sua confecção. Essa microporosidade facilita a ação de células que atuam no processo de reparação. A forma porosa apresenta poros maiores que facilitam o crescimento tissular. Com relação a absorção, a forma densa sofrerá um processo mais lento que a forma porosa, entretanto sua resistência a compressão será maior (PETTIS & KABAN, 1990; GREGHI & CAMPOS, 1994; CANCIAN, 1999; FROUM *et al.* 2008).

Portanto, um material ideal para ser utilizado como substituto ósseo deve ser biocompatível, não antigênico, não carcinogênico, apresentar baixo custo, ser gradualmente substituído por tecido da área recepadora, ter propriedades osteocondutora e/ou osteindutora (BERGLUNDH & LINDHE, 1997; CAMELO & NELVINS, 1998; FERNANDES & GINEBRA, 1999; MACNEILL *et al.*, 1999; MELLONG, 2000).

Aristizabal *et al.* (2017) realizaram estudos nos quais os animais foram divididos em três grupos experimentais para preenchimento de defeitos ósseos: grupo I (G1) e grupo II (GII), preenchidos respectivamente com a biocerâmica de fosfato de cálcio nanoestruturada micromacro porosa em grânulos de 40 a 60 mesh, de absorção lenta e moderada e, grupo III (GIII), controle, permanecendo o defeito vazio. Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir que as biocerâmicas de fosfatos de cálcio nanoestruturadas micromacro porosas em grânulos de absorção lenta e moderada podem ser indicadas para o tratamento de defeitos ósseos críticos. As biocerâmicas permitem um tipo de crescimento ósseo direto, por meio da formação de um tecido fibrovascular, diferenciação e migração ao local de células osteoblásticas, com síntese de tecido osteoide, e a

maturação óssea ocorre mais precocemente quando se emprega a cerâmica de absorção moderada.

2- 3- 1 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita é um fosfato de cálcio que tem uma baixa taxa de biodegradação dentro do corpo e é similar a principal substância componente da estrutural mineral óssea (CAO & HENCH, 1996; KATTI, 2004).

As propriedades biológicas da hidroxiapatita sintética (HA) são muito estudadas, tendo sido utilizada na correção de defeitos ósseos no homem e em várias espécies (ARAKAKI *et al.*, 1995; GEESINK & HOEFNAGELS, 1995; KVETON *et al.*, 1995), com resultados positivos para indicá-la como alternativa para a enxertia óssea na rotina clínica. Arakaki *et al.* (1995), Borges (1998) e Rezende *et al.* (1998) relataram a biocompatibilidade da HA com ossos, uma vez que esse sólido inorgânico apresenta a mesma estrutura cristalina e química do osso vivo (Quadro 1) (HEIKKILLA *et al.*, 1993; SAALFELD, 1994; HARUN *et al.*, 2018).

Quadro 1: Requisitos e propriedades necessárias ao uso da HA.

Propriedade essencial	Requisito padronizado
Espessura	Não específico
Relação Ca/P	1,67 – 1,76
Pureza de fase	Mínimo de 95%
Cristalinidade	Mínimo de 62%
Resistência à tração	> 50,8 Mpa
Força de cisalhamento	> 22 Mpa
Densidade	2,98g/cm ³
Metais pesados	< 50ppm
Abrasão	Não específico

Fonte: Adaptado de Harun *et al.* (2018).

É considerada um substituto vantajoso por possuir uma composição uniforme, alta biocompatibilidade, segurança biológica por não ser carcinogênica, alergênica ou tóxica e por sua sintetização ser de fácil controle

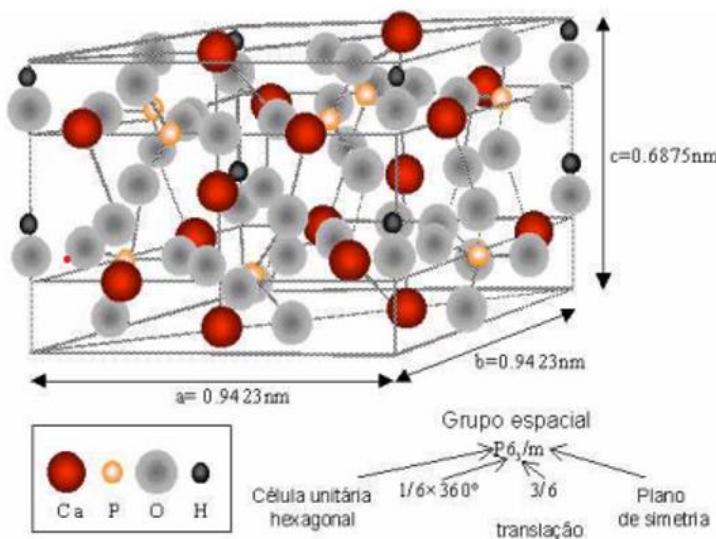
da porosidade. A sua porosidade faz com que o suporte vascular ocorra de forma passiva, favorecendo ao aumento de fatores de indução da formação de novo tecido ósseo (BORGES, 1998).

A hidroxiapatita não tem capacidade osteoindutiva, atuando como matriz passiva para o crescimento ósseo, razão pela qual é considerada como um material osteocondutor (CALLAN & ROHRER, 1993; BORGES, 1998; REZENDE *et al.*, 1998).

2- 3- 1- 1 Composição química da hidroxiapatita

A HA apresenta em sua célula unitária uma representação completa do cristal de apatita, consistindo em grupos de Ca, Po₄ e OH-, empacotados, formando um arranjo hexagonal cristalino (Figura 3). A fórmula da hidroxiapatita estequiométrica é Ca₁₀ ((PO₄)₆) (OH)₂, com razão Ca/P igual a 1,67 e é um fosfato de cálcio estável e solúvel. Porém composições estáveis podem ter esta razão estendida para aproximadamente 1,5 (FULMER *et al.*, 1992).

Figura 3: Arranjo anatômico da hidroxiapatita.



Fonte: Fulmer *et al.* (1992).

A HA pura cristaliza-se sob a forma monoclinica com espaçamento do grupo espacial P21/b; no entanto, em temperaturas acima de 250°C, existe a transição alotrópica da forma monoclinica para hexagonal, com espaçamento do

grupo espacial P63/m [15,16]. Algumas impurezas, ou substituições parciais da hidroxila por íons cloreto ou fluoreto, estabilizam a forma hexagonal a temperatura ambiente. Por esse motivo, monocristais naturais de HA geralmente exibem uma conformação hexagonal. Sua densidade é de 3,16Kg/m³ e os parâmetros de rede são $a = b = 0,9423\text{nm}$ e $c = 0,6875\text{nm}$ (FERNANDEZ & GINEBRA, 1999).

2- 3- 1- 2 Obtenção de hidroxiapatita

Dois tipos de hidroxiapatitas devem ser considerados: as sintetizadas em altas temperaturas e que apresentam boa cristalinidade e tamanho de cristais grandes, e as hidroxiapatitas sintetizadas em baixas temperaturas que apresentam baixa cristalinidade e tamanho de cristais pequenos. A hidroxiapatita precipitada por via úmida possui características similares as do tecido ósseo e dentário, diferentemente da hidroxiapatita sintetizada a altas temperaturas (RIGO *et al.*, 2007)

Muitas técnicas foram desenvolvidas para a síntese do pó de hidroxiapatita considerando as possibilidades de aplicações. Um dos métodos mais utilizado é a técnica de precipitação, que envolve reações via úmida entre precursores de cálcio e fósforo com controle de temperatura e pH da solução. O pó precipitado é calcinado em 400-600°C ou até mesmo a temperaturas mais elevadas, a fim de obter uma estrutura de apatita estequiométrica. A precipitação rápida durante a titulação da solução de fosfato em solução de cálcio pode levar a falta de homogeneidade química no produto final. A titulação lenta e as soluções diluídas devem ser utilizadas para melhorar a homogeneidade química e a estequiométrica da HA resultante. O cuidadoso controle das condições da solução é crítico na precipitação via úmida. Caso contrário, uma diminuição do pH da solução abaixo de 9 pode conduzir a formação da estrutura da HA deficiente em íons de Ca (AZEVEDO *et al.*, 2015).

Conforme os mesmos autores, outra forma para a síntese de HA trata-se da utilização do processo sol-gel. Este processo é um método químico, via úmida, o qual dispensa a utilização de alto vácuo e temperaturas elevadas, sendo considerada uma das técnicas mais flexíveis. É um método eletivo para a

preparação de um pó altamente puro devido a possibilidade de um controle cuidadoso dos parâmetros do processo, favorecido por uma mistura em nível molecular dos íons cálcio e fósforo que é capaz de melhorar a homogeneidade química e física, resultando geralmente em uma microestrutura de granulação fina que contém uma mistura de cristais de tamanho submícron a nano, o que é importante para melhorar a reação de contato e a estabilidade da interface osso artificial/natural. Como material para implante a hidroxiapatita pode ser obtida a partir da desproteinização de tecido ósseo, ou por tratamento hidrotérmico de corais (WHITE & SHORS, 1986). Pode ser obtida também por processos sintéticos tais como, precipitação de soluções aquosas (OSAKA *et al.*, 1991) ou reações no estado sólido (VIDEAU & DUPUIS, 1991).

O método de síntese adotado para a obtenção de hidroxiapatita ou o seu tratamento posterior pode levar ao aparecimento ou não de outras fases de compostos de fosfato de cálcio. Estando presentes, podem ser detectadas através de difratometria de raios-x. Normalmente estas fases apresentam-se em quantidades pequenas (ao redor de 5%) em compostos comerciais. Entretanto cuidados devem ser tomados para controlar a quantidade destes compostos, uma vez que estes possuem propriedades extremamente diferentes da hidroxiapatita, podendo comprometer a osteocondução, como no caso do surgimento de pirofosfato de cálcio ou metafosfato de cálcio, ou ainda comprometer a integridade e eficiência mecânica do material em função de sua solubilização (SALEH *et al.*, 2004).

Sendo assim, hidroxiapatita na forma de grânulos pode ser obtida a partir de diversos métodos, o que permite prever comportamentos biológicos diferenciados. A HA na forma de pó pode ser obtida por três métodos: da via úmida, da via seca e o método hidrotermal. Pelo método da via úmida (reação ácido-base, reação entre sais de fosfato), sendo produto originário um pó de partículas pequenas ($10\mu\text{m}$) e cristalinidade similar aos tecidos naturais, porém, com baixa cristalinidade. No método via seca, obtém-se um pó de alta cristalinidade, obtido por volta de 900°C . Já o método hidrotermal é idêntico a via úmida sob pressão e temperatura, formando um pó nanométrico ou milimétrico, sendo possível a obtenção de materiais com porosidade similar a hidroxiapatita obtida de corais (RIGO *et al.*, 2007).

A partir dos diferentes pós é possível a obtenção de diversas morfologias e formatos de materiais, de denso até materiais extremamente porosos, os quais incluem técnicas de processamentos cerâmicos tradicionais e avançadas como: prensagem, colagem de barbotina, gelcasting, injeção, tape-casting, sol-gel, etc (ROSA *et al.*, 2000).

O desenvolvimento de hidroxiapatita granulada é de grande interesse devido à sua ampla utilização na área ortopédica e traumatológica (medicina, odontologia e veterinária) (LEVANDOSKI-JR, 2009).

Segundo Silva *et al.* (2020) há evidências abundantes de que as distorções de rede induzidas pela substituição de um grupo hidroxiapatita por um íon estranho podem ser minimizadas quando vários íons com diferentes tamanhos e cargas são simultaneamente acomodados na rede cristalina. Os íons encontrados no ambiente biológico durante a biomíneralização, bem como os contraíons presentes em sínteses, ou seja, os reagentes empregados, desempenham um papel importante na precipitação e estabilização das apatitas. Os mesmos autores estudaram a precipitação de hidroxiapatitas contendo estrôncio em diferentes concentrações (0, 20, 40, 60, 80 e 100% Sr²⁺), na presença de dois contraíons tipicamente presentes em ambientes biológicos: Na⁺ e Cl⁻. A presença de Na⁺/Cl⁻ no ambiente de síntese levou à precipitação de um sistema de hidroxiapatita bifásica (HA) formado por duas fases não miscíveis: HA rica em Ca e HA rica em Sr. O sistema bifásico foi observado para concentrações intermediárias de Sr²⁺ (20, 40 e 60%), e exibiram mais microcepas de treliça em comparação com os sistemas monofásicos de Ca HA (0%) e Sr HA (100%).

Oliveira *et al.* (2020) pesquisaram o uso de nanopartículas magnéticas em associação com andaimes com o propósito de transformar andaimes passivos típicos em andaimes ativos. O manganês pode desenvolver propriedades magnéticas em hidroxiapatitas, assim como ferro, cobre, cobalto e samário, mas não possui a alta toxicidade desses últimos compostos. Estes estudos são fundamentais para o desenvolvimento de novas estratégias para a síntese de andaimes ativos à base de hidroxiapatita sob controle remoto por um campo magnético.

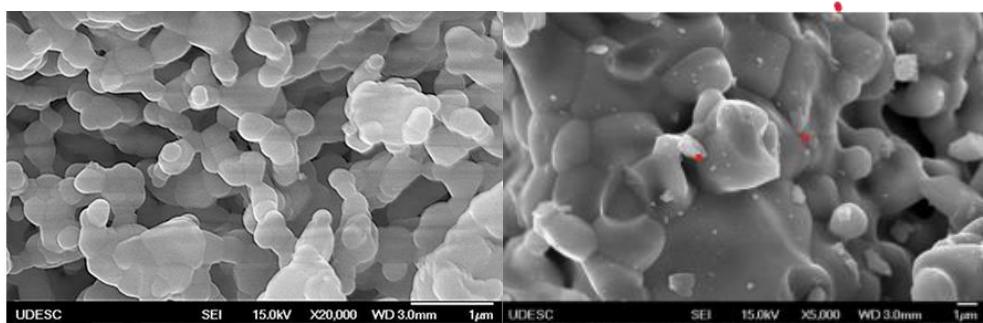
2- 3- 1- 3 Métodos de caracterização da hidroxiapatita

Dentre as mais diversas técnicas de caracterização utilizadas para materiais, em geral as técnicas de difração de raios-x (DRX) infravermelho com transformado de Fourier (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) são as mais utilizadas para a caracterização de hidroxiapatitas (LEVANDOSKI-JR, 2009).

Manso *et al.* (2003) partindo dos mesmos precursores utilizados por Hwang & Lim (1999), dissolvidos em etanol obtiveram recobrimentos de HA sobre Si utilizando a técnica de deposição aerosol. Demonstraram por MEV que em 650°C obteve-se no depósito de HA uma morfologia altamente porosa.

Santos *et al.* (2012) sintetizaram hidroxiapatita utilizando-se a rota sol-gel partindo-se de ácido fosfórico e nitrato de cálcio como precursores de cálcio e fósforo, respectivamente e como solvente empregando o metanol na preparação do sol que foi utilizado na obtenção de recobrimentos de hidroxiapatita sobre substratos de ligas de titânio. O produto obtido foi calcinado em 300°C, 500°C e 700°C e foi caracterizado por FTIR, DRX, MEV/EDS e TGA/DSC. As fases de HA sintetizada tornaram-se estáveis sem subprodutos a 700°C. O DRX mostrou que a estrutura apatita é visível em 300°C. O tamanho do cristal e o teor de HA aumentaram com o aumento da temperatura de calcinação. A análise por MEV (Figura 4) mostrou a presença de poros que são importantes para aplicações biomédicas, favorecendo a adesão entre o tecido ósseo neoformado e a apatita sintética, ou seja, osseointegração.

Figura 4: Imagens representativas da superfície de grânulos de hidroxiapatita sinterizada a 1300°C durante 1 hora (A) e 4 horas (B). Pode-se observar que a amostra tratada durante 1 hora teve uma boa sinterização nos pontos de contato dos particulados, formando uma rede de porosidade interconectada com tamanhos submicrométricos, servindo de arcabouço para o desenvolvimento celular em meio fisiológico.



Fonte: Gemelli *et al.* (2020).

Rigo *et al.* (2007) preparam pó de hidroxiapatita pelo método da precipitação. Microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia na região do infravermelho e difração de raios-X foram utilizados para caracterização do material obtido. Casos clínicos foram realizados com objetivo de verificar a promoção de crescimento de tecido ósseo para instalação de implantes. Os resultados obtidos por meio de DRX e FTIR mostraram que o pó obtido é composto exclusivamente de hidroxiapatita não ocorrendo a precipitação de fases do sistema Ca-P. Por meio do MEV foi possível observar que o pó assim obtido apresentou morfologia esférica e de tamanhos homogêneos. Estudos histológicos das áreas enxertadas e radiografias demonstraram que o leito receptor apresentou adequado crescimento de tecido ósseo, possibilitando a instalação dos implantes e posterior suporte de cargas mastigatórias.

Levandowski Jr. *et al.* (2014) caracaterizaram em seu trabalho seis diferentes biomateriais nanoestruturados substitutos ósseos, dentre eles a HA. Os resultados morfológicos e microestruturais demonstraram que os biomateriais avaliados apresentaram extensivamente microestrutura microporosa interconectada, formada por grãos finos. Observou-se um diâmetro médio inferior a 300 nm para todos os biomateriais, com a presença de grãos nanoestruturados ($d < 100\text{nm}$). Os resultados obtidos pela DRX e FTIR mostraram que a presença de uma segunda fase de ordem nanométrica, em uma matriz biocerâmica de hidroxiapatita, pode modificar a difusão superficial

dos grãos e a cinética de transformação de fase da hidroxiapatita e fosfato tricálcico beta a uma temperatura até 1100°C.

2- 3- 1- 4 Aplicações da hidroxiapatita

Biomateriais empregados em ortopedia podem ter origem animal, sintética ou natural com modificações moleculares. As biocerâmicas têm apresentado boa aceitabilidade e se destacado nos últimos anos como elementos capazes de serem úteis na substituição óssea em casos de traumas de alto impacto que geram perda de susbtância (CAO & HENCH, 1996).

Como a hidroxiapatita é o principal constituinte da fase inorgânica do osso, suas formas de obtenção e propriedades quando implantada em tecidos orgânicos são muito estudadas. Suas características químicas e estruturais possibilitam seu uso na área médica como material biocompatível em implantes e próteses. Em ortopedia existe um particular interesse em usá-la como revestimento de próteses metálicas para promover a ligação interfacial estável entre o material implantado e o tecido vivo (FULMER *et al.*, 1992).

Além disso fosfato tricálcico e hidroxiapatita têm atraído interesse como substitutos ósseos por serem mais biocompatíveis que muitas outras biocerâmicas e partículas inorgânicas e por terem faixa de relação cálcio e fósforo (Ca/P) muito próxima aquela dos ossos, tornando-se mais aplicáveis na enxertia óssea (BOSE & TARAFDER, 2012).

No tratamento de tumores, esse biomaterial vem sendo usado como suporte de ação prolongada. A introdução de drogas anticancerígenas em blocos de hidroxiapatita porosa permite que o tratamento da doença seja realizado com a liberação gradual dos fármacos no organismo. Sob este aspecto essa técnica é atrativa, pois combina o tratamento do tumor e neoformação do osso reabsorvido (AKASAWA & KOBAYASSHI, 1996).

Na área odontológica a hidroxiapatita é utilizada para evitar perda óssea após extração de um ou vários elementos dentários, como também promover recuperação de áreas com reabsorção óssea. Pinos de titânio revestidos com

hidroxiapatita são usados no implante para a substituição da raiz (MAVROPOULOS, 1999).

As aplicações da hidroxiapatita sintética não se restringem à área biomédica. Devido à sua grande afinidade por proteínas, a HA tem sido aplicada como adsorvente em cromatografia líquida (AKASAWA & KOBAYASSHI, 1996).

A capacidade de adsorção da HA está relacionada a estrutura do poro e a natureza físico-química da superfície do sólido. Como já foi dito, as aplicações da hidroxiapatita estendem-se desde a ortopedia e traumatologia, traumatismos raquimedulares e de coluna cervical e ainda tumores músculoesqueléticos e na odontologia, nos casos de doenças periodontais, para correções bucomaxilofaciais, implantes dentários, preenchimento de cavidades císticas ou mesmo aumentos de rebordo alveolar, além de outras aplicações (Quadro 2) (LEGEROS, 1988).

Quadro 2: Diferentes formas da HA e suas respectivas aplicações em medicina e odontologia.

Aplicações	Formas
Matriz/ suporte para crescimento ósseo	Grãos, porosa
Ossos artificiais	Grãos, densa, porosa
Cimento ósseo	Pó com PMMA
Articulações artificiais	Metal revestido com HÁ
Próteses vasculares	Densa
Próteses traqueais	Porosa ou densa
Sistema de liberação densa	Densa ou pó

Fonte: Adaptado de E`gues (2005).

2- 3- 1- 5 Hidroxiapatita em cicatrização óssea

A hidroxiapatita vem sendo empregada em medicina regenerativa para a substituição de ossos perdidos em fraturas graves. Esta substância é um fosfato de cálcio que tem uma baixa taxa de biodegradação dentro do corpo e de fato representa a principal substância componente da estrutura mineral óssea, por isso vem sendo realizados estudos com hidroxiapatita na consolidação óssea, como adjuvante ou arcabouço para a colocação de material de osteossíntese (KIM *et al.*, 2009; CAO & HENCH, 1996; KATTI, 2004; KATTHAGEN & MITTELMEIER, 1984).

Os biocimentos de matriz de HA são solúveis em meios biológicos e/ou simulados, em razão disso apresentam capacidade de biodegradação e absorção quando aplicadas *in vivo* (FERNANDEZ & GINEBRA, 1999). A hidroxiapatita sintética é um material biocompatível, não imunogênico e biodegradável (NAGAHARA & ISOGAI, 1997; OVERGAARD *et al.*, 1997; BORGES, 1998).

Donath (1990) relacionou o nível de reabsorção da hidroxiapatita com a sua sinterização. Nagahara & Isogai (1997) relataram que a hidroxiapatita sinterizada a 950°C, quando implantada em fêmur de ratos, foi reabsorvida lentamente com notável separação do material e substituição por células mesenquimais com fatores ultraestruturais semelhantes a células osteogenitoras.

Pissiotis & Spangberg (1990), em um estudo de implantação da HA e HA associada ao colágeno na mandíbula de cobaias, não observaram alteração da biocompatibilidade em nenhum dos dois tratamentos. Esses autores verificaram que no período de oito semanas de pós-operatório o grupo implantado com HA associada ao colágeno não apresentava indícios de reparação óssea, ao contrário do grupo tratado somente com HA.

Os estudos histológicos realizados por Najjar (1991) evidenciaram atividade osteoblástica com formação de osso imaturo duas semanas após o implante com HA. Com quatro semanas, notaram tecido ósseo circundando partículas de HA e início de remodelação óssea.

Para Louise *et al.* (1992), as fibras colágenas intimamente associadas com a superfície da hidroxiapatita ou localizadas em áreas de deposição de osteoide são orientadas de maneira perpendicular a esses grânulos. Em contraste, o tecido conjuntivo que rodeia a cápsula fibrosa apresenta camadas estratificadas de fibras colágenas e fibroblastos arranjados paralelamente à superfície do grânulo.

Heikkilla *et al.* (1993) relataram reação inflamatória branda ao redor do implante de HA, estando presente apenas linfócitos e macrófagos, a semelhança do que foi observado no grupo-controle. Ainda verificaram que em torno de três

semanas havia fibrose ao redor do implante, e que de seis a 12 semanas havia osso lamelar recobrindo-o.

Callan & Rohrer (1993) acreditam que o tecido ósseo formado em contato com a hidroxiapatita seja originário do tecido fibroso circunvizinho as partículas de HA.

Gomi *et al.* (1993) mostraram a presença de células multinucleadas na interface hidroxiapatita e osso depois da implantação, que podem ser caracterizadas morfologicamente como osteoclastos, responsáveis pela biodegradação da hidroxiapatita.

Geesink & Hoefnagels (1995), em implantes de hidroxiapatita colocados no fêmur de cães, observaram após seis semanas de pós-operatório tecido periosteal, osteoblastos e osteócitos maduros em contato com a hidroxiapatita, sem interferência de tecido fibroso.

Hemmerle *et al.* (1997) encontraram cristais de hidroxiapatita separados e espalhados em citoplasma de células com fatores ultraestruturais semelhantes a macrófagos.

Davies *et al.* (1997) mostraram que a neoformação óssea na interface osso-hidroxiapatita é morfologicamente comparável aos locais normais de remodelação óssea. Mesmo não sendo osteoindutora, a hidroxiapatita estimula a síntese de colágeno (ZAMBONIN & GRANO, 1995). As fibras colágenas na matriz óssea podem ser orientadas paralela ou perpendicularmente à superfície da hidroxiapatita, de acordo com o tipo de tecido presente na interface osso-implante (EDWARDS *et al.*, 1997).

Borges (1998) encontrou osteoclastos ativos sobre a HA e alguns grânulos do produto no interior de macrófagos. Li *et al.* (1995) e Edwards *et al.* (1997) observaram que a reabsorção celular de grânulos de hidroxiapatita ocorre concomitantemente com a formação adjacente de osso novo.

Nos estudos de Borges (1998), tecido fibrovascular circundando a HA e tecido ósseo novo na região endosteal foram observados no oitavo dia após o implante, tanto no grupo-controle como no tratado. Observou-se evolução da reparação óssea e aos 120 dias, e que o defeito possuía característica de osso

normal. O exame histológico revelou, em alguns casos, reação tipo corpo estranho caracterizada por células gigantes, macrófagos e presença de tecido conjuntivo ao redor da HA.

A hidroxiapatita não induz neoformação óssea (NAGAHARA & ISOGAI, 1997), mas a reação de células osteogênicas com hidroxiapatita *in vivo* (EDWARDS *et al.*, 1997; BORGES, 1998) e *in vitro* (BAGAMBISA, 1990) mostrou que a sua superfície é osteocondutiva. O resultado dessa atividade foi a deposição de tecido ósseo diretamente sobre a superfície da hidroxiapatita implantada, sem nenhuma evidência de encapsulação ou tecido de granulação (BORGES, 1998; BAGAMBISA, 1990).

A presença de uma camada eletrodensa na ultraestrutura, na interfase osso-implante, observada algumas vezes, pode ser uma lâmina limitante de matriz óssea orgânica não mineralizada (LANGE *et al.*, 1990) ou pode ser uma reação patológica causada pela implantação do substituto *in vivo* (OGUCHI *et al.*, 1995). Daculsi *et al.* (1990) relataram que essa camada eletrodensa foi observada somente em secções descalcificadas e sugeriram a possibilidade de artefato, talvez representando restos de proteínas absorvidas na superfície do implante.

Yamamoto *et al.* (1997) revelaram a presença de mineralização nessa camada eletrodensa. O processamento histológico, especialmente a desidratação, induz contração das estruturas biológicas. Como não ocorre contração do implante, as forças atuam entre a interface osso-implante podendo levar até a fratura, dependendo do tamanho da força de contração (DENISSEN & GROOT, 1990).

A porosidade determina a colonização celular do biomaterial que é uma característica bastante importante para a eficácia da reação do material com o meio biológico. As interconexões entre os macroporos formados pela distribuição do biomaterial implantado assumem um sistema similar a túneis, permitindo o trânsito de fluidos biológicos e células ósseas, facilitando, assim, a formação do novo tecido ósseo no interior do material substituto implantado (TEIXEIRA, 2009).

O biomaterial com microporosidade e grãos nanométricos pode oferecer melhor capilaridade, adesão celular na superfície óssea e molhabilidade, favorecendo as características osteoindutora e de osteointegração, cooperando para a formação do novo tecido (CAMARGO, *et.al.*, 2014). O tamanho das partículas do biomaterial está amplamente relacionado a área da superfície disponível a reação das células com o meio biológico, isto é, quanto maior o tamanho das partículas, maior o tempo de absorção do substituto ósseo (TEIXEIRA, 2009).

A hidroxiapatita de cálcio, o vidro bioativo e a proteína morfogenética óssea demonstraram atuar como osteocondutores facilitando a neoformação óssea (MARTINS et al., 2010).

A sua solubilidade permite a gradual degradação e absorção do material por parte do tecido circundado, estimulando o osso crescer no material por entre seus poros, podendo ocorrer posteriormente a gradual substituição do material pelo tecido (RODRIGUES, 2013). Por possuir resistência mecânica baixa e alta fragilidade, a sua utilização isolada torna-se restrita apenas a áreas que exigem pouco esforço mecânico e, por esse motivo são realizadas associações da HA com outros materiais como zircônia, alumina, titânio e biovidro para melhora das propriedades biomecânicas dos biomateriais (BONAN *et al.*, 2014).

É um material que não causa toxicidade local e sistêmica, nem resposta inflamatória, com capacidade de se adaptar ao tecido hospedeiro. Entretanto, apesar de suas propriedades biológicas promissoras, seu baixo índice de bioatividade e sua lenta taxa de degradação, podem ser fatores limitantes a sua aplicação (GUASTALDI & HERRERA, 2016).

A remodelação com integração do enxerto sintético pode levar até anos para que ocorra completamente (LEUCHT *et al.*, 2013). Para Bose & Tarafder (2012), as partículas inorgânicas das biocerâmicas têm relação cálcio e fósforo muito próxima à dos ossos, o que acaba deixando o enxerto com alta dureza, tornando os ossos nos quais foram implantados mais quebradiços.

Dalmônico *et al.* (2017) desenvolveram um estudo com base na investigação *in vivo* de biomateriais granulares microporosos à base de fosfatos de cálcio, envolvendo matrizes de fosfato β-tricálcico (β-TCP), hidroxiapatita

(HA), composições bifásicas de ambas as fases e um grupo controle. A caracterização físico-química dos materiais foi realizada por difração de raios X (DRX) e porosimetria de mercúrio. Os processos de biodegradabilidade, bioatividade e neoformação foram investigados por espectroscopia Raman, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e luz polarizada realizada em biópsias obtidas de testes *in vivo* por períodos de 90 e 180 dias. Estes foram realizados para avaliar o comportamento de composições microporosas granulares em relação à neoformação óssea. Através do desempenho obtido a partir de ensaios *in vivo*, observou-se excelente osseointegração e neoformação do tecido ósseo. Os resultados são animadores e mostram que os biomateriais granulares microporosos das composições HA, β-TCP e bifásica apresentam resultados semelhantes com perfeita osseointegração. Arquiteturas que simulam uma estrutura óssea podem fazer a diferença entre biomateriais para substituição e reparo de tecido ósseo.

Dalbarida *et al.* (2018) realizaram avaliação do comportamento da neoformação óssea e osteointegração dos diferentes biomateriais de fosfatos de cálcio em testes *in vivo* em ovinos. Os biomateriais implantados foram hidroxiapatita (HA), fosfato tricálcico-β (TCP-β) e composições bifásicas HA/TCP-β nas proporções: 80/20, 20/80, 70/30 e 30/70. Os resultados encontrados mostraram que os biomateriais granulados microporosos são formados por uma morfologia irregular com tamanho de grânulos entre 200 µm e 500µm, outra constatação foi microestrutura microporosa interconectada dos biomateriais. A densidade teórica se apresentou semelhante entre os biomateriais granulados de fosfatos de cálcio e sugerem boa capacidade de neoformação óssea para todos os biomateriais, sendo que o bifásico 20/80 apresentou absorção do biomaterial e neoformação óssea mais rápida quando comparada com os outros biomateriais avaliados.

2- 3- 2 Bio-oss® e bonefill®

Bio-oss® e bonefill® são biomateriais de origem bovina, que têm sido estudados desde a década de 60 (FULMER *et al.*, 1992; BAUER & MUSCHLER, 2000). De acordo com Gutwald *et al.* (2010), apresentam estrutura semelhante

ao osso humano, tanto em sua morfologia estrutural quanto em sua composição mineral.

São considerados xenoenxertos podendo ser produzidos a partir de osso bovino cortical ou medular, mediante processo que consiste na completa eliminação das proteínas e liofilização do osso bovino, realizada por esterilização física e procedimentos químicos. Encontram-se disponíveis em blocos e também em grânulos corticais ou esponjosos (FERREIRA *et al.*, 2007).

Bio-oss® e bonefill® são produzidos a partir de osso natural extraído de fêmur bovino, totalmente desproteinizado. O osso fresco é triturado, recebendo uma sequência de banhos que solubilizam as estruturas orgânicas como por exemplo, células remanescentes da matriz orgânica, fibras e proteínas, permanecendo somente a porção mineral, evitando a indução de possíveis processos imunogênicos no organismo (MANFRO *et al.*, 2014).

A resistência biomecânica desses biomateriais também parece similar à do osso humano e tratamentos adequados para a sua obtenção evitam respostas imunológicas ou inflamatórias adversas (SANTOS *et al.*, 2012).

As características destes biomateriais como área de superfície ou formato (bloco, partícula), porosidade (denso, macro ou micro poroso) e cristalinidade (cristalino ou amorfó) do produto determinam suas propriedades físicas. As propriedades químicas referem-se à razão molar cálcio/fosfato, composição química, grau de impureza elementar e substituição iônica na estrutura atômica (MISCH, 2000). O quadro 3 apresenta algumas das características desses biomateriais.

Quadro 3: Características dos biomateriais comerciais empregados no presente trabalho.

BIOMATERIAIS	Bio-oss® - Bonefill®
Obtenção	Osso bovino cortical ou medular
Empregos	Reconstrução de rebordo alveolar, preenchimento defeitos intraósseos e alveolares, defeitos periodontais
Propriedades	Osteocondução/ Osteointegração
Absorção	Lenta

Fonte: HALMAN *et al.* (2002).

Possuem uma estrutura constituída por uma superfície ultra porosa e um sistema de poros interconectados, que funciona como uma microesponja,

proporcionando a entrada de células sanguíneas, osteoblastos, osteoclastos e proteínas em suas partículas, o que permite, dessa forma, a osseointegração eficaz de suas partículas. Alguns estudos relatam que são absorvíveis, contudo, baseando-se na literatura disponível, pode se concluir que não são totalmente reabsorvidos com o tempo. Como têm um período de reabsorção relativamente longo, partículas de enxerto ainda estão presentes após quatro anos em humanos (JANG *et al.*, 2010).

O ideal seria que ocorresse reabsorção total e completa remodelação para o novo osso, entretanto, a taxa de reabsorção varia de um material para outro, o que pode comprometer sua utilização, principalmente em áreas estéticas (HALMAN *et al.*, 2002). O recobrimento dos enxertos com membranas, absorvíveis ou não, está baseado no fato de isolar a área de reparo (enxerto) para evitar a migração e proliferação de células indesejadas (nesse caso, células do tecido conjuntivo), permitindo o povoamento do enxerto com células ósseas, osteoclastos e proteínas em suas partículas, o que permite, dessa forma, a osseointegração eficaz de suas partículas (DAHLIN *et al.*, 1988).

Uma das limitações associada a utilização dos enxertos xenógenos está relacionada a aspectos culturais e religiosos, além da possibilidade de transmissão de doenças. Porém, em contradição, foi demonstrada ausência de proteína no bio-oss® por Benke *et al.* (2001) tornando-o seguro para a utilização em humanos.

Segundo Su-Gwan *et al.* (2001) o bio-oss® atua como um arcabouço graças as suas propriedades osteocondutoras, permitindo a neoformação de capilares, de tecido perivascular e migração de células oriundas do leito receptor. É biocompatível e não induz resposta imune local ou sistêmica. A grande área de superfície interna similar ao osso humano facilita a absorção de proteínas endógenas e fatores de crescimento, assim como a composição química análoga ao osso humano com poucas hidroxilas e mais agrupamentos carbonatos do que outros materiais sintéticos (ROSSI *et al.*, 2019).

O tamanho dos cristais de bio-oss® é comparável ao osso humano, o que pode facilitar a sua absorção, e a sua especial arquitetura porosa natural e com um trabeculado muito semelhante ao osso humano promove uma melhor

revascularização e, ainda, mantém um arcabouço para a osteocondutividade, aumentando a estabilização do coágulo e absorção sanguínea natural entre os micros e macroporos (SU-GWAN *et al.*, 2001).

Piatelli *et al.* (1999) realizaram biópsias de 20 pacientes que haviam sido submetidos a expansão óssea para implante dentários, sendo que oito pacientes foram realizadas biopsias após seis meses do implante; seis após nove meses; três após 18 meses e três após 4 anos. Após seis meses ainda se distinguia claramente as partículas de bio-oss® do osso neoformado, com presença de alguns capilares sem espaço entre as partículas de bio-oss® e o osso neoformado. Aos nove meses os achados eram similares, mas já com presença de células mesenquimais. Aos 18 meses havia menor quantidade de bio-oss® sem infiltrado inflamatório com todos os canais de Harvers formados por osso novo. Nos espécimes avaliados após quatro anos, havia osteoclastos em processo de reabsorção das partículas de hidroxiapatita e células gigantes multinucleadas circundando as partículas. Os autores concluíram que o bio-oss® é bastante biocompatível, além de bom osteocondutor e se integra facilmente e totalmente ao osso neoformado.

Corrobando, Tamimi & Torres (2006) relatam que em suas pesquisas o bio-oss® mostrou propriedades osteocondutoras, não ocorrendo absorção. Logo, o bio-oss® pode ser considerado material não obsorvível, já que a atividade osteoclástica é muito lenta para esse produto, necessitando de período longo para tal.

A absorção do bio-oss® tende a ser demorada, pois o tamanho da partícula do biomaterial impacta diretamente no tamanho da área da superfície disponível para reagir com células e fluido biológico. Quanto maior o tamanho das partículas, maior será o tempo de absorção do material (TEIXEIRA, 2009).

Jensen *et al.* (2011) procederam reparação óssea comparativa entre enxerto ósseo autógeno, bio-oss® (macrogrânulos) e TCP β, em defeitos criados em minipigs. Dos avaliados o que apresentou menor neoformação óssea foi o bio-oss®.

Ezirganli & Kazacionglu (2015) realizaram um estudo guiado em calvárias de coelhos, utilizando bio-oss®, em grânulos de 250 a 1.000µm. No primeiro mês

pós-implantação, não foram observados sinais de absorção das partículas do enxerto. Porém, verificaram atividade osteoclástica tanto aos 60 quanto aos 90 dias de avaliação. Estudos clínicos têm mostrado que este material promove cicatrização óssea e osteointegração de implantes durante a regeneração óssea guiada (ELGALI & TURRI, 2016).

Kuci (2017) em seus estudos empregando bio-oss® em períodos de 60 e 90 dias, observou pouco crescimento ósseo e intensa formação de tecido fibroso, sugerindo que o biomaterial tenha mostrado em seu experimento um menor potencial osteoindutor em relação a outros biomateriais estudados.

Aristizabal *et al.* (2017) realizaram pesquisa na qual os animais foram divididos em três grupos experimentais para preenchimento de defeitos ósseos: grupo I (GI) e grupo II (GII), preenchidos respectivamente com a biocerâmica de fosfato de cálcio nanoestruturada micromacro porosa em grânulos de 40 a 60 mesh, de absorção lenta e moderada e, grupo III (GIII), controle, permanecendo o defeito vazio Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir que as biocerâmicas de fosfatos de cálcio nanoestruturadas micromacro porosas em grânulos de absorção lenta e moderada podem ser indicadas para o tratamento de defeitos ósseos críticos. As biocerâmicas permitem um tipo de crescimento ósseo direto, por meio da formação de um tecido fibrovascular, diferenciação e migração ao local de células osteoblásticas, com síntese de tecido osteoide, e a maturação óssea ocorre mais precocemente quando se emprega a cerâmica de absorção moderada.

Kim *et al* (2020) estudaram a formação óssea em enxertos em calvárias de coelhos com bio-oss® isolado e associado ao osso autógeno na proporção de 25%, verificando que a associação apresentou estabilidade dimensional superior em relação ao uso de osso autógeno isolado no modelo experimental proposto.

Statkiewicz (2022) comparou através de análise histométrica e imunoistoquímica o comportamento dos biomateriais bonefill®, bio-oss® e do osso autógeno na enxertia de seios maxilares de humanos. A histometria apresentou maior formação óssea para o bonefill® ($p<0,002$) em relação ao bio-oss®, e maior presença de biomaterial remanescente para o bio-oss®. A

imunoistoquímica apresentou um padrão de maturação óssea maior para o bonefill® em relação ao bio-oss®.

2-4 Promotores do crescimento ósseo

As estratégias terapêuticas empregadas que visam complementar ou substituir a necessidade de enxerto ósseo autógeno compreendem a implantação de suportes teciduais (enxertos semi-sintéticos ou sintéticos), a administração local de fatores de crescimento e o transplante de células-tronco mesenquimais (VAZ, 2006). Uma alternativa para a potencialização da cicatrização óssea seria a identificação dos fatores que interferem na reparação óssea e a modulação da resposta regenerativa (WHITMAN *et al.*, 1997; MARX *et al.*, 1998; ANITUA, 1999).

2- 4- 1 Plasma rico em plaquetas (PRP)

O fracionamento do sangue total em seus respectivos componentes é uma técnica comumente empregada para fins transfusionais. Do fracionamento resultam os componentes eritrocitários: concentrado de hemárias, concentrado de hemárias lavadas, concentrado de hemárias congeladas hemárias rejuvenescidas, concentrado de hemárias com camada leucoplaquetária removida e concentrado de hemárias desleucocitado; e os componentes plasmáticos: crioprecipitado, plasma fresco congelado, plasma isento do crioprecipitado, plasma comum, não fresco, normal ou simples; e por último os concentrados de plaquetas (CP) (HELDIN & WESTERMARK, 1999; BRASIL, 2016).

As plaquetas exercem funções hemostáticas e não hemostáticas. Dentre as funções não hemostáticas destacam-se efeitos no processo inflamatório, na reparação de feridas. Interagem com leucócitos liberando citocinas, aminas vasoativas, mitógenos e fatores de crescimento. Os fatores de crescimento, armazenados nos α-grânulos, são responsáveis pela diferenciação e proliferação celular, quimiotaxia, neovascularização e deposição de matriz extracelular. A principal função das plaquetas está ligada a manutenção da

hemostasia, auxiliando na reparação vascular e impedindo hemorragias, devido à formação do tampão plaquetário primário (COCCO, 2016).

O plasma rico em plaquetas (PRP) vem sendo utilizado como estimulador da reparação de tecidos moles e duros (MARX, 2000), como uma fonte de fatores de crescimento obtidos do sangue do paciente pelo processo de centrifugação que sequestra e concentra as plaquetas. Esses fatores de crescimento ligam-se a receptores específicos na superfície celular de células alvo, estimulando e/ ou regulando suas ações como as mitoses, quimiotaxia, diferenciação celular e metabolismo (DILIBERTO & GORDON, 1992; GARG *et al.*, 2000; CHO *et al.* 2004).

O reparo espontâneo de diferentes tecidos, incluindo ossos é mediado por diferentes fatores de crescimento, e o processo tem início com a formação do coágulo sanguíneo, continuando com a subsequente degranulação de plaquetas e liberação de fatores de crescimento. Muitos fatores têm sido implicados no processo de reparação óssea: fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGFs), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fatores de crescimento α e β (TGF-α e TGF-β), fator de crescimento fibroblástico ácido e fator de crescimento fibroblástico básico (a-FGF e b-FGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fatores de crescimento tipo insulina I e II (IGF-I e IGF-II), fator de crescimento derivado do cemento (CGF), proteínas relacionadas ao paratormônio (PTHrP) e proteína morfogenética 1 a 12 (BMPs 1-12). Alguns desses fatores de crescimento como o PDGFs (aa, bb e ab), TGF β1 e β2, VEGF e EGF estão no interior dos α-grânulos das plaquetas (MARX, 2000).

Apesar de serem produzidos pelas plaquetas, PDGFs não são usualmente detectados no plasma e a pequena concentração tem baixa meia-vida plasmática (inferior a dois minutos), devido a sua natureza hidrofóbica e catiônica. Por outro lado, PDGFs são facilmente obtidos, pois sua concentração aumenta quando as plaquetas são centrifugadas, no chamado plasma rico em plaquetas (PRP) (KASSOLIS *et al.*, 2000).

Em resposta a um trauma as plaquetas são ativadas e liberam seus fatores de crescimento que agem no processo de reparo ósseo. Além desses observados no coágulo há também fibrina, fibronectina, vitronectina, que são

moléculas de adesão necessárias a migração celular (osteocoletação, epitelização da ferida, osteointegração) (MARX, 2000; SCHMITZ & HOLLINGER, 2001). Isso faz com que o PRP também possua propriedades coesiva e adesiva, ajudando na estabilidade do enxerto sobre a superfície do defeito ósseo, facilitando o processo de reparo e também atuando na hemostasia (KASSOLIS *et al.*, 2000; GARG *et al.*, 2000).

O PRP contém citocinas, além dos fatores de crescimento, entre eles o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento transformador β (TGF β), os quais auxiliam na maturação acelerada de enxertos ósseos. Tais fatores de crescimento podem regular a atividade de osteoblastos e osteoclastos durante o processo de remodelação óssea, além de iniciar e controlar a reparação após um trauma (URIST *et al.*, 1983; BOLANDER, 1992; LIND, 1998; CHEN & ALMAN, 2009).

O quadro 4 apresenta os principais fatores de crescimento e citocinas liberadas das plaquetas e suas respectivas funções.

Quadro 4: Fatores de crescimento e citocinas envolvidas na regeneração tecidual.

Citocina	Símbolo	Funções
Fator de crescimento epidérmico	EGF	Mitogênicos aos ceratinócitos e fibroblastos; estimula a migração de ceratinócitos e formação de tecido de granulação.
Fator transformador de crescimento α	TGF α	Similar ao EGF, estimula a replicação de hepatócitos e células epiteliais.
Fator de crescimento do hepatócito	HGF	Intensifica a proliferação de células endoteliais e epiteliais e de hepatócitos; aumenta a motilidade celular.
Fator de crescimento endotelial vascular (isoformas A, B, C, D)	VEGF	Aumenta a permeabilidade vascular, mitogênico às células endoteliais.
Fator de crescimento derivados das plaquetas (isoformas A, B, C, D)	PDGF	Quimiotáxico aos PMNs, macrófagos, fibroblastos e células musculares lisas, ativa os PMNs, macrófagos e fibroblastos, mitogênico aos fibroblastos, às células endoteliais e às células musculares lisas, estimula a produção de MMPs e fibronectina, estimula angiogênese e contração da ferida, remodelação, inibe a agregação plaquetária, regula a expressão da integrina.
Fator de crescimento derivado do fibroblasto-1 (ácido) -2 (básico)	FGF	Quimiotático aos fibroblastos, mitogênico aos ceratinócitos e fibroblastos, estimula a migração de ceratinócitos e angiogênese, contração da ferida e deposição de matriz.
Fator de crescimento transformador β (isoformas 1, 2, 3), outros membros da família são BMP e activina	TGF- β	Quimiotático aos PMNs, macrófagos, linfócitos, fibroblastos e células musculares lisas, estimula a síntese do TIMP, migração de ceratinócitos, angiogênese e fibroplasia, inibe a produção de MMPs e proliferação do ceratinócitos, regula a expressão da integrina e outras citocinas.
Fator de crescimento do ceratinócito (também denominado FGF-7)	KGF	Estimula a migração, proliferação e diferenciação do ceratinócito.
Fator de crescimento semelhante à insulina-1	IGF-1	Estimula a síntese dos proteoglicanos sulfatados, colágeno, migração do ceratinócito e proliferação de fibroblastos; efeitos endócrinos similares ao hormônio do crescimento.
Fator de necrose tumoral	TNF	Ativa os macrófagos; regula outras citocinas; funções múltiplas.
Interleucinas	IL-1 etc	Muitas funções. Alguns exemplos: quimiotático aos PMNs (IL-1) e fibroblastos (IL-4), estimulação da síntese de MMP-1 (IL-4), angiogênese (IL-8), síntese de TIMP (IL-6); regulação de outras citocinas.
Interferons.	IFN-α etc.	Ativa os macrófagos; inibe a proliferação de fibroblasto e síntese de MMPs; regula outras citocinas.

BMP, proteínas morfogenéticas ósseas; PMNs, leucócitos polimorfonucleares; MMPs, metaloproteinases da matriz; AH, ácido hialurônico; TIMP, inibidor tecidual da metaloproteinase da matriz. Adaptado de Vendramin *et al.* (2006).

Gentile & Garcovich (2020) a partir de seus estudos *in vitro* afirmam que o PRP estimula a proliferação celular humana. Observaram incremento da motilidade celular e exocitose de várias importantes substâncias extracelulares regenerativas como colágeno tipo I e III. Nos testes *in vitro*, o PRP/meio ótimo foi PRP ≤ 10% (Vol/Vol) enquanto a concentração plaquetária ideal desde o início foi de $1,0\text{--}1,5 \times 10^6/\mu\text{L}$. Devido ao constante suprimento nutricional e à rápida difusão dos fatores de crescimento em todos os animais, os autores consideraram os estudos que defendem uma concentração plaquetária relativamente alta para melhor imitar a situação *in vivo*. No entanto, hiperconcentrações também podem ser inadequadas, especialmente em tecidos que são pouco vascularizados.

Everts *et al.* (2020) reconhecem em seu trabalho que ainda há uma falta de padronização e classificação quanto às técnicas de preparação; consequentemente, não existe consenso sobre as bioformulações de PRP, no que diz respeito às concentrações efetivas de dosagem plaquetária necessárias para facilitar a angiogênese. Avaliaram a ação das plaquetas e suas interações com o sistema imunológico inato e adaptativo, abordando a funcionalidade do PRP na inflamação e na redução da dor e a combinação de PRP com AINEs, indicando nessa associação uma redução na liberação de fatores de crescimento, prejudicando a resposta dos pacientes

2- 4- 1- 1 Obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP)

O sangue coagulado contém 95% de células vermelhas, 5% de plaquetas e menos que 1% de leucócitos. No PRP essa relação entre células vermelhas e plaquetas se inverte, com as últimas ocupando aproximadamente 95% do volume total. De fato, o processo de preparação do PRP consiste na segregação das plaquetas, mediante centrifugações, sendo que sua concentração pode aumentar em seis vezes em relação ao sangue normal (GARG *et al.*, 2000).

Não há uma definição acerca da concentração ideal de plaquetas para o PRP, entretanto estudos relatam métodos com um enriquecimento podendo atingir de 5 a 10 vezes a concentração plaquetas no sangue, podendo chegar a um milhão de plaquetas por μL (FABI & SUDARAM, 2014).

Vários protocolos de centrifugação com o propósito de concentrar as plaquetas para a obtenção do PRP são utilizados, diferindo em quantidade de amostra inicial do sangue total; o número, velocidade e tempo de centrifugação e os tipos de tubos coletores e anticoagulantes (FLORES *et al.*, 2012). O quadro 5 apresenta alguns métodos de obtenção do PRP descritos por diferentes autores, explicitando volume de sangue, número e tempo de centrifugações e componente ativador de plaquetas.

Quadro 5: Protocolos para a obtenção do PRP, segundo diferentes autores.

Volume sanguíneo	Centrifugação	Ativação das plaquetas	Referências
não citado	1º estágio: 7 min a 3.000 rpm 2º estágio 5 min a 4.000 rpm	mistura de cloreto de cálcio e trombina	Dae <i>et al.</i> (2011)
10ml	1º estágio: 10 min a 160 g 2º estágio: 10 min a 400 g	cloreto de cálcio	Na <i>et al.</i> (2011)
40ml	1º estágio: 10 min a 1.500 rpm 2º. estágio: 20 min a 3.000 rpm	gluconato de cálcio	Zhu <i>et al.</i> (2013)
30-60ml	1º estágio: 15 min a 3.200 rpm	dado não citado	Jimenez-Canizales <i>et al.</i> (2014)
10ml	1º estágio: 6 min a 1.100 rpm 2º estágio 10 min a 3.000 rpm	cloreto de cálcio	Mikhael & El-Esawy (2014)
20ml	1º estágio: 10 min a 1.200 rpm 2º estágio: 5 min a 1.200 rpm	dado não citado	Guerreiro <i>et al.</i> (2015)
3ml	1º estágio: 10 min a 400g 2º estágio 10 min a 800g	gluconato de cálcio	Vendramini <i>et al.</i> (2006)

2- 4- 1 -2 Aplicações do plasma rico em plaquetas (PRP)

O PRP tem sido utilizado em diversas áreas, como na cirurgia plástica reconstrutiva, para auxiliar na hemostasia, estimular o crescimento de tecidos moles e a cicatrização óssea, para favorecer a aderência de enxertos cutâneos, união de enxertos ósseos, fixação de implantes em crânio ou em ossos planos.

Parece ter um potencial ilimitado de aplicação clínica, em qualquer situação que requeira enxertia óssea macia ou procedimentos repetidos de enxertia, com a vantagem de que as hemácias podem ser devolvidas ao paciente, na forma de papa (MARX *et al.*, 1998).

Diferentes fontes de PRP podem ser utilizadas para terapias regenerativas, sendo elas a autóloga, homóloga e heteróloga, tendo a primeira, a vantagem de reduzir a transmissão de doenças infecciosas e reações de rejeição imunológica. Porém existem alguns casos nos quais o emprego de PRP autólogo deve ser evitado, como em pacientes com feridas associadas a doenças crônicas, como doenças cardíacas, diabetes mellitus e hipertensão que ao longo prazo acabam por desenvolverem um quadro de trombocitopenia, contraindicando sucessivas coletas de sangue, assim como em casos de feridas extensas causadas por queimaduras (BARRIONUEVO *et al.*, 2015).

2- 4- 1- 3 Plasma rico em plaquetas (PRP) em cicatrização óssea

O PRP pode ser utilizado em defeitos ósseos ao redor de implantes de titânio associados a enxertos ósseos (WHITMAN *et al.*, 1997), ou a membranas (PETRUNGARO, 1995).

Existem muitos estudos clínicos com a utilização do PRP para preencher falhas ósseas em humanos, como, por exemplo, o acetábulo expandido, em associação com enxerto ósseo autógeno ou homólogo, em operações de revisão de prótese do quadril e outras (REDDI, 1998).

Aghaloo *et al.* (2005) em estudo avaliando o efeito do PRP na regeneração óssea de defeito crítico no crânio de coelhos não observaram diferença significativa entre os grupos sem e com PRP, embora tenha percebido uma tendência ao aumento da densidade e da área óssea nos grupos que receberam o PRP.

Viegas *et al.* (2006) utilizaram PRP na regeneração do tecido ósseo alveolar e cortical. Em seus experimentos em um modelo de defeito ósseo periodontal em caninos e em modelo de defeito ósseo cortical em ovinos verificaram que o comprimento e área óssea foram afetadas, com valores

superiores nos acréscidos de PRP, relativamente ao controle, o que ratifica que o PRP apresenta potencial para estimular a regeneração óssea.

Andrade *et al.*, (2007) consideraram um fator importante a ser levado em consideração o qual sustenta a ideia de melhor reparação óssea nos tratamentos com PRP é o incremento no reparo dos tecidos moles que revestem defeitos ósseos tratados com enxerto e PRP.

Souza (2010) avaliou a cicatrização óssea de fraturas experimentais em cães, observando maior expressão dos fatores de crescimento PDGF-B e TGF- β e portanto uma melhor cicatrização óssea nos animais tratados com plasma rico em plaquetas.

2- 5 Biomateriais e plasma rico em plaquetas (PRP)

As metodologias que envolvem a associação de diversos biomateriais ao PRP foram muito estudadas nos anos 2000, especialmente como uma alternativa importante para falhas ósseas críticas.

O emprego do PRP representa um dos grandes avanços na cirurgia reconstrutiva, uma vez que oferece acesso aos fatores de crescimento com uma tecnologia simples e acessível. Além disso, PRP apresenta capacidade de formar um gel biológico no qual pode ser acrescido o enxerto, estabilizando o coágulo, de modo a funcionar como um adesivo (MANDELLI, 2010).

A HA associada a fatores de crescimento pode formar osso em sítio ectópico, como no pavilhão auricular de coelhos. Esta cerâmica ofereceu uma aceitável armação para o crescimento ósseo, e juntamente com a BMP e o PRP mostraram-se como substitutos ósseos razoáveis pois foram biocompatíveis, biodegradáveis, osteoindutivos e de natureza osteogênica (VARGAS, 2018).

Aghaloo *et al.* (2005), compararam PRP com bio-oss®, somente o bio-oss®, osso autógeno e o grupo controle sem nenhum enxerto, através de quatro defeitos criados em crânios de 15 coelhos. Como esperado, os resultados do osso autógeno foram superiores.

Camarini *et al.* (2006) avaliaram o possível favorecimento do processo de reparo ósseo através da utilização do plasma rico em plaquetas (PRP), associado a biomateriais em cavidades ósseas cranianas de cães. Através da análise microscópica, concluíram que os materiais estudados (hidroxiapatita e bio-oss®) apresentaram propriedade osteocondutora e ausência de reação inflamatória. A presença ou não do PRP não interferiu na evolução do reparo, e segundo os autores, é mister a continuidade de novas investigações científicas envolvendo o PRP e suas aplicações.

Froum *et al.* (2008) demonstraram em seus estudos comparando o PRP associado ao bio-oss® e isoladamente bio-oss®, por avaliações tomográficas por um e dois meses, a presença de maior densidade óssea no grupo com PRP. Realizaram enxertos sinusais em três pacientes. Cada paciente recebeu PRP e bio-oss® em um lado e somente bio-oss® em outro. A avaliação da quantidade de osso vital demonstrou que não houve diferença com a adição de PRP. A avaliação do contato osso implante não demonstrou nenhum benefício com o emprego do PRP.

Em seus estudos, Torres *et al* (2009) realizaram um ensaio clínico randomizado de enxertia em cavidade oral com um grupo controle com bio-oss® e um grupo de teste bio-oss® com PRP. Os resultados indicaram que o PRP pode melhorar a osteocondutividade e as propriedades do biomaterial, aumentando o novo osso formado.

O plasma rico em plaquetas, quando associado a biomateriais, como a hidroxiapatita de cálcio e o vidro bioativo facilita a incorporação do enxerto ao osso da maxila, acelerando a cicatrização (MARTINS *et al.*, 2010).

Penteado & Colombo (2013) testaram o uso de VB - uma cerâmica com óxido de silício associado a PRP na calvária de 10 coelhos. Os láparos foram separados em dois grupos e trepanações de 8mm foram realizadas em cada osso parietal com posterior preenchimento com coágulo ou VB num grupo e PRP ou VB associado a PRP no outro. Realizaram controles radiológicos semanais e, histológicos após 12 semanas de cicatrização dos defeitos criados. Ao final deste período, nenhum defeito preenchido com coágulo estava totalmente preenchido e por este motivo estes defeitos foram considerados críticos. Quanto

aos demais grupos, houve um aumento na regeneração óssea dos grupos tratados com PRP (sem diferença entre eles), sugerindo que o PRP carreando fatores de crescimento como PDGF, TGF- β , VEGF, IGF-I entre outros seja de fundamental importância para estimular a diferenciação osteogênica local. Outra constatação deste trabalho foi a de que o VB sozinho foi incapaz de promover qualquer tipo de regeneração óssea provavelmente pela ausência de células ou dos fatores de crescimento.

Lemos *et al.* (2015) pesquisaram os efeitos do plasma rico em plaquetas em associação com enxertos ósseos em aumento do seio maxilar e concluíram que a meta-análise atual indica que não há influência do PRP em associação com enxerto ósseo no osso para a formação e sobrevida do implante no levantamento do seio maxilar.

Pocaterra *et al.* (2016) estudaram a eficácia do plasma rico em plaquetas como material adjuvante para enxerto ósseo através de uma revisão sistemática e metanálise de ensaios clínicos controlados. Dos casos identificados, apenas um relatou diferença no aumento ósseo a favor do uso adjuvante do PRP, enquanto quatro não encontraram diferença significativa. Nenhum dos estudos incluídos relatou diferença significativa na taxa de sobrevida do implante.

Roffi *et al.* (2016) pesquisaram o uso do plasma rico em plaquetas para o tratamento de defeitos ósseos, verificaram que os resultados pré-clínicos parecem apoiar o benefício do PRP em 91,1 % dos estudos, entretanto uma análise mais aprofundada sublinha uma menor taxa de sucesso, com um resultado positivo de 84,4% em termos de análise histológica, e ainda menor quando se considera análises radiológicas e biomecânicas, 75,0% e 72,7%, respectivamente. O benefício do uso de PRP para tratar fraturas e não uniões é questionável. De modo geral, a literatura disponível apresenta grandes limitações em termos de baixa qualidade e extrema heterogeneidade, que dificultam a possibilidade de otimizar o tratamento com PRP e traduzir achados pré-clínicos positivos sobre seu potencial biológico para favorecer a cicatrização óssea em um benefício clínico real.

Basilio *et al.* (2018) relataram um caso clínico de tratamento na região posterior da maxila de enxerto em seio maxilar utilizando hidroxiapatita (HA)

sintética versus xenoenxerto (bio-oss®) acompanhado de L-PRF (fibrina rica em plaquetas e leucócitos) com o objetivo de instalar implantes dentais, com posterior análise clínica e histológica da neoformação óssea. Os biomateriais utilizados no caso clínico foram selecionados por suas características físico-químicas, com granulação 0,25mm a 1,00mm porosa e de baixa cristalinidade. Estas características dos biomateriais proporcionaram sua substituição gradual por tecido ósseo e uma regeneração óssea adequada, além de promoverem a osseocondução para a formação de novo osso em contato íntimo com o biomaterial, observado na histologia. Clinicamente, todos biomateriais permitiram a instalação dos implantes com torque de 45 N.

Segundo Claudino & Alves (2019) o plasma rico em plaquetas atua como um fator de crescimento para enxertos ósseos e atualmente estudos e experiências com este adicionado ao biomaterial tem mostrado uma consolidação mais rápida e uma mineralização do enxerto na metade do tempo, além de uma melhora de 15% a 30% na densidade do osso trabecular, promovendo o conceito, que o PRP, um coágulo de fibrina (às vezes referido como uma cola de fibrina), é rico em plaquetas as quais liberam, em períodos cíclicos, PDGF e TGF- β . O PDGF parece ser o primeiro fator de crescimento presente em uma ferida e inicia a reparação do tecido conjuntivo, incluindo regeneração e reparo ósseo. Além de, ser altamente aceito pelo organismo, não tendo qualquer tipo de rejeição pelo paciente.

Ponte (2020) realizou pesquisa cujo objetivo foi analisar histomorfometricamente alvéolos dentários humanos pós-extração tratados com fibrina autóloga, fosfato de cálcio bifásico ou uma associação de ambos. Foram testados diferentes tratamentos: preenchimento com fibrina autóloga na forma de *plug* recoberto por membrana de fibrina (G1), fibrina associada a enxerto aloplástico a base de hidroxiapatita e beta fosfato tricálcio recobertos por membrana de colágeno (G2) ou enxerto aloplástico a base de beta fosfato tricálcio recoberto por membrana de colágeno (controle). A avaliação histomorfométrica de cada amostra foi baseada em três microtomias e dez campos histológicos por microscopia, sendo analisada a média e o desvio padrão de osso neoformado, tecido conjuntivo, biomaterial remanescente e outras estruturas. Os dados paramétricos foram analisados por ANOVA e pós-testes de

Tukey e significância estatística de 5% ($p<0,05$) e seguiram avaliação de normalidade com o teste de Jarque-Bera (JB). Houve maior média de osso neoformado em G1 (68,83% 4,95) em comparação a G2 (35,69% 7,86) e controle (16,28% 13,90). O controle teve maior presença de tecido conjuntivo (61,56 % 11,85), seguido do G2 (32,67% 13,69) e G1 (13,95% 3,48). Houve maior presença de biomaterial em G2 (15,75% 11,63), mas sem diferença estatística para o grupo controle (8,43% 3,10). O parâmetro outras estruturas, seguiu sem diferenças estatísticas, G1 (17,21% 5,53), G2 (15,88 % 7,06) e controle (13,73 % 4,78). O bom padrão de regeneração óssea obtido com uso de fibrina isolada sugere a eficácia e a efetividade desta modalidade terapêutica, estimulando o uso clínico deste concentrado plaquetário no consultório odontológico.

Marchiolli & Moreno (2022) apresentaram um caso clínico de regeneração óssea guiada com uso de fibrina rica em plaquetas e leucócitos. Após a exodontia foi conduzida a instalação imediata do implante e regeneração óssea guiada. Observaram no estudo a integridade do substituto ósseo na região enxertada, assim como, a saúde e a integridade peri-implantar.

2- 6 Análises empregadas para o estudo da neoformação óssea

2- 6- 1 Análise histológica

Mediante a observação das lâminas preparadas ao microscópio óptico é possível a identificação dos diferentes tipos celulares presentes na amostra, e dessa forma a classificação dos diferentes estágios da reparação óssea, assim como eventuais processos patológicos.

O processamento histológico inicia com a lavagem das amostras em água corrente por 24 horas com objetivo de eliminar o fixador (formol), em seguida é promovida a desidratação para promover a retirada de água do tecido, de forma que possibilite a posterior infiltração da resina, já que estes não são miscíveis. O passo seguinte é a diafanização, ou seja, a remoção total de resíduos de água e álcool contidos na amostra. As amostras devem permanecer dois dias e, ainda,

seguidos de uma nova troca por mais dois dias no xanol. Dessa forma, o uso do xanol, além de completar a desidratação, permite uma condição favorável à infiltração da resina. A infiltração é o período necessário para que a resina metilmacrilato (MMA) seja dissipada por toda amostra preenchendo o tecido sem descalcificar.

A inclusão é a etapa na qual a resina é vertida sobre a peça cobrindo-a totalmente com excesso de solução. Uma vez a amostra estando inclusa, o próximo passo é a microtomia, que consiste na obtenção de finas secções ou cortes do bloco de resina permitindo a confecção de lâminas histológicas. O bloco deve ser posicionado conforme o plano de interesse. Nas amostras com implante, por exemplo, o bloco é posicionado de forma que o sentido do corte esteja de acordo com o longo eixo do implante.

A coloração é um conjunto de etapas a que as lâminas histológicas são submetidas para observação com clareza diferentes contrastes, o que permitirá identificar e distinguir significativamente diferentes estruturas teciduais resultando em uma análise qualitativa e quantitativa da amostra.

2- 6- 2 Análise histomorfométrica

A histomorfometria é um método que fornece consistente informação sobre a organização microscópica e estrutura do tecido ósseo, através de análise assistida por computador das imagens dos cortes histológicos. É uma avaliação histológica de uma região óssea calcificada com o objetivo de estudar a remodelação estática e dinâmica além da estruturação óssea (KULAK & DEMPSTER, 2010), ou seja, quantifica o processo de formação e reabsorção óssea (VARGAS, 2018).

A análise histomorfométrica é tradicionalmente avaliada em duas dimensões por meio da histologia, onde os parâmetros estruturais e de remodelação são medidos em trinta e seis medições feitas em microscópios, sendo as variações avaliadas área, perímetro e espessura. Os parâmetros são divididos em duas categorias: estrutura, a qual fornece informações precisas

sobre a massa óssea e remodelamento, através do qual é possível averiguar a quantidade de osso não mineralizado (osteóide) e a extensão da cavidade de absorção (KULAK & DEMPSTER, 2010, ALVES, 2005).

2- 6- 3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os microscópios ópticos convencionais limitam-se a um aumento máximo de 2.000 vezes, acima disso detalhes menores são imperceptíveis. Os aparelhos mais modernos permitem aumentos de 300.000 vezes ou mais, para a maior parte dos materiais sólidos, conservando a profundidade de campo compatível com a observação de superfícies rugosas. A análise através da MEV permite observar a topografia superficial dos biomateriais especialmente em relação ao aspecto microscópico, tamanho dos grânulos e porosidade. A MEV é uma das mais versáteis análises disponíveis para a observação de características microestruturais de materiais sólidos em estudos *in vitro* e *in vivo* (DEDAVID, 2007).

A principal razão de sua utilidade é a alta resolução que pode ser atingida. Outra característica importante da MEV é a aparência tridimensional da imagem, resultado direto da grande profundidade de campo. Possibilita também o exame em pequenos aumentos e com grande profundidade de foco, o que é muito útil, pois a imagem eletrônica complementa a informação obtida pela imagem óptica. As imagens fornecidas por MEV possuem caráter virtual, sendo visualizadas em um monitor através da transcodificação da energia emitida pelos elétrons. A MEV pode ser usada na caracterização de amostras biológicas não resistentes a grandes diferenças de pressão e qualquer outro tipo de amostra na qual a metalização pode gerar artefatos. Um dos objetivos da MEV é a análise de superfícies irregulares, como dos ossos, favorecendo uma análise qualitativa uma vez que a análise qualitativa acurada de sua superfície é difícil pela dificuldade em se padronizar amostras biológicas (DIAMANTINO *et al.*, 2017).

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) pode ser empregada para a realização de estudos de caracterização morfológica, microestrutural de biomateriais e na avaliação celular e tecidual de biomateriais

obtidos de estudos *in vitro* e *in vivo*. Um dos objetivos da técnica de MEV é a avaliação de superfícies irregulares, como os ossos (DIAMANTINO *et al.*, 2017).

Pode conceder informações relevantes sobre as características estruturais e identificação de elementos químicos de materiais sólidos, permitindo alta resolução das amostras analisadas, propiciando imagens tridimensionais, resultantes da grande profundidade de campo. Pode-se afirmar ainda que o exame de MEV funciona como um complemento do exame de microscopia óptica (DEDAVID, 2007).

Landi *et al.* (2008) realizaram experimentos sobre a caracterização morfológica e microestrutural empregando MEV para a avaliação de biomateriais de fosfatos de cálcio granulados de hidroxiapatita com 5,7% em mol de magnésio.

Estudos de MEV sobre a caracterização da viabilidade celular *in vitro* com osteoblastos utilizando o biocimento de HA granulada na forma de microesferas microporosas revelaram a morfologia dessas microesferas de HA com tamanhos entre aproximadamente 100 μ e 300 μ m. Já o resultado obtido da viabilidade celular no teste *in vitro* mostrou a presença de osteoblastos aderidos na superfície das microesferas, indicando que o biocimento é bioativo e biocompatível (GINEBRA *et al.*, 2010).

Zhang *et al.* (2013) pesquisaram a viabilidade *in vitro* de osteoblastos por um período de 12 horas, com o uso de biocimentos de silicatos de cálcio carregados com proteína morfogenética humana. Observaram em suas micrografias obtidas por MEV que ocorreu a adesão de osteoblastos na superfície do biocimento. Concluiram que o biocimento de silicato de cálcio é bioativo, biocompatível, podendo ser usado como substituto ósseo.

2- 6- 4 Dureza Shore A (análise macroscópica)

O ensaio de dureza Shore A é realizado com objetivo de avaliar a resistência à penetração apresentada pelo novo tecido formado. Este ensaio procura relacionar os valores obtidos da dureza Shore A entre as diferentes composições de biomateriais utilizados em implantes. A metodologia

empregada é semelhante a utilizada por outros autores que utilizaram a dureza Shore A para avaliação das propriedades mecânicas do osso humano (WÄHNERT, 2010).

3 OBJETIVOS

3- 1 Objetivo geral

Avaliar o processo de crescimento ósseo guiado em calvárias de coelhos e comparar o benefício do emprego de diferentes biomateriais granulados microporosos (HA, bio-oss® e bonefill®), isolados e com a associação de plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo, em diferentes tempos de evolução.

3- 2 Objetivos específicos

- Por meio de histologia avaliar qualitativamente o modelo de crescimento ósseo guiado proposto, nos tempos 60 e 90 dias:
 - identificar os diferentes tipos celulares presentes nas amostras coletadas;
- Por meio de histomorfometria avaliar quantitativamente o modelo de crescimento ósseo proposto, nos tempos 60 e 90 dias:
 - quantificar o percentual de osso neoformado presente nas amostras coletadas;
- Por meio de histomorfometria estimar a incorporação ou absorção dos biomateriais nos tempos 60 e 90 dias;
 - quantificar o percentual de biomaterial remanescente;
- Através da comparação entre os grupos 60 e 90 dias de acompanhamento com plasma rico em plaquetas (PRP) e os grupos 60 e 90 dias sem PRP, estimar a capacidade osteogênica do PRP:
 - comparar os diferentes tipos celulares encontrados nos estudos histológicos;
 - comparar o percentual de osso neoformado através dos estudos histomorfométricos;
 - comparar a infiltração celular observada através dos estudos por microscopia eletrônica de varredura;

- Por meio do teste de dureza, comparar a resistência mecânica dos diferentes biomateriais e avaliar a influência do plasma rico em plaquetas:
 - correlacionar os resultados obtidos com os diferentes tipos celulares encontrados na histologia, e com os percentuais de osso neoformado encontrados na histomorfometria;
 - correlacionar os resultados obtidos com as características morfológicas obtidas nas análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Por meio de microscopia eletrônica de varredura avaliar qualitativamente as capacidades osteocondutiva e osteointegrativa dos diferentes biomateriais (hidroxiapatita, bio-oss® e bonefill®):
 - verificar a presença de crescimento celular;
 - verificar a presença de infiltração por proliferamentos fibroblásticos entre os poros.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi encaminhado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), protocolo nº8269030220, e foi conduzido conforme normas do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal).

Para o estudo foram estudados vinte coelhos, os quais foram divididos em quatro grupos de cinco animais, dois para coleta de amostras aos 60 dias de pós-operatório e dois para coleta aos 90 dias. Em cada unidade experimental foram empregados três diferentes biomateriais (hidroxiapatita, bio-oss® e bonefill®), acrescidos ou não por PRP (Quadro 6). O modelo empregado compreendeu vinte unidades experimentais que foram divididas em quatro grupos. Dos quatro grupos, dois tiveram coletas de amostras aos 60 dias de pós-operatório e dois aos noventa dias. Dois grupos de 60 dias, dois receberam tratamento somente com biomateriais e dois com os biomateriais acrescidos por PRP. De maneira análoga procedeu-se para os pacientes dos grupos 90 dias.

Quadro 6: Demonstração do delineamento experimental.

Unidades experimentais	20 coelhos			
Tempo avaliação	60 dias		90 dias	
Tratamento	Biomateriais sem PRP	Biomateriais com PRP	Biomateriais sem PRP	Biomateriais com PRP
Grupos experimentais	5 coelhos	5 coelhos	5 coelhos	5 coelhos
Identificação	C1-6 C2-6 C3-6 C4-6 C5-6	C1-6P C2-6P C3-6P C4-6P C5-6P	C1-9 C2-9 C3-9 C4-9 C5-9	C1-9P C2-9P C3-9P C4-9P C5-9P

Fonte: Autor

Legenda:

C1-6: coelho 1, 60 dias sem PRP;
 C2-6: coelho 2, 60 dias sem PRP;
 C3-6: coelho 3, 60 dias sem PRP;
 C4-6: coelho 4, 60 dias sem PRP;
 C5-6: coelho 5, 60 dias sem PRP;
 C1-6P: coelho 1, 60 dias com PRP;
 C2-6P: coelho 2, 60 dias com PRP;
 C3-6P: coelho 3, 60 dias com PRP;
 C4-6P: coelho 4, 60 dias com PRP;
 C5-6P: coelho 5, 60 dias com PRP;

C1-9 coelho 1, 90 dias sem PRP;
 C2-9: coelho 2, 90 dias sem PRP;
 C3-9: coelho 3, 90 dias sem PRP;
 C4-9: coelho 4, 90 dias sem PRP;
 C5-9: coelho 5, 90 dias sem PRP;
 C1-9P: coelho 1, 90 dias com PRP;
 C2-9P: coelho 2, 90 dias com PRP;
 C3-9P: coelho 3, 90 dias com PRP;
 C4-9P: coelho 4, 90 dias com PRP;
 C5-9P: coelho 5, 90 dias com PRP;

A parte do experimento que envolveu procedimentos clínicos, desde a adaptação dos modelos experimentais, processamento de plasma rico em plaquetas, realização de cirurgias, acompanhamento pós-operatório e coletas de amostras foi conduzida no Hospital de Clínicas Veterinárias, UDESC – CAV (Lages/SC).

O processamento histológico e histomorfometria por sua vez deu-se junto ao Laboratório de Patologia Veterinária (LABOPAVE), na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em Curitibanos, SC.

As análises por microscopia eletrônica de varredura foram realizadas em parceria com o Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em Florianópolis.

4- 1 Biomateriais estudados

4- 1- 1 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita utilizada para realização deste trabalho foi sintetizada e fornecida pelo Grupo de Estudos em Biomateriais do CCT (Centro de Ciências Tecnológicas), UDESC, Joinville, SC.

Neste experimento os grânulos foram caracterizados quanto a sua morfologia, cristalografia e físico-química. As investigações foram realizadas por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), difratômetria de raio 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 raio x possibilitaram a avaliação química.

Os biomateriais utilizados como controle foram os comerciais bio-oss®, e bonefill®, com granulometria de 0,25 – 1mm e 0,6 – 1,5mm respectivamente, sendo comprados diretamente com as distribuidoras.

4- 1- 2 Bio-oss® (0,25 - 1mm)

Geistlich Pharma do Brasil

Av. Brig. Faria Lima, 1461 - 13 andar - cj. 131/134

01452-002 São Paulo – Brazil
Fone 11 3097-2555 11 4118-1777

4- 1- 3 Bonefill® (0,6 – 1,5mm)

Bionnovation Produtos Biomédicos LTDA.
Rua Laureano Garcia, 1-275 –CEP: 17039-760 Bauru - SP
Fone 55-14 4009 2400 • SAC 0800 707 3824

4- 2 Plasma rico em plaquetas (PRP)

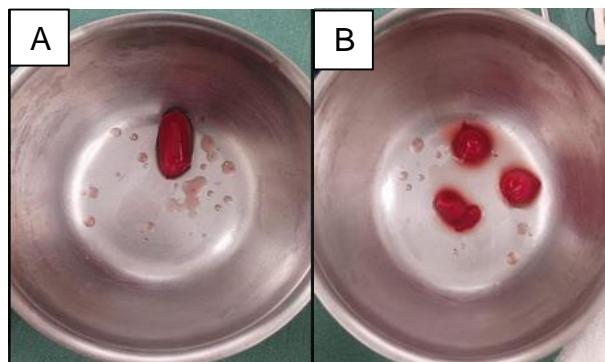
O plasma rico em plaquetas foi processado junto ao Laboratório de Patologia Clínica da UDESC/ Lages, a partir do sangue coletado do próprio paciente previamente anestesiado para a realização do procedimento cirúrgico.

4- 2- 1 Obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP)

A obtenção do plasma rico em plaquetas foi conduzida através da técnica adaptada de Vendramini *et al.* (2006), com processamento das amostras de sangue total imediatamente após a coleta de 3ml, proveniente da artéria auricular dos coelhos desta pesquisa. Esse volume foi armazenado em tubos contendo citrato de sódio como anticoagulante. Em seguida conduziu-se a contagem de plaquetas manual para obtenção do número basal.

As amostras foram submetidas a primeira rotação a 400g durante 10 minutos. O sobrenadante do plasma foi então separado e armazenado em tubos de vidro, sendo novamente submetido a rotação, dessa vez a 800g durante 10 minutos. O sobrenadante pobre em plaquetas foi descartado, restando cerca de 1ml de plasma enriquecido (Figura 5). Desta amostra foi realizada uma nova contagem de plaquetas e após, a esta amostra foi adicionado 0,3ml de gluconato de cálcio 10% e deixado em banho maria à 37°C por 15 minutos para estimular a ativação plaquetária.

Figura 5: A- Aspecto do PRP autólogo processado a partir de 3ml de sangue; B- O mesmo coágulo fracionado em três partes para a adequação em três campânulas com os diferentes biomateriais.



Fonte: Autor

4- 2- 2 Contagem do número de plaquetas

Foram utilizados três métodos de contagem de plaquetas com a finalidade de melhor interpretação dos dados, sem alterações por metodologia.

- Contagem automatizada por analisador hematológico BC 2800 Vet: neste equipamento ocorre a diluição das células do sangue em um condutor elétrico, deixando as células passarem por uma pequena abertura entre dois eletrodos. A impedância elétrica é gerada proporcionalmente ao tamanho da célula à medida que essa passa pela abertura;
- Contagem por estimativa em esfregaço sanguíneo: após confecção dos esfregaços sanguíneos, estes foram corados com corante tipo Romanowsky e então as plaquetas foram estimadas em 5 campos de visão em aumento de 1000 x em imersão;
- Contagem manual em hemocitômetro: foi utilizada diluição 1:100 de amostra de sangue para solução de oxalato de amônio 1%, que é responsável pela lise dos eritrócitos e leucócitos. A amostra diluída foi submetida a forte agitação com auxílio de agitador tipo Vortex para auxiliar a lise. Os dois retículos do hemocitômetro foram preenchidos e mantidos incubando por 20 minutos. A contagem foi realizada nos dois retículos da câmara e o resultado foi multiplicado pelo fator 2525.

4- 3 Modelos experimentais

Foram estudados vinte coelhos (*Oryctolagus cuniculus* – coelho doméstico), mestiços, machos, com média de idade de oito meses e peso médio de 4Kg, considerados saudáveis por meio de exame físico.

Foram alojados no Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) do CAV/UDESC, em gaiolas de 60x60x60cm, em temperatura controlada, alimentação com ração peletizada para a espécie, alimentação natural (folhas verdes, feno e cenouras) e água *ad libitum*, previamente ao experimento, para adaptação ao manejo e posteriormente aos procedimentos cirúrgicos para acompanhamento clínico (Figura 6). Antes dos procedimentos (um mês) foi administrada ivermectina (0,4mg/kg, via subcutânea).

Figura 6: Alojamento de coelhos em gaiolas suspensas com ração e água *ad libitum*.



Fonte: Autor

4- 4 Procedimentos anestésicos e cirúrgicos

As intervenções anestésicas e cirúrgicas foram conduzidas pela mesma equipe durante todo experimento.

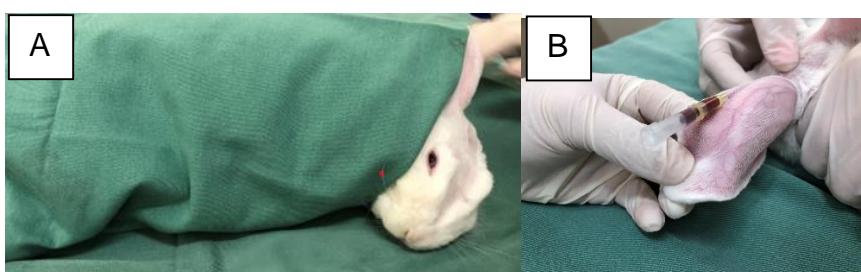
4- 4-1 Preparo pré-operatório

Após a avaliação clínica, foram feitas coletas de 4ml de sangue da veia marginal da orelha para realização de hemograma e bioquímica sérica (alanina amino transferase e creatinina). Foi instituído jejum sólido de 4 horas antes dos procedimentos anestésicos.

4- 4- 2 Medicação pré-anestésica

Mediante contenção física com campo cirúrgico (Figura 6), foi administrada a medicação pré-anestésica (Cetamin®, Syntec, Santana de Panaíba/SP, Brasil) na dose de 10 mg/kg associada a midazolam 0,5% na dose de 2,0mg/Kg, via intra-muscular(Laboratório Cristália São Paulo Brasil) e sulfato de morfina (Dimorf®, Cristália, Itapira/SP, Brasil) na dose de 0,5mg/Kg por via intramuscular. As orelhas foram preparadas com tricotomia para o acesso arterial (coleta de sangue para separação do PRP) (Figura 7) e venoso (fluidoterapia trans-operatória). Para a profilaxia antimicrobiana empregou-se enrofloxacina (10mg/kg, por via intravenosa).

Figura 7: A- Contenção física do paciente com campo cirúrgico para a administração de medicação pré-anestésica; B- Acesso da artéria auricular mediante anestesia e antisepsia para a coleta de sangue.



Fonte: Autor

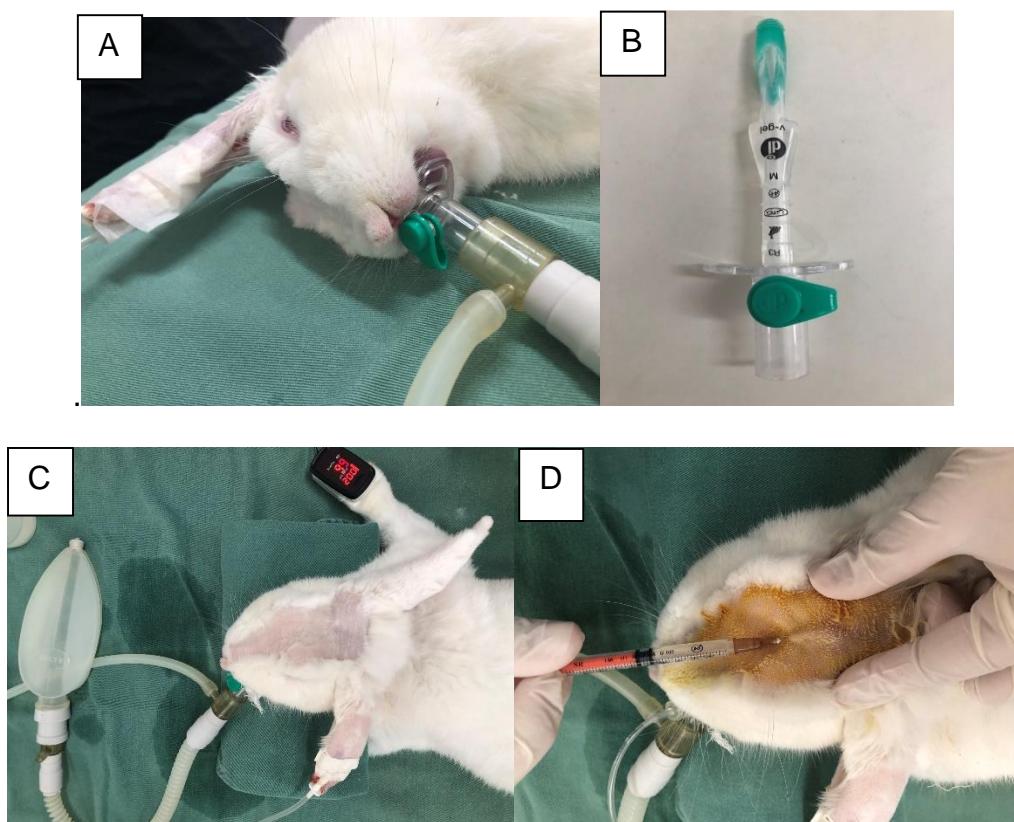
A tricotomia do campo operatório abrangeu a porção dorsal do crânio, desde as orelhas até os processos supraorbitais rostrais, com os limites laterais margeados pelas pálpebras superiores.

4- 4- 3 Indução e manutenção anestésica

Os animais foram induzidos com isoflurano (medicamento genérico, BioChimico, Rio de Janeiro/RJ, Brasil) através de máscara facial. Após relaxamento mandibular foi conduzida a abertura da cavidade oral, borrifando-se na região da glote, cloridrato de lidocaína 100mg/ml, em spray, para em seguida realizar a introdução da máscara laríngea (V-Gel® DocsInnovent Ltda, London/UK) de tamanhos R3 ou R4, dependendo da compatibilidade com o tamanho do animal. A máscara laríngea foi utilizada para manutenção da anestesia inalatória com isoflurano a 1CAM, diluído em oxigênio a 100%, em

vaporizador calibrado, com fluxo variando entre 200-300ml/kg/min. Resgates analgésicos foram instituídos com fentanil (5mcg/Kg), (Laboratório Cristália, São Paulo, Brasil) conforme necessidade, mediante monitoração. Na linha de incisão conduziu-se a infiltração subcutânea em linha de lidocaína 2% (medicamento genérico, Hypofarma, Ribeirão das Neves/MG, Brasil) sem vasoconstritor, na dose de 7 mg/kg (Figura 8).

Figura 8: A- Paciente em decúbito lateral direito, com acesso venoso para fluidoterapia e administração de medicamentos e máscara inserida e conectada ao sistema de Baraka. B- Modelo da máscara V-gel empregada na intubação,C- Paciente em decúbito esternal, anestesiado no sistema de baraka. D-Infiltração de anestésico local em campo cirúrgico após a antisepsia.



Fonte: Autor

Foram aferidos os seguintes parâmetros: frequência cardíaca (FC – bat/min), com estetoscópio; saturação parcial de oxigênio na hemoglobina (SpO₂ - %) pelo pulso oxímetro com o sensor posicionado na região escrotal ou pavilhão auricular, com auxílio de um monitor multiparamétrico (Datex-Ohmeda 9100C);

frequência respiratória (f - mov/ min), através da movimentação do gradil costal; temperatura retal (TR °C) através de termômetro digital.

4- 4- 4 Técnica operatória

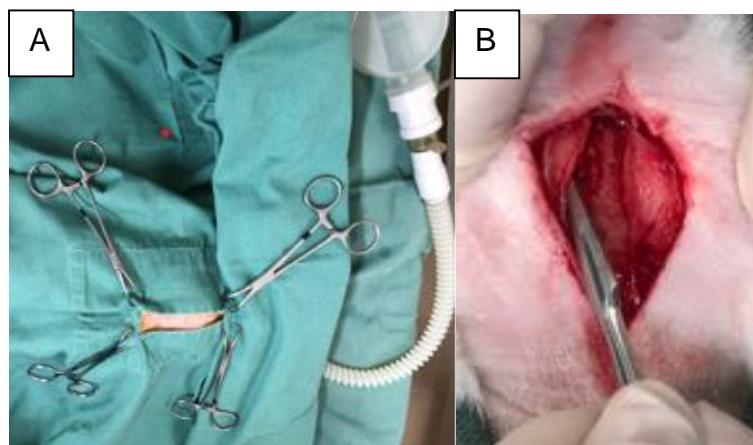
Todas as cirurgias foram realizadas pelo mesmo cirurgião.

Com o paciente em decúbito esternal, membros presos junto a mesa cirúrgica, cabeça mantida na mesma altura do dorso com o emprego de um apoio sob a mandíbula, orelhas tracionadas caudalmente e fixadas com esparadrapo, realizou-se a antisepsia do campo operatório com o emprego do protocolo álcool-iodo-álcool.

Para os pacientes dos grupos 60 e 90 dias para os quais foi empregado PRP, a obtenção do mesmo deu-se como descrito anteriormente.

Após adequação dos campos cirúrgicos (Figura 9- A) foi iniciada a diérese através de uma incisão cutânea retilínea magistral sobre a crista sagital, em sentido rostrocaudal, estendida até próximo da região interorbital, com aproximadamente 5cm de comprimento. Ato contínuo o periósteo foi incisado e rebatido lateralmente, com o auxílio de um elevador periosteal, para permitir a exposição dos ossos parietais esquerdo e direito e o osso frontal (Figura 9– B).

Figura 9: A- Paciente posicionado, em plano anestésico, com campos cirúrgicos fixados; B- Periósteo sendo rebatido para a exposição óssea, mediante diérese de pele e subcutâneo prévias.



Fonte: Autor

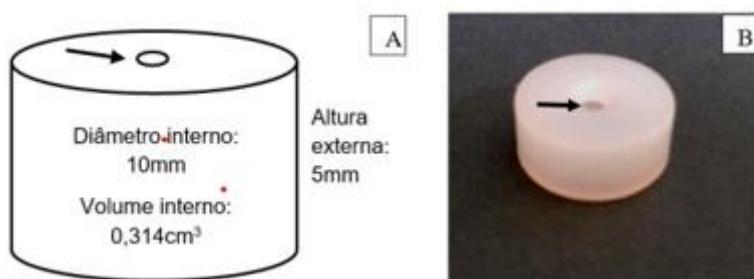
A região exposta foi dividida em três partes, onde, em cada uma delas, foram adaptadas guias de crescimento de náilon, preenchidas no sentido rostrocaudal por:

- I hidroxiapatita
- II bio-oss®
- III bonefill®,

Foram operados vinte animais, separados em quatro grupos de cinco, sendo dois grupos para coleta de amostras para estudos aos sessenta dias e dois grupos para coletas aos noventa dias. Dos dois grupos de cada período de avaliação, em um foi empregado o biomaterial isoladamente e em outro acrescido por PRP autólogo, no interior das campânulas.

Os dispositivos empregados para a implantação dos biomateriais nas calvárias, associados ou não ao PRP, foram confeccionados em náilon, um polímero termoplástico dúctil, com boa usinabilidade e propriedades mecânicas. O náilon possui estabilidade química, sendo bioinerte, com baixa molhabilidade em fluidos corpóreos. O dispositivo foi fabricado pelo CCT/UDESC com dimensões de 5mm de altura e 10mm de diâmetro interno, tendo então um volume interior com cerca de $0,314\text{cm}^3$ (Figura 10). Foi esterilizado previamente.

Figura 10: A- Desenho representativo do dispositivo de náilon. B- Guia de crescimento de náilon. Observar orifício central através do qual era conduzida a fixação óssea mediante introdução de parafuso cortical.

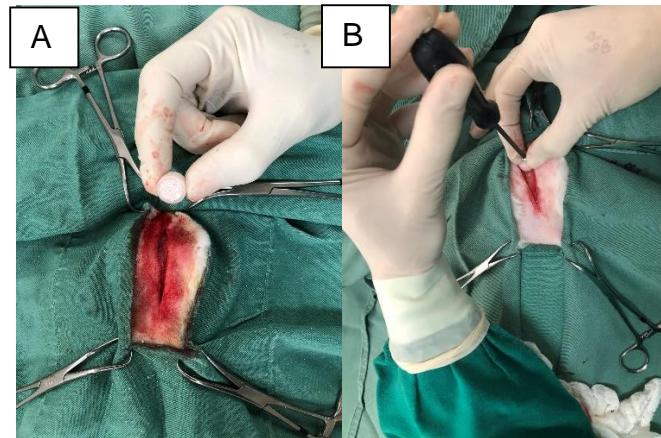


Fonte: Grupo de Pesquisa em biomateriais da UDESC/CCT- Joinville.

Para a fixação das guias preenchidas com os biomateriais (Figura 11- A) foram realizadas perfurações corticais com broca ortopédica de 1.5mm acoplada a uma guia de broca, seguidas de rosqueamento cortical com um rosqueador de mesmo diâmetro. Após este procedimento e aferição da espessura cortical com

um medidor de profundidade, foram introduzidos parafusos corticais sextavados não bloqueados de 10mm a 15mm de comprimento, fixando a guia a cortical óssea com auxílio de uma chave hexagonal (Figura 11- B). As câmpanulas foram dispostas em linha devido ao reduzido tamanho das calvárias dos animais.

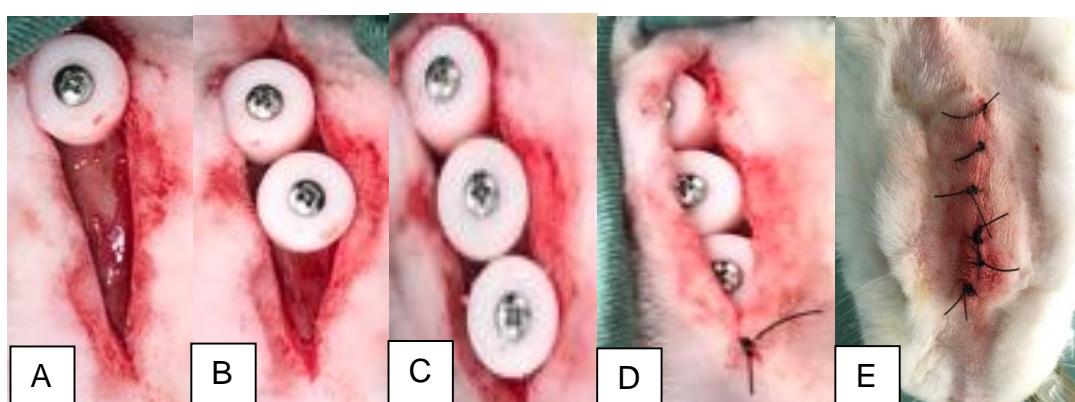
Figura 11: A- Campânula preenchida por biomaterial, para o implante na superfície óssea já preparada; B- Fixação da campânula com parafuso.



Fonte: Autor

A sequência de fotos da figura 12 demonstra a sequência de posicionamento dos dispositivos de náilon contendo os diferentes biomateriais nas calvárias dos coelhos. A dermorrafia foi realizada com fio mononáilon monofilamentar nº3-0, com pontos de aposição.

Figura 12: Sequência de campânulas fixadas contendo diferentes biomateriais, pela ordem de rostral para caudal, hidroxiapatita, bioss®, bonefill® (A, B, C); aspecto de três campânulas fixadas e início da aproximação cutânea (D) e dermorrafia concluída com fio mononáilon 2.0 (E).

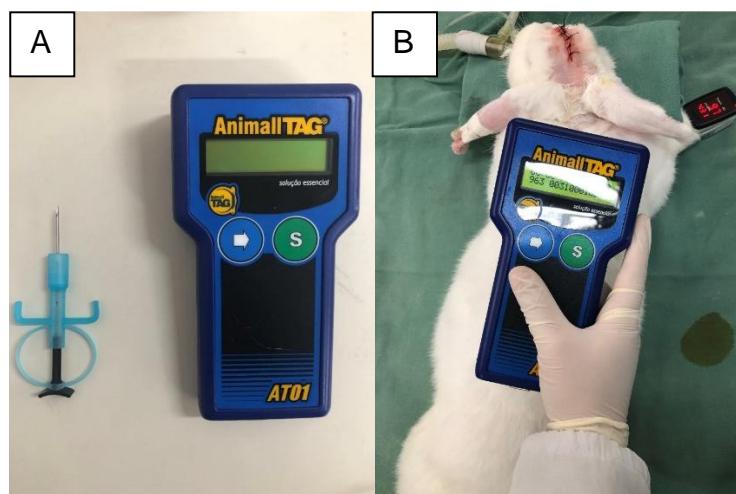


Fonte: Autor

4- 4- 5 Pós-operatório

Ao término dos procedimentos cirúrgicos os animais foram identificados através de microchipagem (Figura 13).

Figura 13: (A) Dispositivo empregado para microchipagem; (B) Conferência do procedimento no pós-operatório imediato.



Fonte: Autor

A analgesia dos animais foi realizada no pós-operatório imediato, com opioide cloridrato de tramadol, (laboratório Cristália, São Paulo – Brasil) na dose de 6mg/kg por via subcutânea, TID) apenas no primeiro dia de pós operatório, anti-inflamatórios não esteroidais, meloxicam 0,2% (Maxican®, Ouro Fino, Cravinhos/SP, Brasil) associado a dipirona sódica (D-500, Zoetis, Campinas/SP, Brasil) na dose de 25 mg/Kg, duas vezes ao dia, respectivamente, todos pela via subcutânea, além do uso de antibioticoterapia enrofloxacino 2,5% (Chemitril® 2,5%, Chemitec, São Paulo/SP, Brasil) na dose de 5 mg/Kg, duas vezes ao dia por via intramuscular, nos três dias subsequentes.

Os animais foram submetidos a avaliações clínicas periódicas (duas vezes ao dia nos primeiros 10 dias e após, uma vez ao dia), observando a presença de sinais locais ou sistêmicos de infecção ou outras alterações, que uma vez detectados pudessem comprometer a evolução do experimento, fossem registradas e os animais, caso necessário, descartados. Quanto à ferida cirúrgica, esta foi examinada diariamente nos primeiros 10 dias de pós-operatório, sendo realizada a limpeza duas vezes ao dia, com solução NaCl 0,9% estéril. As suturas foram removidas após 10 dias de cirurgia.

4- 4 Preparo das amostras

Após 60 e 90 dias da intervenção os animais foram submetidos à eutanásia, para coleta e avaliação das calvárias. Para tanto administrou-se como medicação pré-anestésica a associação de cetamina 10% (Cetamin®, Syntec, Santana de Panaíba/SP, Brasil) 20mg/Kg via intramuscular e midazolam 0,5% 2mg/Kg, por via intramuscular, (Laboratório Cristália, São Paulo Brasil) seguida por indução anestésica com propofol 1% (5m/Kg), por via intravenosa(Laboratório Cristália, São Paulo, Brasil) Na sequência os animais receberam 10ml de solução de cloreto de potássio 19,1% (Laboratório Santec, Lagoinha, Ribeirão Preto) por via intravenosa, até que ocorresse parada cardiorrespiratória confirmada por auscultação.

Para obtenção das amostras, o acesso foi conduzido de forma análoga a descrita para o procedimento cirúrgico. Após incisão de pele no mesmo local da cirurgia e rebatimento dos tecidos moles, seccionou-se as calvárias com emprego de uma serra oscilatória, realizando-se assim a retirada da porção de tecido ósseo contendo as guias de náilon com os diferentes biomateriais implantados (Figura 14). O material coletado foi fixado em solução de formaldeído a 10% e armazenado em frascos individuais devidamente identificados, por 7dias.

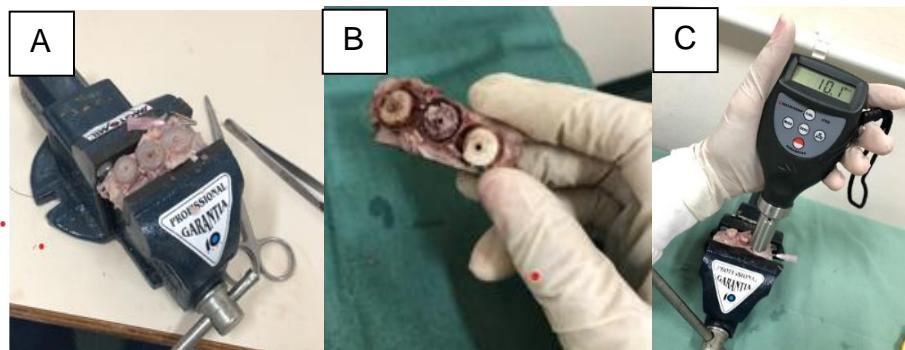
Figura 14: Aspecto da amostra contendo as campânulas imediatamente após a coleta.
Observar tecido cicatricial envolvendo os dispositivos.



Fonte: Autor

Após esse período, procedeu-se a remoção dos tecidos moles adjacentes (Figura 15- A) e das guias de náilon. Com as amostras contendo somente o crescimento ósseo obtido no interior das três campânulas (Figura 15- B), quando então foi efetuado o teste de dureza (Figura 15- C).

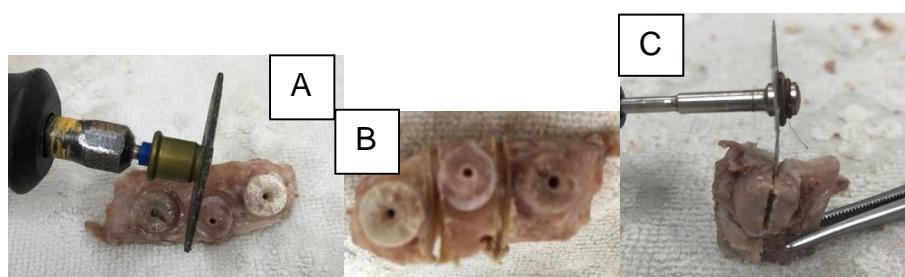
Figura 15: A- Amostra fixada para remoção de parafusos e tecidos moles adjacentes. Figura: B- Aspecto da amostra após a remoção das campânulas; C- Amostra fixada para aferição de dureza.



Fonte: Autor

Posteriormente seccionou-se os fragmentos ósseos (calvárias) em três partes correspondentes a cada biomaterial, com o auxílio de um disco diamantado acoplado a um motor elétrico (Figuras 16- A e B), Cada crescimento guiado foi novamente fragmentado em duas partes (Figura 16- C), uma para ser destinada para análises histológica e histomorfométrica e outra para microscopia de varredura, que foram armazenadas em frascos individuais com formaldeído tamponado a 10% por mais 7 dias.

Figura 16: A- Secção da amostra com disco diamantado acoplado a motor elétrico; B- Pontos de secção para a separação dos crescimentos ósseos guiados com os diferentes biomateriais; C- Secção de um crescimento guiado para encaminhamento para estudos histológicos, histomorfométricos e de MEV.



Fonte: Autor

4- 5- 1 Avaliação histológica

Esta avaliação foi conduzida junto ao LABOPAVE (Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Catarina), UFSC, em Curitibanos, SC. As leituras em microscópio óptico foram realizadas por um

especialista sem o conhecimento do tratamento empregado nas amostras, para a observação da celularidade.

Os fragmentos ósseos coletados ao longo do experimento, de acordo com cada grupo, aos 60 e 90 dias de pós-operatório, foram mantidos em solução de formaldeído tamponado a 10% por 15 dias, para realização da avaliação histológica, sendo identificados conforme o grupo.

Para o processamento das amostras empregou-se o método padrão, após a descalcificação com ácido nítrico a 10%, para posterior histotécnica, quando foram desidratadas em álcool, diafanizadas em xanol e posteriormente colocadas em placas de parafina. As amostras parafinadas foram cortadas com micrótomo, em cortes variando entre 4-5 μ m de espessura e após fixadas em lâminas de microscopia, que foram coradas com hematoxilina de Harris e eosina.

O critério de avaliação, adaptado de Valiati *et al.* (2012), foi baseado em atribuição da quantidade dos tipos celulares encontrados em cruzes, como demonstrado no quadro 7. Avaliou-se neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoblastos (PO), biomaterial remanescente (BR), presença de formação de tecido mieloide (FTM), presença de neoformação de tecido ósseo (NTO), proporção de osso primário (OP) e neoformação vascular (NFV). Foi associado a ausência do parâmetro a marcação com nenhuma cruz, uma cruz para pouca quantidade, duas cruzes para quantidade moderada, três cruzes para quantidade acentuada.

Quadro 7: Modelo de critérios de avaliação histológica baseado em atribuição de cruzes para a quantificação de biomaterial remanescente (BR), neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), osso primário (OP), presença de osteoblastos (POT), formação de tecido mieloide (FTM), presença de macrófagos (MA) e neoformação vascular (NFV).

	BR	NTO	DFC	OP	POT	FTM	MA	NFV
Ausência	-	-	-	-	-	-	-	-
Leve	+	+	+	+	+	+	+	+
Moderada	++	++	++	++	++	++	++	++
Acentuada	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Fonte: Adaptado de Valiati *et al.* (2012).

4- 5- 2 Histomorfometria

Após o corte das amostras já processadas para a histologia óptica, os blocos remanescentes foram seccionados através de um micrômetro na espessura de 3 μ m, depositados em lâminas e corados com Picosirius. Para a realização das avaliações obteve-se imagens fotográficas de cinco campos diferentes da amostra, todas no mesmo aumento de 10X, utilizando-se um microscópio óptico (Leica, modelo DM 500) com uma câmera fotográfica acoplada (Leica ICC 50HD), conectada a um computador por meio de um cabo USB. A captura das imagens foi realizada por meio de um software específico (Leica Application Suite, versão 3.0.0, 2013). Assim como na avaliação histológica, o avaliador foi cego aos tratamentos e períodos de evolução.

Após a obtenção das imagens, importou-se as mesmas para o software (Image J 1.50i), o qual foi utilizado para calibrar os tons das cores dos quesitos a serem avaliados, sendo padrão vermelho para o tecido conjuntivo ou tecido ósseo imaturo e verde para o tecido ósseo. Ao final da calibragem, o programa analisou a função chamada "Macro", estabelecendo valores em pixels para as áreas averiguadas, criando uma tabela. Por sua vez, para o software de obtenção das imagens foi estabelecido um aumento de 10X como o selecionado para as imagens desse estudo, uma vez que cada pixel corresponde a 0,64 microns e a área de cada imagem, equivalerá ao mesmo aumento de 2048 X 1536 microns.

Foram aferidas a área de superfície óssea recém-formada e a área ocupada pelo biomaterial das amostras sob ampliação de 20x, estabelecendo uma relação entre o volume ósseo e volume tecidual total (VO/VT) e a relação entre o biomaterial remanescente e o volume tecidual total (VB/VT).

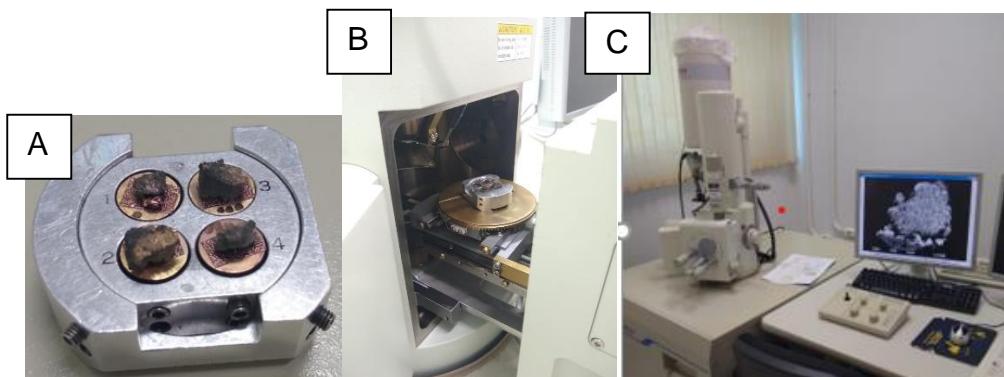
4- 5- 3 Avaliação através de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras foram fixadas em solução de formaldeído 10 %, lavadas em solução de cacodilato de sódio 0,1M (3x, 20 min cada banho), desidratadas em álcool etílico (60, 70, 80, 90 e 100%, 20 min cada banho) e secas em ponto crítico (EM CPD 030, Leica, Alemanha). Após, foram fixadas em stubs (Figuras 17- A e

B) seguido de deposição por sputtering com ouro (EM SCD 500, Leica, Alemanha). A análise morfológica foi avaliada através de micrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura (Figura 17-C) (JSM-6390LV, Jeol, Japão).

Por meio da MEV (de fratura) as amostras foram submetidas a análise descritiva morfológica a partir do método visual da interface entre o biomaterial que havia sido implantado e a calvária, a superfície receptora. Foi analisado ainda, o biomaterial remanescente e as linhagens de células osteogênicas na região implantada. As leituras foram realizadas por um especialista sem o conhecimento do tratamento empregado nas amostras.

Figura 17: A e B- Amostras fixadas em stubs; C- A análise morfológica através de micrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura.



Fonte: Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

4- 6 Análise estatística

4- 6- 1 Teste de dureza

As preposições de normalidade e independência dos resíduos, assim como a homogeneidade das variâncias foram previamente testados. Após, foi realizada análise de variância satisfazendo o seguinte modelo estatístico: $y_{ijk} = \mu + \text{biomaterial}_i + \text{PRP}_j + \text{biomaterial} \times \text{PRP}_{ij} + \epsilon_{ijk}$, no qual y_{ijk} : variável analisada (Dureza, em unidade Shore); μ : média geral de todas n observações; biomaterial_i : biomateriais utilizados (hidroxiapatita, bio-oss® e bonefill®); PRP_j : presença ou ausência de PRP; $\text{biomaterial} \times \text{PRP}_{ij}$: interação entre biomaterial e presenta ou ausência de PRP e ϵ_{ijk} : erro experimental ($N \sim (0, \sigma^2)$). Caso observado diferença estatística, os tratamentos foram comparados por meio do

teste de Tukey. Foi utilizado o nível de significância de 5%. Para isso, foi utilizado o programa estatístico R Studio.

4- 6- 2 Análise histológica

Para as variáveis neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoblastos (PO), presença de formação de tecido mieloide (FTM), proporção de osso primário (OP), presença de macrófagos (MA) e neoformação vascular (NFV) os dados obtidos foram transformados em uma escala numérica na qual atribuiu-se para nenhuma cruz zero (- = 0); uma cruz um (+ = 1); duas cruzes dois (++ = 2) e três cruzes três (+++ = 3). Após, os dados foram analisados por meio do teste estatístico de Kruskal-Wallis. Foi considerado um nível de significância de 5% e, quando rejeitada a hipótese nula, os tratamentos foram comparados pelo teste de comparação de mediana de Dunn (DUNN, 1964). Já para a variável biomaterial remanescente (BR) os resultados foram analisados pelo teste exato de Fisher ($\alpha=5\%$). Para isso, foi utilizado o programa estatístico R Studio.

4- 6- 3 Análise histomorfométrica

As preposições de normalidade e independência dos resíduos, assim como a homogeneidade das variâncias foram previamente testados. Inicialmente as pressuposições não foram atendidas e com isso foi realizado a transformação de box-cox (SAKIA, 1992). Após, foi realizada análise de variância satisfazendo o seguinte modelo estatístico: $y_{ijk} = \mu + Biomaterial_i + PRP_j + Biomaterial \times PRP_{ij} + \varepsilon_{ijk}$, no qual y_{ijk} : variáveis analisadas (Área (μm) e Percentagem); μ : média geral de todas n observações; Biomaterial_i: Biomateriais utilizados (hidroxiapatita, bio-oss® e bonefill®); PRP_j: presença ou ausência de PRP; Biomaterial \times PRP_{ij}: interação entre biomaterial e presente ou ausência de PRP e ε_{ijk} : erro experimental ($N \sim (0, \sigma^2)$). Caso observado diferença estatística, os tratamentos foram comparados por meio do teste de Tukey. Foi utilizado o nível de significância de 5%. Para isso, foi utilizado o programa estatístico R Studio.

5- RESULTADOS

5-1 Plasma rico em plaquetas

Os resultados obtidos após o processamento do sangue são apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Dados obtidos das contagens de plaquetas basais e do plasma rico em plaquetas de cada unidade experimental.

Identificação da unidade experimental	Hemocitômetro		Automatizada		Lâmina	
	Plaquetas basal ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	PRP ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Plaquetas basal ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	PRP ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Plaquetas basal ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	PRP ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
C1-9P	300	424	167	237	270	580
C2-9P	290	972	279	855	274	850
C3-9P	419	869	453	708	360	802
C4-9P	419	997	325	639	289	846
C5-9P	406	1170	384	1960	360	978
C1-6P	215	742	291	555	236	645
C2-6P	360	596	50*	60*	114	552
C3-6P	387	681	361	569	349	522
C4-6P	267	697	242	703	226	787
C5-6P	316	642	341	491	291	516

*Presença de agregados plaquetários na amostra visualizados na lâmina. Legenda: **C**- coelho; **P**- tratamento com PRP; **9**- coleta de amostras com 90 dias de tratamento; **6**- coleta de amostras com 60 dias de tratamento. Fonte: Autor

De posse dos resultados foram quantificados os aumentos obtidos nas contagens plaquetárias mediante a utilização dos três diferentes métodos, quais sejam hemocitômetro, automatizado e por lâmina, por unidade experimental, como demonstra o quadro 8. Esses incrementos foram calculados através da divisão do número de plaquetas encontrado após o enriquecimento do plasma pelo número da contagem basal de plaquetas, resultando no aumento em vezes, observado com o emprego dos três diferentes métodos.

Quadro 8 – Incrementos obtidos nas contagens de plaquetas (em vezes) através dos diferentes métodos (hemocitômetro, automatizado, lâmina) em relação a contagem basal de cada unidade experimental.

INCREMENTOS* OBTIDOS NAS CONTAGENS PLAQUETÁRIAS ATRAVÉS DOS DIFERENTES MÉTODOS			
Identificação da unidade experimental	Hemocitômetro	Automatizada	Lâmina
C1-9P	1,41	1,41	2,14
C2-9P	3,35	3,06	3,10
C3-9P	2,07	1,96	2,22
C4-9P	2,37	1,96	2,92
C5-9P	2,88	5,10	2,71
C1-6P	3,45	1,90	2,73
C2-6P	1,65	1,20	4,84
C3-6P	1,75	1,57	1,49
C4-6P	2,61	3,07	3,48
C5-6P	2,03	1,43	1,77
Médias	2,36	2,26	2,74
Média de incremento			2,45

*aumentos em vezes. Fonte: Autor

5- 2 Procedimentos anestésicos

A técnica anestésica empregada, bem como o protocolo pós-operatório instituído envolvendo terapia analgésica, anti-inflamatória, além de profilaxia antimicrobiana mostraram-se efetivos para que o procedimento cirúrgico se desse sem intercorrências, proporcionando uma adequada recuperação dos pacientes. Os animais não apresentaram nenhuma alteração de comportamento e alimentaram-se normalmente.

5- 3 Procedimentos cirúrgicos

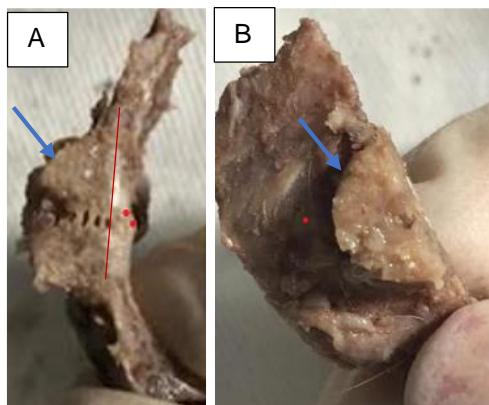
A técnica operatória conduzida possibilitou a realização dos diferentes tratamentos deste estudo. O processo cicatricial ocorreu sem complicações.

5- 4 Crescimento ósseo guiado – avaliação macroscópica

O modelo de crescimento ósseo estabelecido com o uso de dispositivo de náilon (campânula) fixado junto as calvárias livres de periósteo propiciou adequada aposição dos diferentes biomateriais (Figura 18) ao leito ósseo permitindo neovascularização, infiltração e crescimento celular. Não foram

observadas reações sugestivas de incompatibilidade as campânulas ou aos biomateriais.

Figura 18: Imagem de amostra preparada para processamento histológico em vista longitudinal (A) e transversal (B). Observar: seta azul apontando o biomaterial, linha vermelha mostrando a integração do biomaterial junto ao leito ósseo. Fonte: Autor



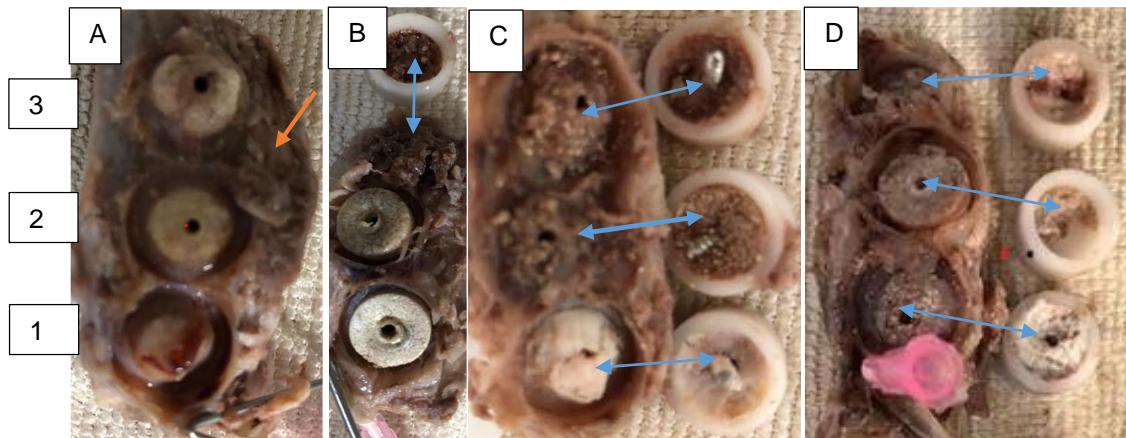
Fonte: Autor

Em algumas amostras foram observados os seguintes eventos:

- amostra C1-6P: presença de tecido com aparência de fibroso circundando o crescimento referente a campânula 3 (bonefill®) (Figura 19- A);
- amostra C3-6: parte do biomaterial permaneceu no interior da câmpanula 3 (bonefill®) (Figura 19- B);
- C3-6P: parte dos biomateriais permaneceram no interior das três câmpanulas (Figura 19 -C);
- C5-6P: parte dos biomateriais permaneceram no interior das três câmpanulas (Figura 19 -D).

Embora os modelos experimentais escolhidos tinhham as mesmas condições clínicas os eventos ocorridos podem dever-se a condições específicas. É sabido também que os materiais sintéticos causam menos reações de incompatibilidade do que os de origem bovina.

Figura 19: Aspecto macroscópico de amostras coletadas aos 60 dias de evolução. A- Unidade experimental C1-6P. Notar presença de tecido com aparência de fibroso circundando o crescimento (seta laranja); B- Unidade experimental C3-6. Notar que parte do biomaterial permaneceu no interior da câmpanula 3 bonefill (Seta azul); C- Unidade experimental C3-6P. Notar que parte dos biomateriais permaneceram no interior das três câmpanulas (setas azuis, campânula 1, hidroxiapatita; campânula 2, bio-oss®; campânula 3, bonefill®) D- Unidade experimental C5-6P. Notar que parte dos biomateriais permaneceram no interior das três câmpanulas, (setas azuis campânula 1, hidroxiapatita; campânula 2, bio-oss®; campânula 3, bonefill®).



Fonte: Autor

5- 5 Avaliação de dureza

Para mensuração da dureza de cada amostra utilizou-se um durômetro, sendo que foram feitas três aferições para obtenção da média aritmética, como revelam os quadros abaixo, sendo os quadros 9 e 10 referentes aos grupos de 60 dias de avaliação, sem e com PRP, respectivamente.

Quadro 9: Resultados obtidos na avaliação de dureza das amostras do grupo 60 dias de avaliação, sem PRP.

Unidade experimental	C1-6	C2-6	C3-6	C4-6	C5-6
Biomaterial	Médias				
HA	6,4	6,2	7,0	8,2	7,6
BIOSS	10,8	10,3	11,2	9,8	10,9
BONEFILL	11,2	11,2	11,4	10,2	10,3

Fonte: Autor

Quadro 10: Resultados obtidos na avaliação de dureza das amostras do grupo 60 dias de avaliação, com PRP.

Unidade experimental	C1-6P	C2- 6P	C3-6P	C4-6P	C5-6P
Biomaterial	Médias				
HA	6,6	6,7	7,0	7,4	7,3
BIOSS	8,3	7,7	8,2	8,5	8,2
BONEFILL	8,1	_	8,4	8,8	8,4

Fonte: Autor

Já os quadros 11 e 12 dizem respeito aos grupos de 90 dias de avaliação, sem e com PRP, respectivamente.

Quadro 11: Resultados obtidos na avaliação de dureza das amostras do grupo 90 dias de avaliação, sem PRP.

Unidade experimental	C1- 9	C2-9	C3-9	C4-9	C5-9
Biomaterial	Médias				
HA	11,2	12,8	10,6	14,1	11,3
BIOSS	12,6	11,8	7,1	8,7	13,0
BONEFILL	10,9	13,7	10,6	12,2	10,6

Fonte: Autor

Quadro 12: Resultados obtidos na avaliação de dureza das amostras do grupo 90 dias de avaliação, com PRP.

Unidade experimental	C1-9 P	C2-9P	C3-9P	C4-9P	C5-9P
Biomaterial	Médias				
HA	10,7	13,7	12,8	12,9	10,9
BIOSS	12,9	13,5	9,5	11,8	13,1
BONEFILL	9,4	6,3	10,8	12,0	13,6

Fonte: Autor

Para favorecer a comparação das durezas das amostras dos grupos 60 e 90 dias de acompanhamento clínico os resultados obtidos na avaliação de dureza estão apresentados no quadro 13.

Quadro 13: Resultados comparativos obtidos na avaliação de dureza das amostras dos grupos 60 dias de avaliação, com e sem PRP.

AMOSTRA	C1-6	C1-6P	C1-9	C1-9P
BIOMATERIAL	Médias			
HA	6,4	6,6	11,2	10,7
BIOSS	10,8	8,3	12,6	12,9
BONEFILL	11,2	8,1	10,9	9,4
AMOSTRA	C2-6	C2-6P	C2-9	C2-9P
BIOMATERIAL	Médias			
HA	6,2	6,7	12,8	13,7
BIOSS	10,3	7,7	11,8	13,5
BONEFILL	11,2	—	13,7	6,3
AMOSTRA	C3-6	C3-6P	C3-9	C3-9P
BIOMATERIAL	Médias			
HA	7,0	7,0	10,6	12,8
BIOSS	11,2	8,2	7,1	9,5
BONEFILL	11,4	8,4	10,6	10,8
AMOSTRA	C4-6	C4-6P	C4-9	C4-9P
BIOMATERIAL	Médias			
HA	8,2	7,4	14,1	12,9
BIOSS	9,8	8,5	8,7	11,8
BONEFILL	10,2	8,8	12,2	12,0
AMOSTRA	C5-6	C5-6P	C5-9	C5-9P
BIOMATERIAL	Médias			
HA	7,6	7,3	11,3	10,9
BIOSS	10,9	8,2	13,0	13,1
BONEFILL	10,3	8,4	10,6	13,6

Fonte: Autor

5- 6 Análise histológica

O critério de avaliação, adaptado de Valiati *et al.* (2012), foi baseado em atribuição da quantidade dos tipos celulares encontrados em cruzes. Avaliou-se

o biomaterial remanescente (BR), a neoformação de tecido ósseo (NTO), a deposição de fibras colágenas (DFC), a presença de osteoblastos (PO), a presença de formação de tecido mieloide (FTM), a proporção de osso primário (OP), a presença de macrófagos (MA) e a neoformação vascular (NFV). Foi associado a ausência do parâmetro a marcação com nenhuma cruz, uma cruz para pouca quantidade, duas cruzes para quantidade moderada, três cruzes para quantidade acentuada. Para melhor ajustar os dados obtidos com a análise estatística atribuiu-se para nenhuma cruz zero (- = 0); uma cruz um (+ = 1); duas cruzes dois (++ = 2) e três cruzes três (+++ = 3).

Os quadros 14 e 15 apresentam as médias dos resultados obtidos na avaliação histológica dos grupos 60 e 90 dias de pós-operatório, respectivamente.

Quadro 14: Médias dos resultados da avaliação histológica das amostras obtidas de pacientes dos grupos 60 dias de avaliação pós-operatória.

TRATAMENTOS – 60 dias						
variável	HA	HA PRP	BONEFIL	BONEFIL PRP	BIOSS	BIOSS PRP
BR	SIM	SIM	NÃO	SIM	VARIÁVEL	SIM
NTO	1,3	1,25	1,3	1,25	1,25	1,25
DFC	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
PO	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
FTM	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3
OP	1	1	3	2	2	1
MA	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
NFV	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1

Fonte: LABOPAVE (Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Catarina), UFSC, Curitibanos, SC.

Quadro 15: Médias dos resultados da avaliação histológica das amostras obtidas de pacientes dos grupos 90 dias de avaliação pós-operatória.

TRATAMENTOS – 90 dias						
variável	HA	HA PRP	BONEFIL	BONEFIL PRP	BIOSS	BIOSS PRP
BR	SIM	SIM	VARIÁVEL	SIM	SIM	NÃO
NTO	2,5	2,5	2,6	2,5	2,5	2,5
DFC	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
PO	1,5	1,5	1,4	1,5	1,5	1,5
FTM	1,2	1,2	1,3	1,2	1,2	1,2
OP	1	1	1	1	2	2
MA	0,4	0,4	0,3	0,4	0,4	0,4
NFV	1,1	1,1	1,2	1,2	1,2	1,2

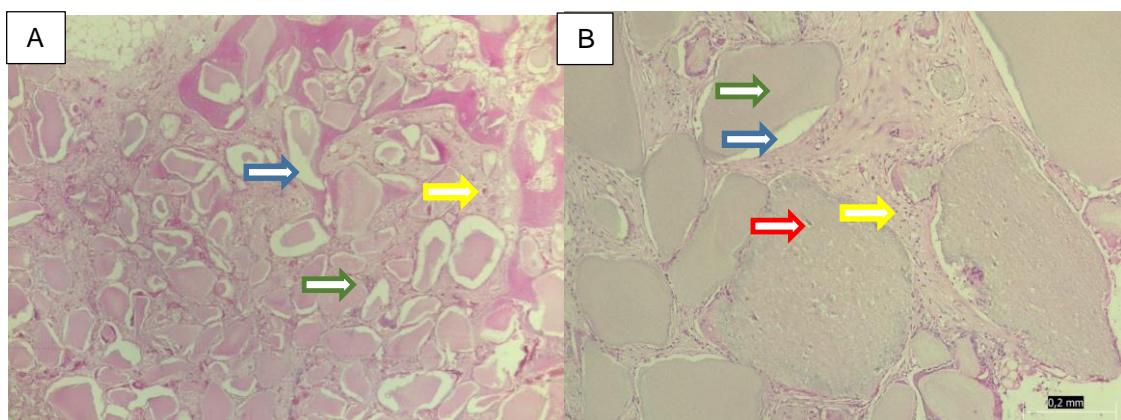
Fonte: LABOPAVE (Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Catarina), UFSC, Curitibanos, SC.

Para ilustrar os achados histológicos as figuras a seguir referem-se aos achados encontrados aos 60 e 90 dias de avaliação para os diferentes tratamentos, conforme elucida o quadro 16.

Quadro 16: Numeração da sequência de figuras ilustrando os resultados histológicos conforme os tratamentos que representam.

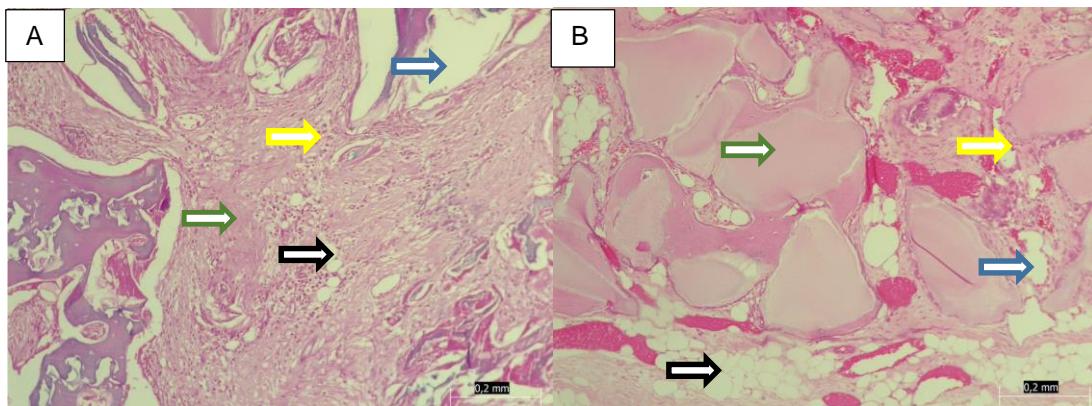
Tratamento	Figura	60 dias	90 dias
HA	20	A	B
HA PRP	21	A	B
bioss®	22	A	B
bioss® PRP	23	A	B
bonefill®	24	A	B
bonefill® PRP	25	A	B

Figura 20: Imagem histológica com coloração de hematoxilina/ eosina (HE) de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias (A) e 90 dias (B) com tratamento com HA sem PRP. Observar: biomaterial remanescente (setas azuis); matriz óssea (setas verdes); osteoblastos (setas amarelas); osteócitos (setas vermelhas). Aumento 10 e 40X.



Fonte: LABOPAVE (Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Catarina), UFSC, Curitibanos, SC.

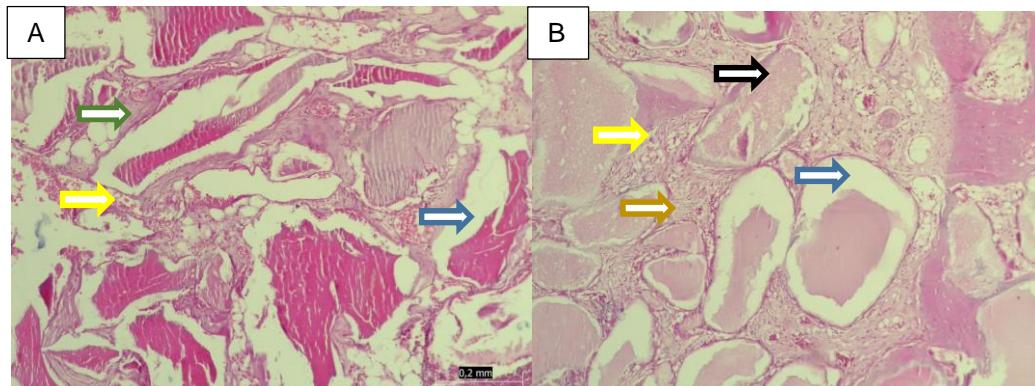
Figura 21: Imagem histológica com coloração de hematoxilina/ eosina (HE) de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias (A) e 90 dias (B) com tratamento envolvendo HA acrescida de PRP. Observar biomaterial remanescente (setas azuis); matriz óssea (setas verdes); osteoblastos (setas amarelas); adipócitos (setas pretas). Aumento 40X.



Fonte: LABOPAVE (Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Catarina), UFSC, Curitibanos, SC.

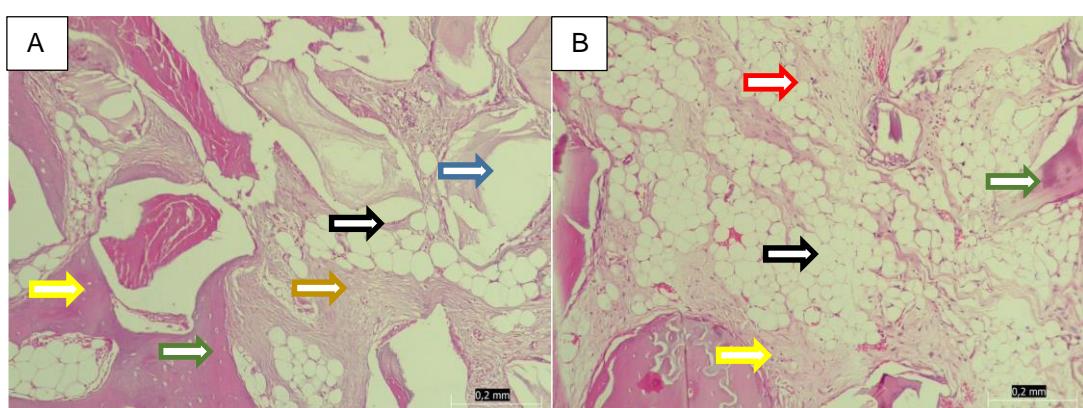
A presença de células da linhagem óssea foi mais preponderante no tratamento sem PRP aos 90 dias. A presença de adipócitos foi marcante no tratamento com PRP no período de 90 dias.

Figura 22: Imagem histológica com coloração de hematoxilina/ eosina (HE) de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias (A) e 90 dias (B) com tratamento com bio-oss® sem PRP. Observar: biomaterial remanescente (setas azuis); matriz óssea (setas verdes); osteoblastos (setas amarelas), Aumento 40 e 10X.



Fonte: LABOPAVE (Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Catarina), UFSC, Curitibanos, SC.

Figura 23: Imagem histológica com coloração de hematoxilina/ eosina (HE) de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias (A) e 90 dias (B) com tratamento envolvendo bio-oss® acrescido de PRP. Observar: biomaterial remanescente (setas azuis); tecido conjuntivo (setas marrom); matriz óssea (setas verdes); osteoblastos (setas amarelas); osteócitos (setas vermelhas); adipócitos (setas pretas). Aumento 40X.

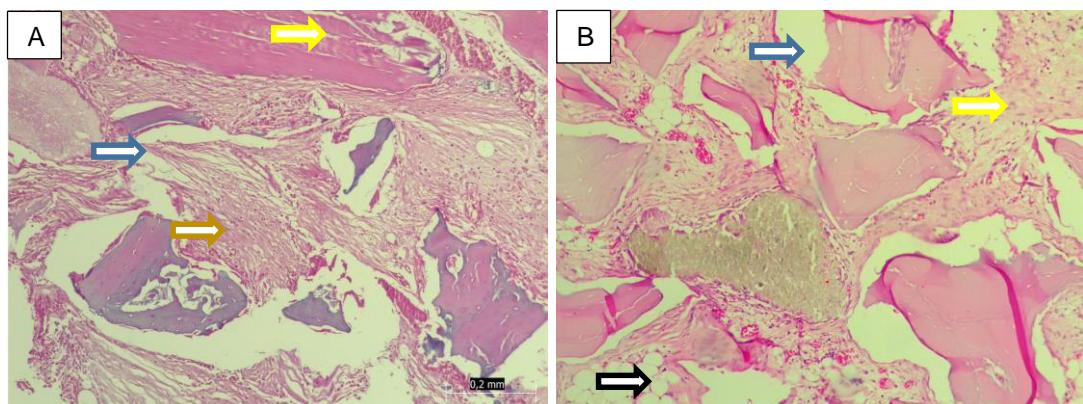


Fonte: LABOPAVE (Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Catarina), UFSC, Curitibanos, SC.

Nos resultados dos estudos obtidos acerca do biomaterial bio-oss®, no que se refere a presença de biomaterial remanescente, não foi observado no tratamento de 90 dias sem PRP.

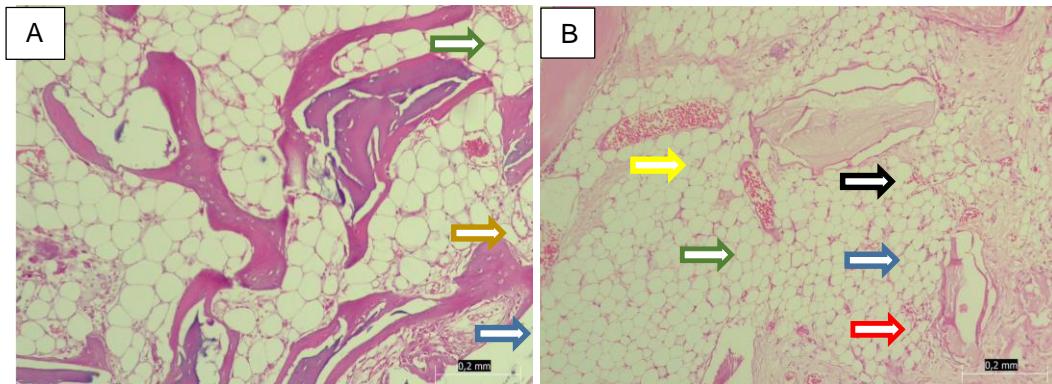
Ainda sobre o tratamento com bio-oss® acrescido por PRP, foi marcante a presença de adipócitos tanto aos 60 como aos 90 dias de evolução.

Figura 24: Imagem histológica com coloração de hematoxilina/ eosina (HE) de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias (A) e 90 dias (B) com tratamento com bonefill® sem PRP. Observar: biomaterial remanescente (setas azuis); tecido conjuntivo (setas marrom); osteoblastos (setas amarelas); adipócitos (setas pretas). Aumento 40X.



Fonte: LABOPAVE (Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Catarina), UFSC, Curitibanos, SC.

Figura 25: Imagem histológica com coloração de hematoxilina/ eosina (HE) de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias (A) e 90 dias (B) com tratamento envolvendo bonefill® acrescido de PRP. Observar: biomaterial remanescente (setas azuis); tecido conjuntivo (setas marrom); matriz óssea (setas verdes); osteoblastos (setas amarelas); adipócitos (setas pretas). Aumento 40X.



Fonte: LABOPAVE (Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Catarina), UFSC, Curitibanos, SC.

Em relação aos resultados dos tratamentos com bonefill®, aos 90 dias a presença de biomaterial remanescente foi menor no tratamento com PRP. Em comparação aos tratamentos com HA e bio-oss® a presença de osteoblastos e osteócitos foi menos evidente com o bonefill® tanto com como sem o PRP.

A semelhança dos achados nos tratamentos com HA e bio-oss®, no tratamento com o biomaterial bonefill® acrescido por PRP, foi marcante a presença de adipócitos nos dois períodos avaliados.

5- 7 Análise histomorfométrica

Foram aferidas a área e o porcentual de osso imaturo e/ ou tecido conjuntivo (variável tipo I – colágeno tipo I) e de osso maduro (variável tipo III – colágeno tipo III) das amostras sob ampliação de 20x.

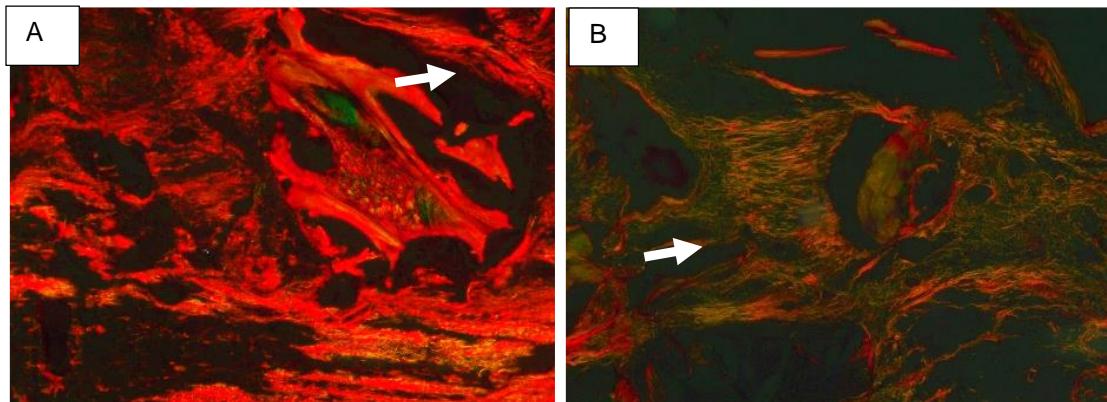
De forma análoga a que foram apresentadas as imagens dos resultados histológicos, as imagens obtidas com a coloração Picrosírus para os diferentes tratamentos são apresentadas conforme explica o quadro 17.

Quadro 17: Numeração da sequência de figuras ilustrando os resultados com a coloração Picosirius conforme os tratamentos que representam.

Tratamento	Figura	60 dias	90 dias
HA	26	A	B
HA PRP	27	A	B
bio-oss®	28	A	B
bio-oss® PRP	29	A	B
bonefill®	30	A	B
bonefill® PRP	31	A	B

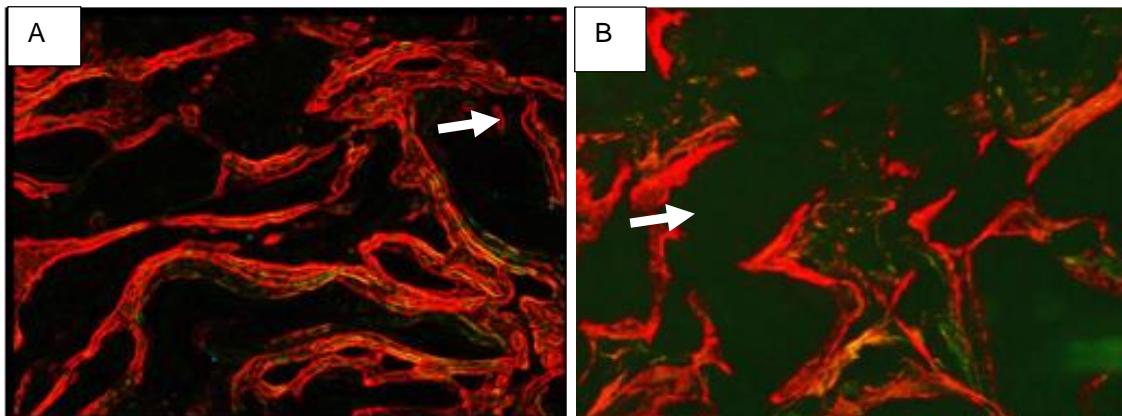
Fonte: Autor

Figura 26: Imagem obtida com coloração Picosirius de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias (A) e 90 dias (B) com tratamento com HA sem PRP. Onde: setas brancas - biomaterial remanescente (BR). Observar a presença de fibras colágenas organizadas em lamelas paralelas umas às outras e sua disposição em camadas concêntricas formando o sistema de Havers. Notar a presença de tecido ósseo imaturo e/ ou tecido conjuntivo em coloração vermelha e tecido ósseo em coloração verde. Aumento 40X



Fonte: LABOPAVE (Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Catarina), UFSC, Curitibanos, SC.

Figura 27: Imagem obtida com coloração Picosirius de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias (A) e 90 dias (B) com tratamento com HA acrescida por PRP. Onde: setas brancas - biomaterial remanescente (BR). Notar a presença de tecido ósseo imaturo e/ ou tecido conjuntivo em coloração vermelha e tecido ósseo em coloração verde. Aumento 40X

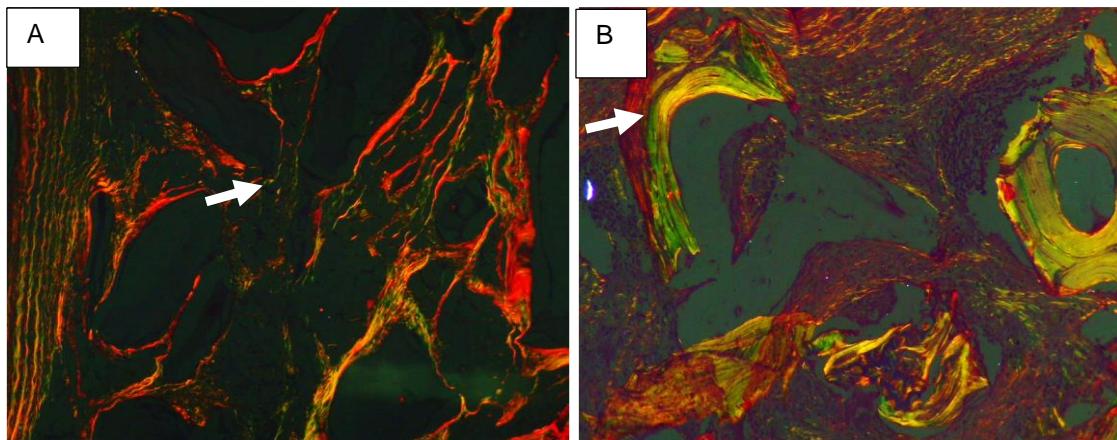


Fonte: LABOPAVE (Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Catarina), UFSC, Curitibanos, SC.

É possível observar comparativamente entre as imagens apresentadas anteriormente com os tratamentos HA sem e com PRP aos 60 e 90 dias, que nas imagens aos 60 dias, o tratamento sem PRP evidenciou presença marcante de tecido conjuntivo e/ ou ósseo imaturo (coloração vermelha).

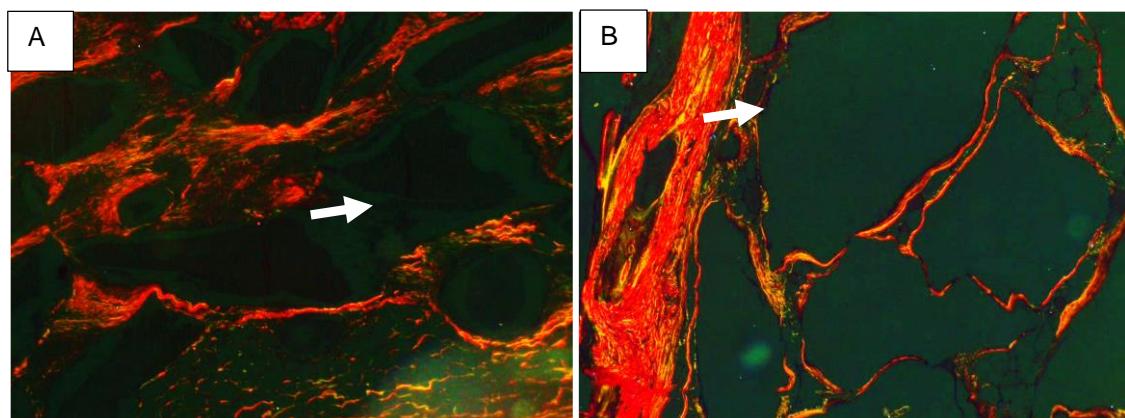
Já para as imagens de 90 dias, o grupo sem PRP evidenciou maior crescimento ósseo (verde).

Figura 28: Imagem obtida com coloração Picosirius de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias (A) e 90 dias (B) com tratamento com bio-oss® sem PRP. Onde: setas brancas - biomaterial remanescente (BR). Notar a presença de tecido ósseo imaturo e/ ou tecido conjuntivo em coloração vermelha e tecido ósseo em coloração verde. Aumento 40X



Fonte: LABOPAVE (Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Catarina), UFSC, Curitibanos, SC.

Figura 29: Imagem obtida com coloração Picosirius de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias (A) e 90 dias (B) com tratamento com bio-oss® acrescido por PRP. Onde: setas brancas - biomaterial remanescente (BR). Notar a presença de tecido ósseo imaturo e/ ou tecido conjuntivo em coloração vermelha e escasso tecido ósseo em coloração verde. Aumento 40X

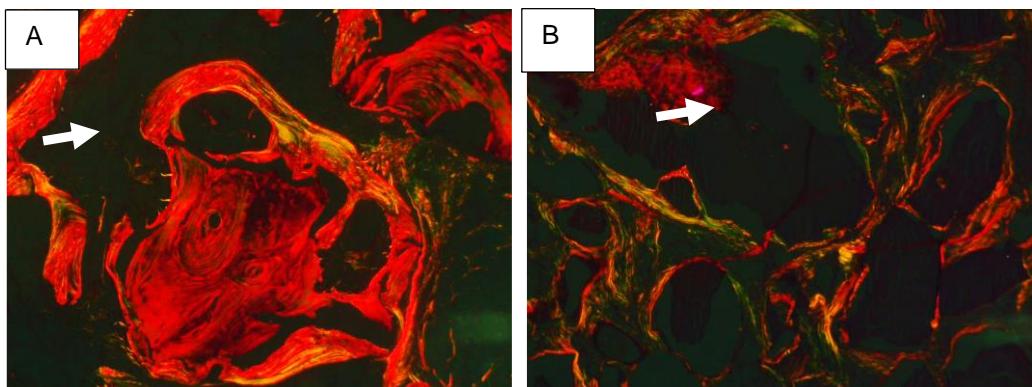


Fonte: LABOPAVE (Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Catarina), UFSC, Curitibanos, SC.

É possível observar comparativamente entre as imagens apresentadas anteriormente com os tratamentos bio-oss® sem e com PRP aos 60 e 90 dias, que nas imagens aos 60 dias, o tratamento sem PRP evidenciou maior presença de conjuntivo e/ ou ósseo imaturo (coloração vermelha).

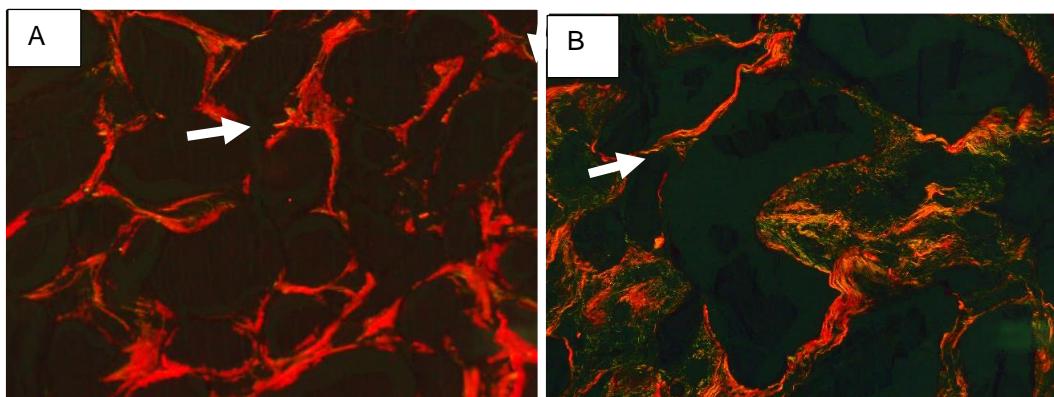
Já nas imagens de 90 dias, o grupo sem PRP evidenciou maior crescimento ósseo (verde), em detrimento do com PRP.

Figura 30: Imagem obtida com coloração Picosirius de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias (A) e 90 dias (B) com tratamento com bonefill® sem PRP. Onde: setas brancas - biomaterial remanescente (BR). Notar a presença de tecido ósseo imaturo e/ ou tecido conjuntivo em coloração vermelha e tecido ósseo em coloração verde. Aumento 40X



Fonte: LABOPAVE (Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Catarina), UFSC, Curitibanos, SC.

Figura 31: Imagem obtida com coloração Picosirius de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias (A) e 90 dias (B) com tratamento com bonefill® acrescido por PRP. Onde: setas brancas - biomaterial remanescente (BR). Notar a presença de tecido ósseo imaturo e/ ou tecido conjuntivo em coloração vermelha e tecido ósseo em coloração verde. Aumento 40X



Fonte: LABOPAVE (Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Catarina), UFSC, Curitibanos, SC.

No que se refere as imagens apresentadas anteriormente com os tratamentos bonefill® sem e com PRP aos 60 e 90 dias, nas de 60 dias, o

tratamento sem PRP evidenciou significativa presença de conjuntivo e/ ou ósseo imaturo (coloração vermelha).

Já para as imagens de 90 dias, os grupos bonefill® sem PRP e com PRP evidenciaram similares crescimento ósseo (verde); por sua vez, em comparação com os tratamentos envolvendo os outros biomateriais, em menor presença.

5- 8 Microscopia eletrônica de varredura

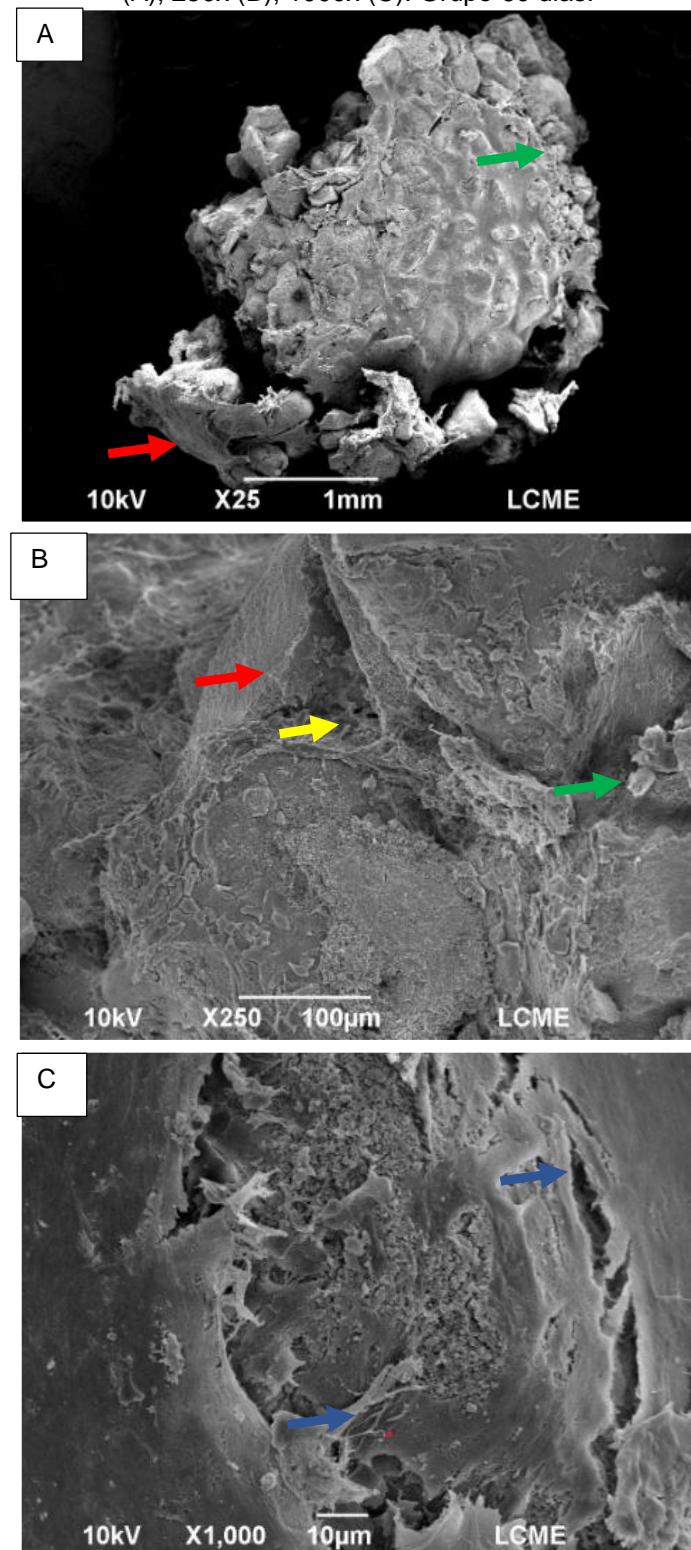
Para os estudos qualitativos de microscopia eletrônica de varredura encaminhou-se uma amostra de cada tratamento (Quadro 18) para o Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME), UFSC, Florianópolis, SC. As observações e imagens foram realizadas em magnitude de 20, 100, 250 e 1000 vezes.

Quadro 18: Numeração da sequência de figuras de resultados de MEV conforme os tratamentos que representam.

Tratamento	60 dias	90 dias
HA	Figura 32	Figura 38
HA PRP	Figura 33	Figura 39
bio-oss®	Figura 34	Figura 40
bio-oss® PRP	Figura 35	Figura 41
bonefill®	Figura 36	Figura 42
bonefill® PRP	Figura 37	Figura 43

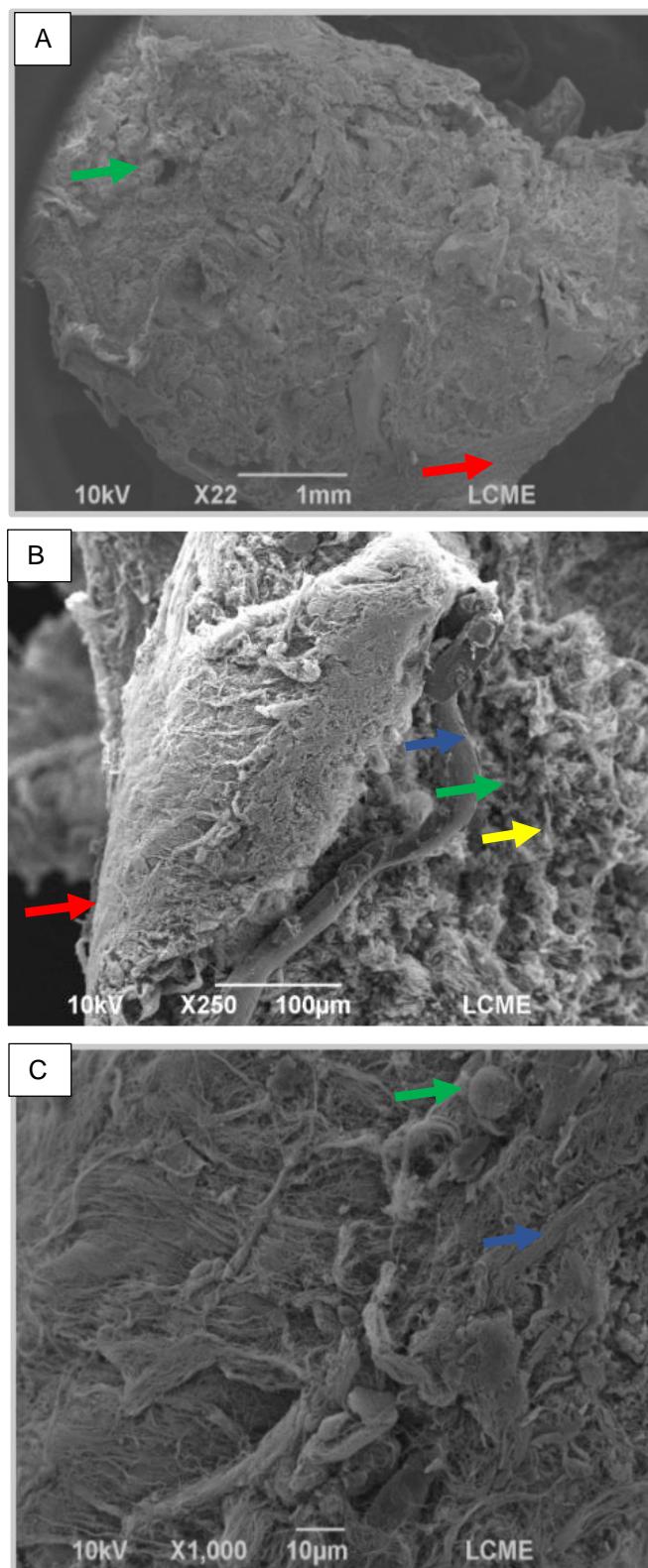
Fonte: autor

Figura 32: Imagem de microscopia eletrônica de varredura de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias, do tratamento com HA sem PRP. Observar: grânulos do biomaterial (setas verdes); calvária (setas vermelhas); tecido fibrocolagenoso (setas azuis); proliferações citoplasmáticas (setas amarelas). Aumentos de 25x (A), 250x (B), 1000x (C). Grupo 60 dias.



Fonte: LCME (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina), UFSC, Florianópolis, SC.

Figura 33: Imagem de microscopia eletrônica de varredura de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias, com tratamento com HA com PRP. Observar: grânulos do biomaterial (setas verdes); calvária (setas vermelhas); proliferações citoplasmáticas (setas amarelas); tecido de aspecto membranoso (setas azuis). Aumentos de 22x (A), 250x (B), 1000x (C). Grupo 60 dias.



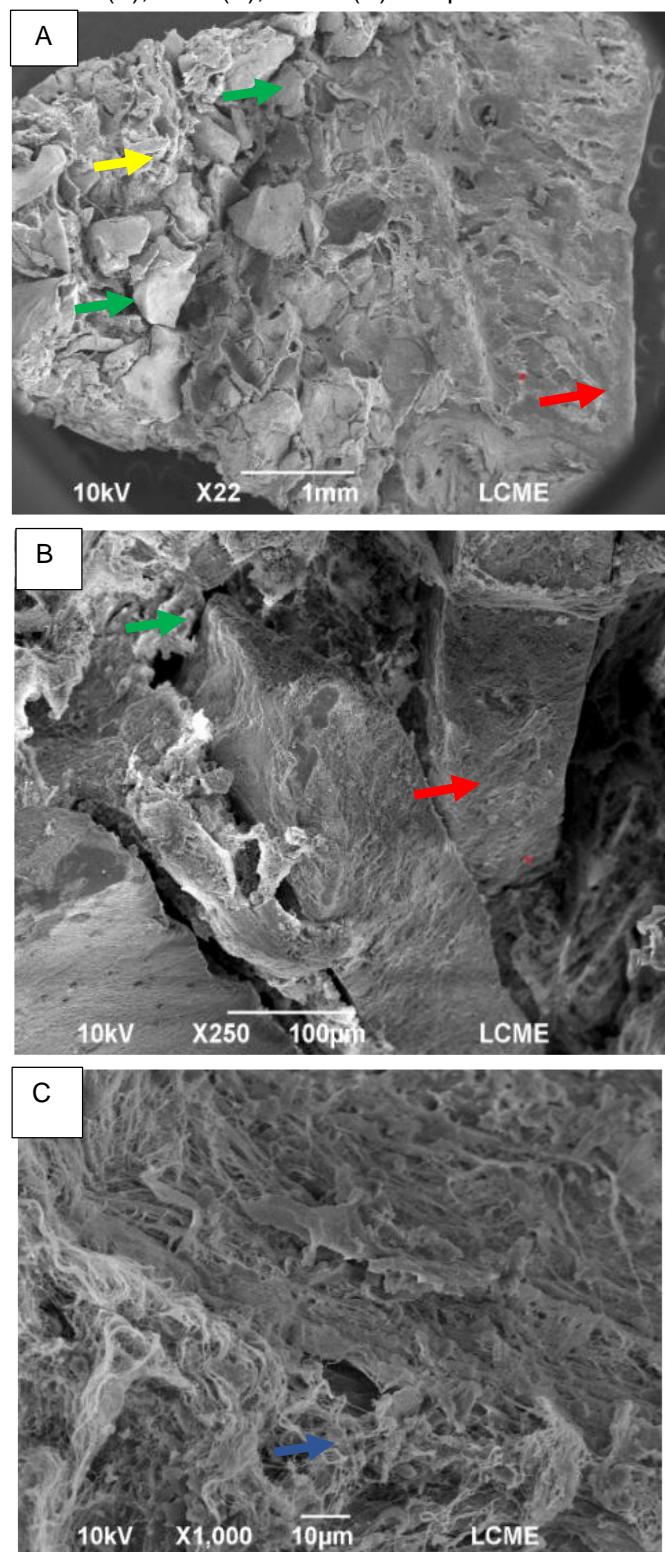
Fonte: LCME (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina), UFSC, Florianópolis, SC.

Através das imagens de MEV apresentadas anteriormente relativas aos tratamentos envolvendo HA com e sem PRP, observa-se:

No tratamento HA sem PRP: significativa quantidade de grânulos do biomaterial, presença discreta de tecido fibrocolagenoso, além de discreta presença de proliferação citoplasmática entre os poros do biomaterial, bem como a presença de osteócito.

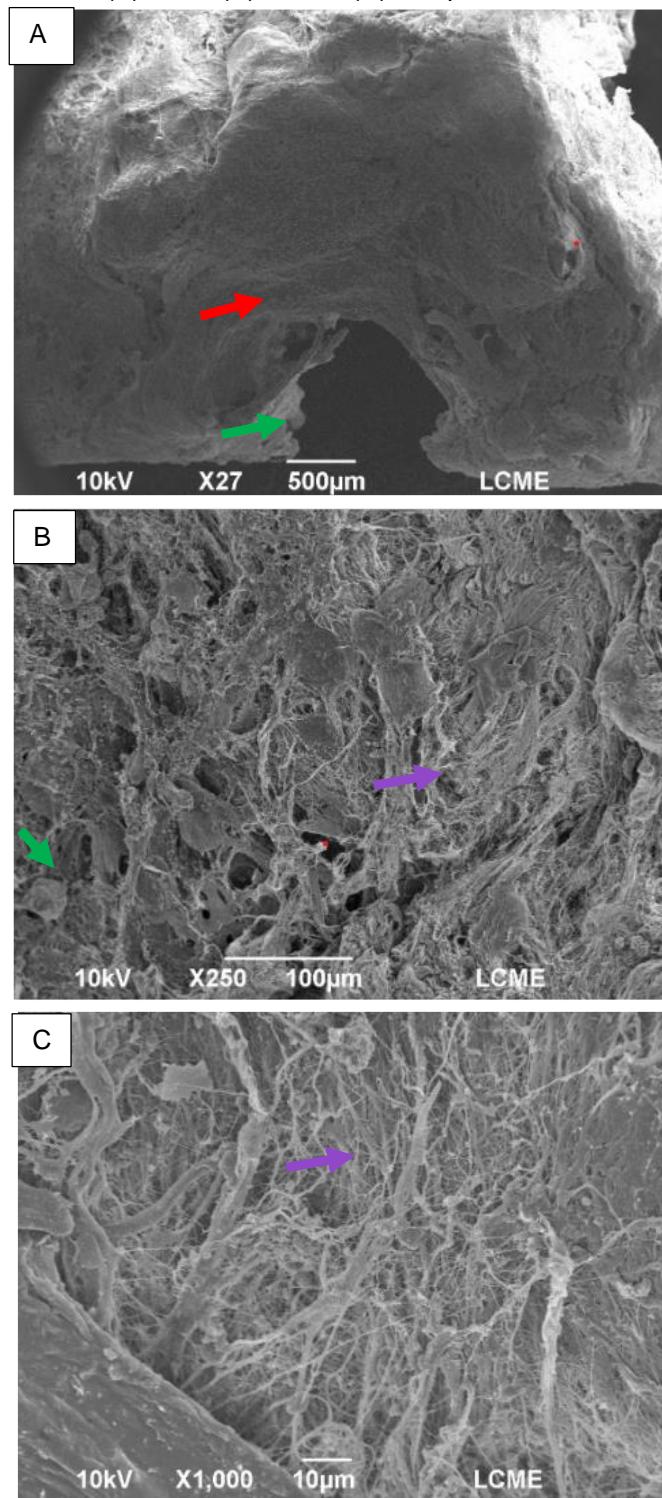
No tratamento com PRP nota-se a presença, especialmente em 250 X, de crescimento celular de aspecto desorganizado, sem presença de osteócitos.

Figura 34: Imagem de microscopia eletrônica de varredura de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias, do tratamento com bio-oss® sem PRP. Observar: grânulos do biomaterial (setas verdes); calvária (setas vermelhas); tecido fibrocolagenoso (setas azuis); proliferações citoplasmáticas (setas amarelas). Aumentos de 22x (A), 250x (B), 1000x (C). Grupo 60 dias.



Fonte: LCME (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina), UFSC, Florianópolis, SC.

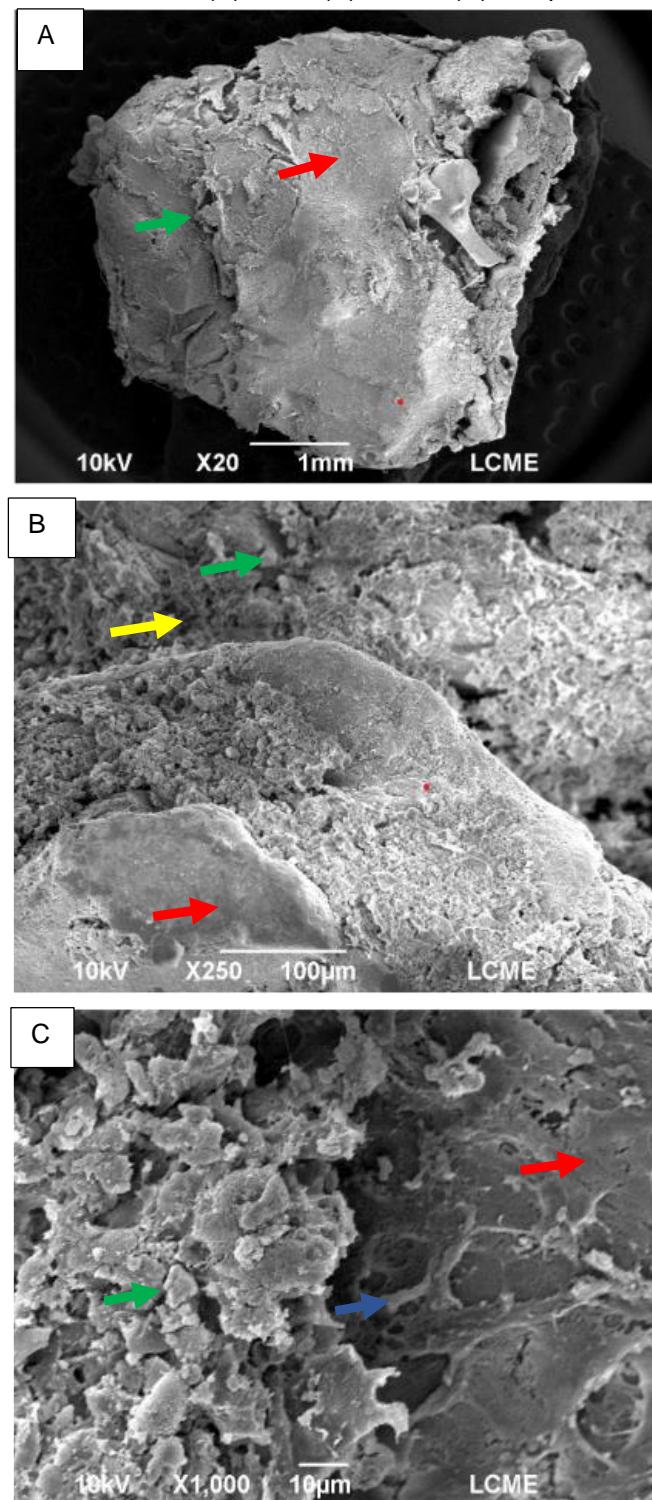
Figura 35: Imagem de microscopia eletrônica de varredura de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias, do tratamento com bio-oss® com PRP. Observar: grânulos do biomaterial (setas verdes); calvária (setas vermelhas); presença de emaranhado desorganizado de formação tecidual (setas roxas). Aumentos de 27x (A), 250x (B), 1000x (C). Grupo 60 dias.



Fonte: LCME (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina), UFSC, Florianópolis, SC.

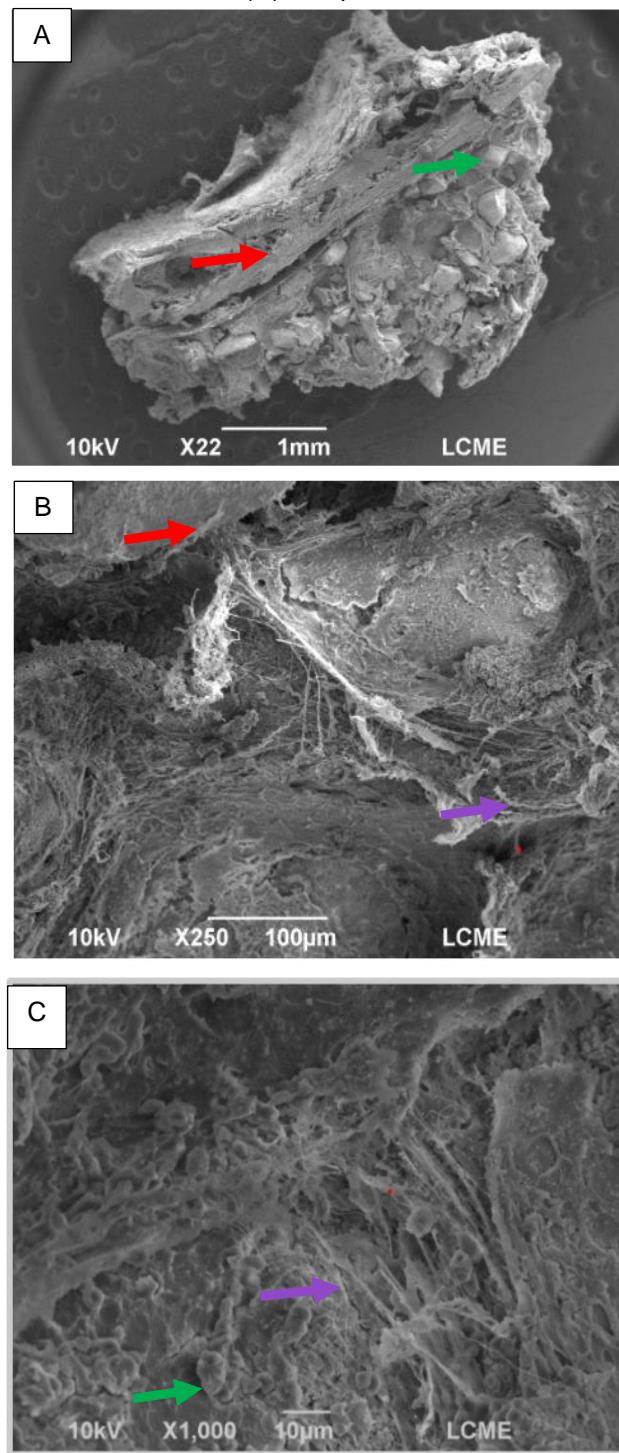
Nos tratamentos com bio-oss® ilustrados anteriormente, também aparecem osteócitos no tratamento sem PRP, bem como proliferações citoplasmáticas e, no tratamento com PRP um emaranhado desorganizado de crescimento tecidual, sem osteócitos.

Figura 36: Imagem de microscopia eletrônica de varredura de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias, do tratamento com bonefill® sem PRP. Observar: grânulos do biomaterial (setas verdes); calvária (setas vermelhas); formação fibrocolagenosa (setas azuis); proliferações citoplasmáticas (setas amarelas). Aumentos de 20x (A), 250x (B), 1000x (C). Grupo 60 dias.



Fonte: LCME (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina), UFSC, Florianópolis, SC.

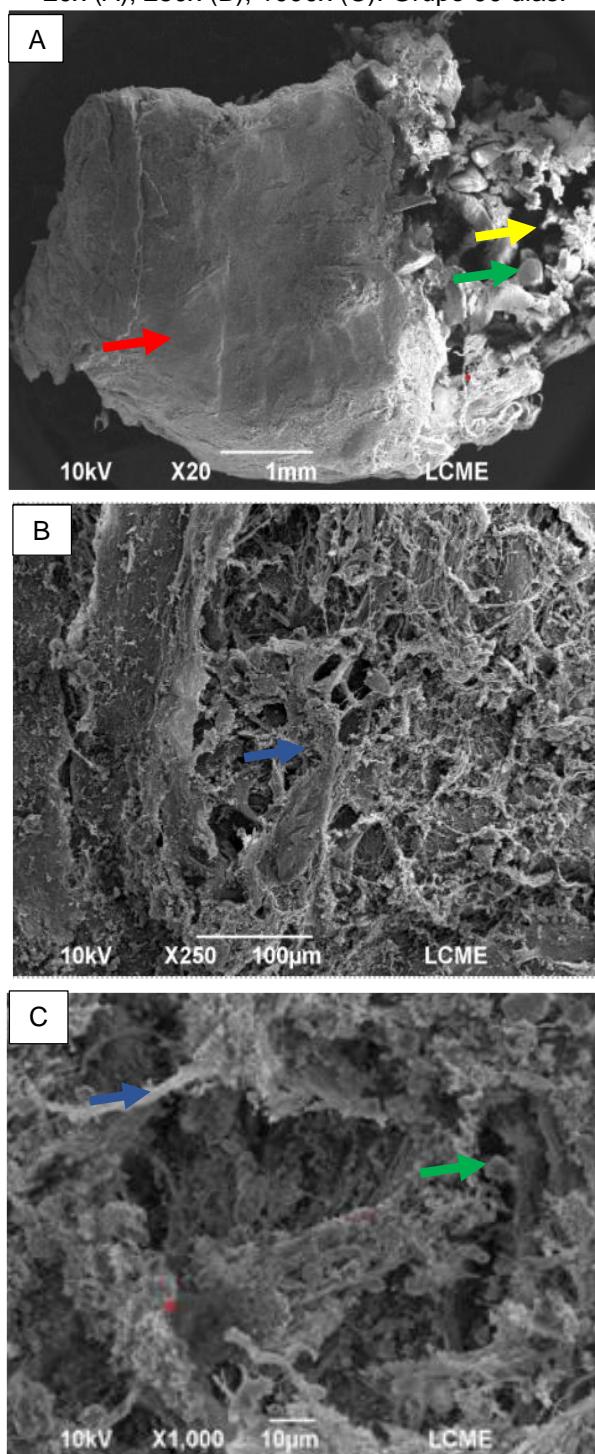
Figura 37: Imagem de microscopia eletrônica de varredura de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 60 dias, do tratamento com bonefill® com PRP. Observar: grânulos do biomaterial (setas verdes); calvária (setas vermelhas); formação tecidual de aspecto desorganizado (setas roxas). Aumentos de 20x (A), 250x (B), 1000x (C). Grupo 60 dias.



Fonte: LCME (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina), UFSC, Florianópolis, SC.

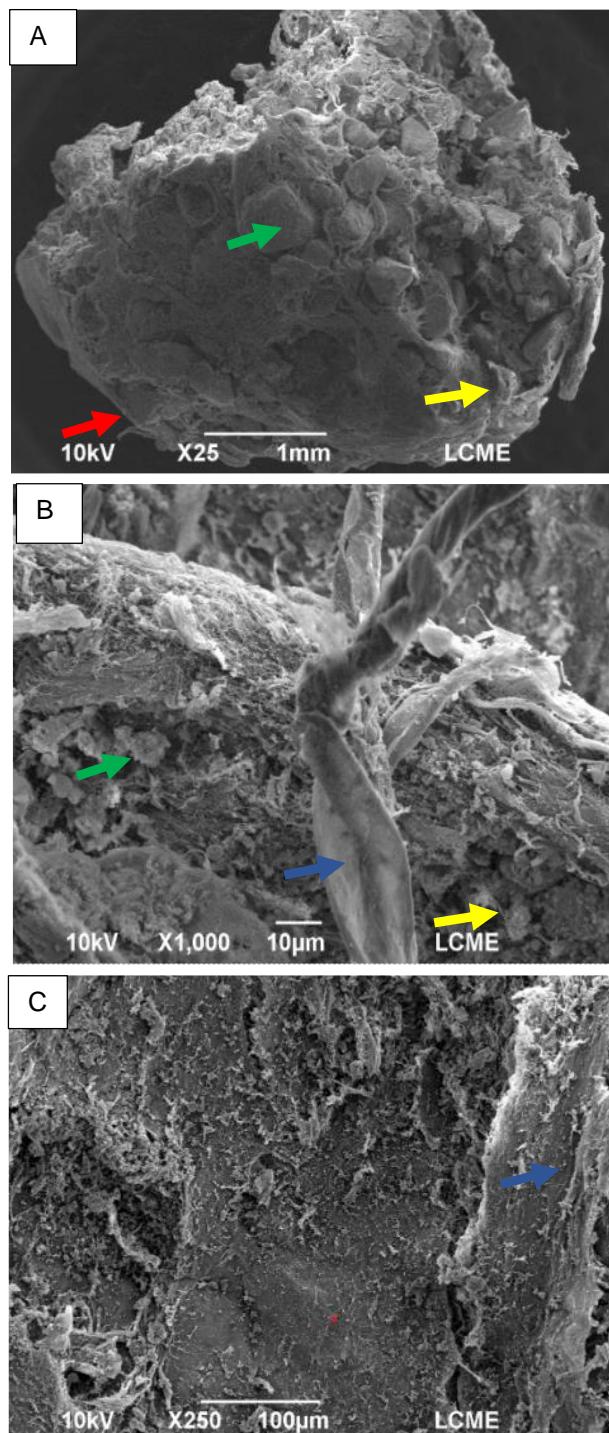
Para os tratamentos empregando bonefill® com e sem PRP, as observações foram análogas as citadas para os tratamentos com HA e bio-oss®, de forma que com o acréscimo do PRP aos biomateriais observou-se formação de tecido desorganizado, menor presença de biomaterial remanescente e pobre presença de osteócitos.

Figura 38: Imagem de microscopia eletrônica de varredura de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 90 dias, do tratamento com HA sem PRP. Observar: grânulos do biomaterial (setas verdes); calvária (setas vermelhas); fibrocolagenoso (setas azuis); proliferações citoplasmáticas (setas amarelas). Aumentos de 20x (A), 250x (B), 1000x (C). Grupo 90 dias.



Fonte: LCME (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina), UFSC, Florianópolis, SC.

Figura 39: Imagem de microscopia eletrônica de varredura de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 90 dias, do tratamento com HA com PRP. Observar: grânulos do biomaterial (setas verdes); calvária (setas vermelhas); tecido fibrocolagenoso (setas azuis); proliferações citoplasmáticas (setas amarelas). Aumentos de 20x (A), 250x (B), 1000x (C). Grupo 90 dias.

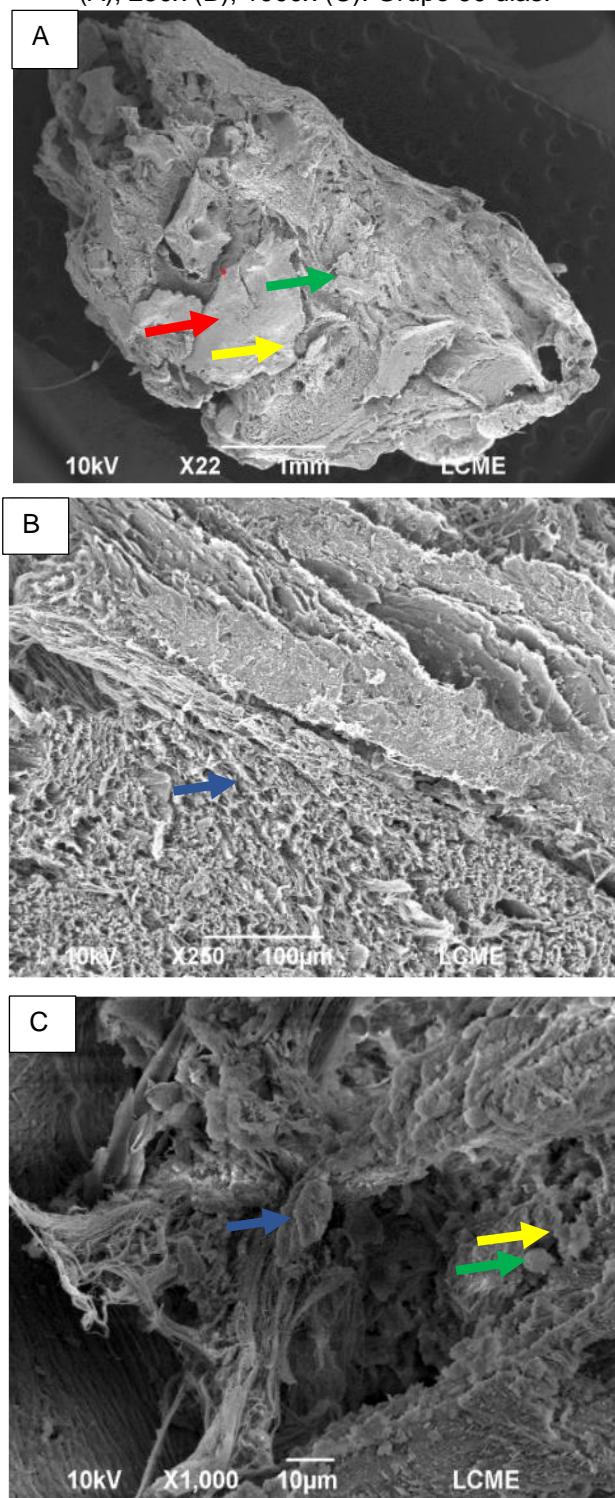


Fonte: LCME (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina), UFSC, Florianópolis, SC.

Aos 90 dias, com o emprego de HA com o acréscimo de PRP menos biomaterial remanescente foi observado, sem verificação de osteócitos, nem proliferações citoplasmáticas entre os poros. Para esse tratamento também ficou aparente a formação de tecido de aspecto membranoso e desorganizado.

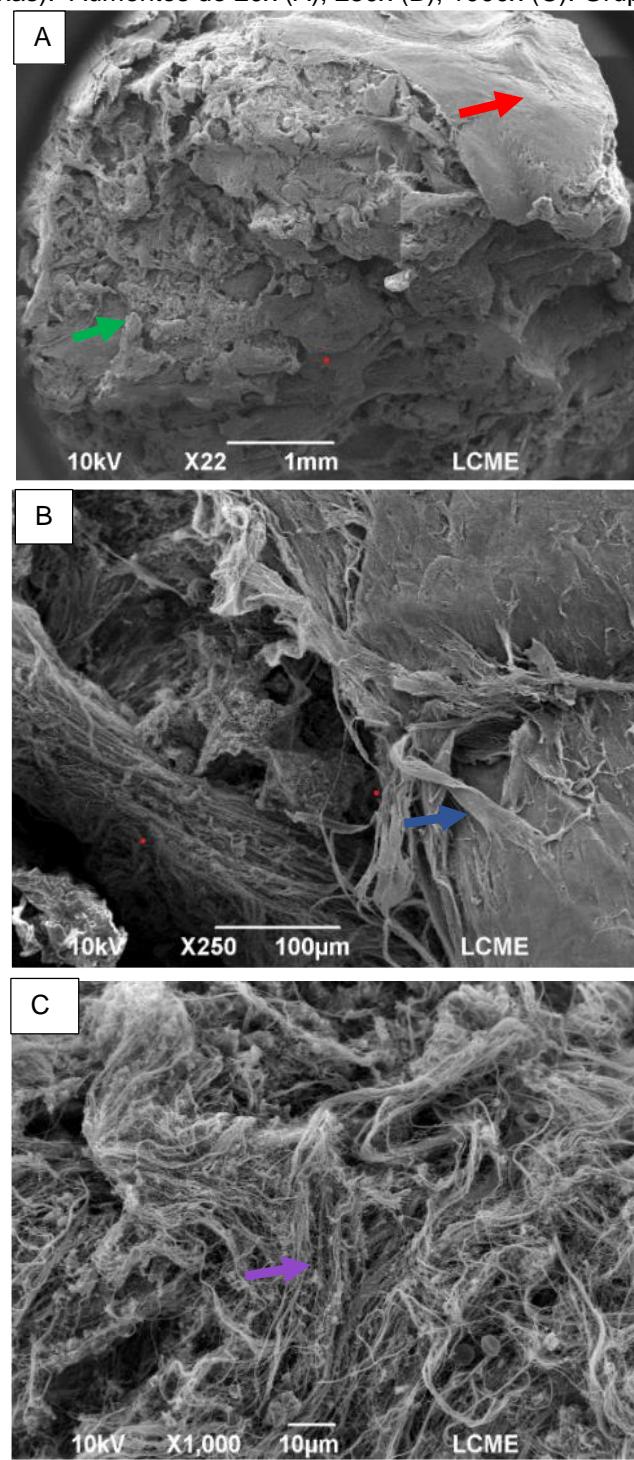
Todavia a HA empregada isoladamente propiciou infiltração celular entre os poros.

Figura 40: Imagem de microscopia eletrônica de varredura de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 90 dias, do tratamento com bio-oss® sem PRP. Observar: grânulos do biomaterial (setas verdes); calvária (setas vermelhas); tecido fibrocolagenoso (setas azuis); proliferações citoplasmáticas (setas amarelas. Aumentos de 20x (A), 250x (B), 1000x (C). Grupo 90 dias.



Fonte: LCME (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina), UFSC, Florianópolis, SC.

Figura 41: Imagem de microscopia eletrônica de varredura de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 90 dias, do tratamento com bio-oss® com PRP. Observar: grânulos do biomaterial (setas verdes); calvária (setas vermelhas); tecido fibrocolagenoso (setas azuis); presença de emaranhado desorganizado de formação tecidual (setas roxas). Aumentos de 20x (A), 250x (B), 1000x (C). Grupo 90 dias.

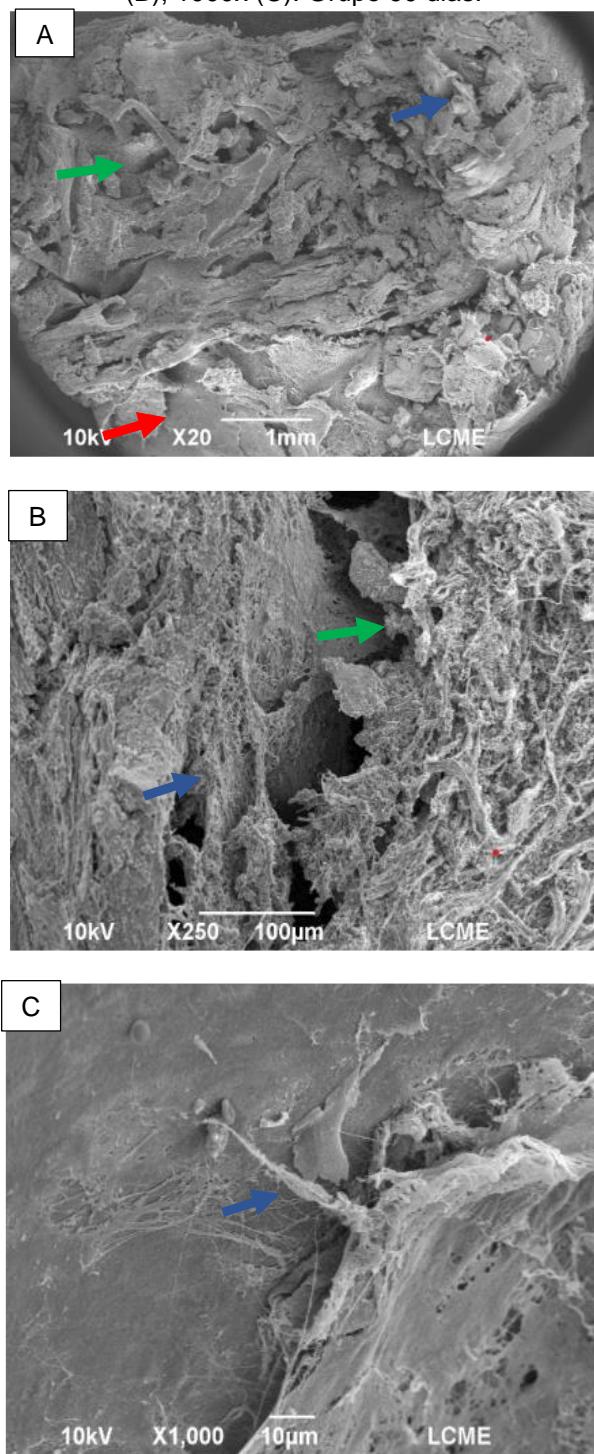


Fonte: LCME (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina), UFSC, Florianópolis, SC.

Aos 90 dias, com o emprego de bio-oss® com PRP não foram observadas proliferações citoplasmáticas, nem osteócitos. Biomaterial remanescente foi pobemente identificado.

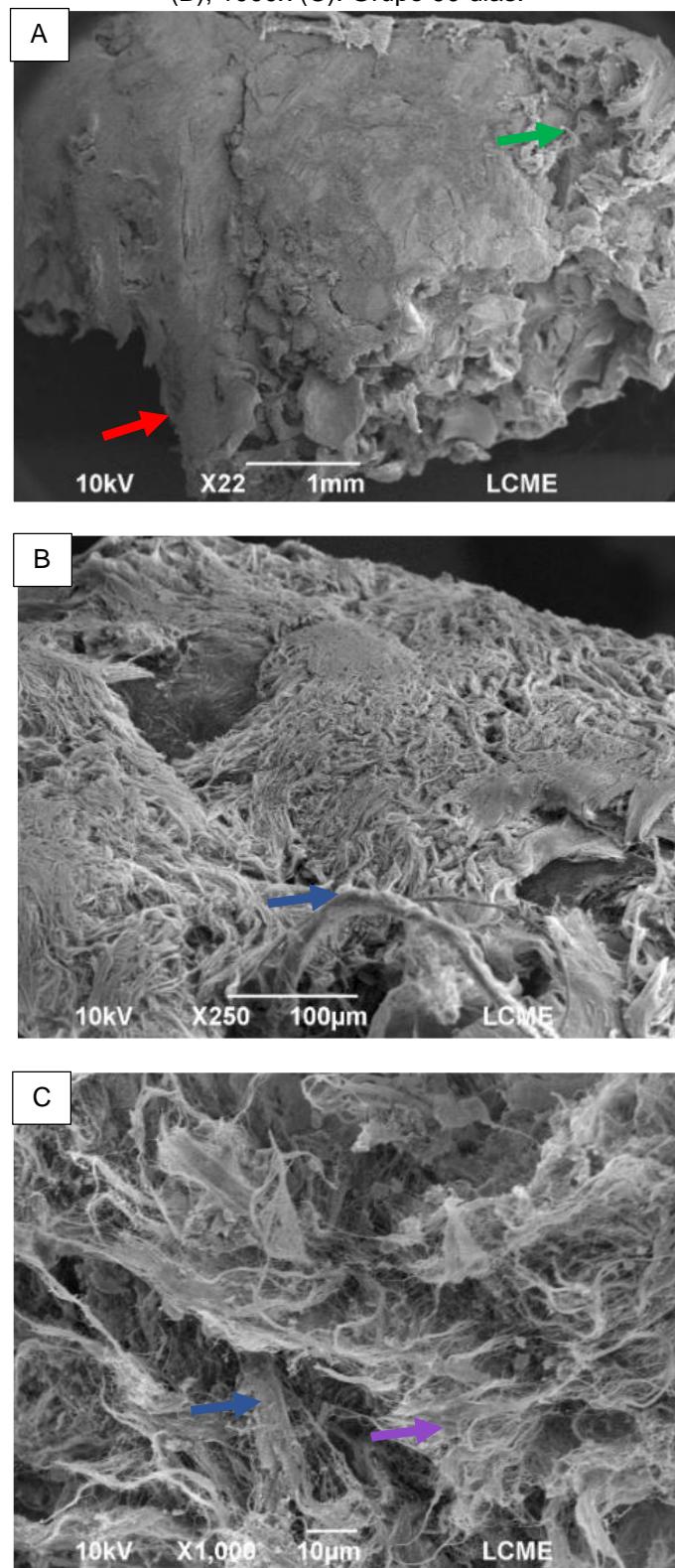
A semelhança das observações com a HA acrescida com PRP, verificou-se a presença de tecido de aspecto membranoso. Com a utilização do bio-oss® isoladamente notou-se infiltração celular entre os poros e o aparecimento de osteócitos.

Figura 42: Imagem de microscopia eletrônica de varredura de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 90 dias, do tratamento com bonefill® sem PRP. Observar: grânulos do biomaterial (setas verdes) implantados em calvária de coelhos (setas vermelhas); tecido fibrocolagenoso (setas azuis). Aumentos de 20x (A), 250x (B), 1000x (C). Grupo 90 dias.



Fonte: LCME (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina), UFSC, Florianópolis, SC.

Figura 43: Imagem de microscopia eletrônica de varredura de fragmento de crescimento ósseo guiado em calvária de coelho em período de evolução de 90 dias, do tratamento com bonefill® com PRP. Observar: grânulos do biomaterial (setas verdes) implantados em calvária de coelhos (setas vermelhas), envolvidos por tecido fibrocolagenoso (setas azuis); presença de emaranhado desorganizado de formação tecidual (setas roxas). Aumentos de 20x (A), 250x (B), 1000x (C). Grupo 90 dias.



Fonte: LCME (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina), UFSC, Florianópolis, SC.

No tratamento bonefill® sem PRP nota-se a presença de osteócitos e pobre verificação de biomaterial remanescente.

Nas imagens de 90 dias, todos os tratamentos que envolveram PRP evidenciaram formação tecidual de aspecto mais desorganizado, especialmente em 250 e 1000 X.

5- 9 Análise estatística

5- 9- 1 Teste de dureza

Os tratamentos obtidos através da mensuração da dureza foram comparados por meio do teste de Tukey, sendo os resultados apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Teste de comparação de média de Tukey entre os tratamentos avaliados para variável dureza (em unidades da escala Shore) nos 60 e 90 dias após as intervenções.

Variá- vel	Biomaterial						Biomateri- al PRP x PRP	p-valor*								
	HÁ		BON		BIO											
	Com PRP	Sem PRP	Com PRP	Sem PRP	Com PRP	Sem PRP										
	Média	Média	Média	Média	Média	Média										
60 dias																
Dureza	7.00 ± 0.16 ^C	7.08 ± 0.37 ^C	8.43 ± 0.14 ^B	10.90 ± 0.25 ^A	8.18 ± 0.13 ^B	10.60 ± 0.25 ^A	<0,001 1	<0,001								
	90 dias						0.4578 0									
12.20 ± 0.59																
12.00 ± 0.64																
10.40 ± 1.24																
11.60 ± 0.60																
12.20 ± 0.72																
10.6 ± 1.16																

*Letras iguais na linha representam médias iguais por meio do teste de Tukey (5%).

Fonte: Autor

Aos 60 dias de pós-operatório os tratamentos bonefill® sem PRP e bio-oss® sem PRP apresentaram as maiores médias para a variável dureza, de forma significativa estatisticamente.

Aos 90 dias de pós-operatório não houve diferente estatística entre os diferentes tratamentos no quesito dureza.

5- 9- 2 Análise histológica

Inicialmente foi realizado teste de comparação de médias Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação de medianas de Dunn. Os resultados dos referidos testes são apresentados na tabela 3. Foi realizado um teste de comparação de médias e não de médias devido ao comportamento das variáveis (quantitativa ordinal).

Tabela 3: Teste de comparação de medianas entre os tratamentos avaliados para as variáveis histológicas nos períodos 60 e 90 dias após as intervenções.

Va-riá-vel	Tratamentos												p-valor r*	
	HA				BONEFILL				BI OSS					
	Com PRP		Sem PRP		Com PRP		Sem PRP		Com PRP		Sem PRP			
	Média±EP	Media na	Média±EP	Media na	Média±E	Media na	Média±EP	Media na	Média±EP	Media na	Média±EP	Media na		
60 dias														
NTO	1.60±0.51	2.0A	1.40±0.40	2.0AB	0.75±0.5	1.0B	1.75±0.25	2.0A	2.00±0.00	2.0A	2.60±0.25	3.0A	0.0275	
DFC	2.00±0.00	2.0	1.6±0.2	2.0	2.00±0.0	2.0	2.00±0.00	2.0	2.20±0.20	2.0	1.80±0.20	2.0	0.1912	
PO	1.60±0.25	2.0	1.00±0.32	1.0	1.25±0.8	1.5	1.75±0.25	2.0	1.40±0.25	1.0	1.40±0.25	1.0	0.7276	
FTM	0.60±0.25	1.0B	1.00±0.00	1.0B	0.50±0.9	0.5B	1.75±0.25	2.0A	0.80±0.20	1.0B	1.6±0.2	2.0A	0.0306	
OP	27.00±1.37	10.0B	20.00±7.07	20.0B	20.00±13.70	10.0B	20.00±5.40	22.5B	65.00±8.37	60.0A	80.00±4.47	80.0A	0.0116	
MA	0.20±0.20	0.0	1.4±0.5	1.0	1.75±0.5	2.0	0.50±0.29	0.5	0.60±0.25	1.0	0.20±0.20	0.0	0.2919	
NFV	1.0±0.0	1.0	1.6±0.2	2.0	1.5±0.5	1.0	2.0±0.0	2.0	1.2±0.2	1.0	1.4±0.2	1.0	0.0827	
90 dias														
NTO	1.20±0.20	1.0B	0.80±0.37	1.0B	2.00±0.71	2.0A	2.75±0.25	3.0A	1.20±0.20	1.0B	1.75±0.25	2.0A	0.0194	
DFC	2.0±0.0	2.0	2.0±0.4	2.0	2.0±0.32	2.0	2.0±0.3	2.0	1.6±0.4	1.0	2.5±0.4	3.0	0.6942	
PO	2.00±0.00	2.0	1.40±0.89	1.0	1.40±0.2	1.0	2.00±0.41	2.0	1.20±0.20	1.0	1.75±0.22	2.0	0.1458	
FTM	1.0±0.3	1.0	0.6±0.4	0.0	1.2±0.20	1.0	1.5±0.4	2.0	2.0±0.4	2.0	1.0±0.0	1.0	0.1232	
OP	18.0±2.00	15.0	18.0±15.54	5.0	42.0±11.90	40.0	67.5±9.22	65.0	20.0±8.22	20.0	37.5±7.64	35.0	0.0700	
MA	1.80±0.37	2.0a	1.80±0.49	2.0A	1.40±0.2	1.0AB	1.00±0.00	1.0B	0.80±0.20	1.0B	1.25±0.25	1.0B	0.0286	
NFV	2.00±0.32	2.0	1.60±0.24	2.0	1.40±0.24	1.0	2.00±0.00	2.0	1.20±0.20	1.0	1.25±0.22	1.0	0.1139	

NTO: neoformação de tecido ósseo; **DFC:** deposição de fibras colágenas; **PO:** presença de osteoblastos; **FTM:** presença de formação de tecido mieloide; **OP:** presença de osso primário; **MA:** presença de macrófagos; **NFV:** neoformação vascular; **EP:** erro-padrão; *p-valor teste Kruskal-Wallis; Letras iguais representam médias iguais pelo teste de Dunn.

Fonte: Autor

Entre as variáveis histológicas analisadas, no período de 60 dias, houve diferença estatística ($p<0,05$) para NTO (neoformação de tecido ósseo) e MA (presença de macrófagos).

Com base no teste de comparação das medianas dos seis tratamentos avaliados (biomaterial + PRP), o tratamento bonefill® com PRP apresentou o menor valor para a variável NTO. Os demais tratamentos apresentaram valores estatisticamente iguais para a variável NTO.

Para a variável FTM as maiores medianas foram encontradas para os tratamentos bonefill® e bio-oss® sem a presença de PRP.

Já para a variável OP, o tratamento que apresentou maior proporção de osso primário foi bio-oss® sem PRP.

Entre as variáveis histológicas analisadas, no período de 90 dias, houve diferença estatística ($p<0,05$) para as variáveis NTO e MA.

No que se refere a NTO, bonefill® com PRP, bonefill® sem PRP e bio-oss® sem PRP apresentaram as maiores medianas.

Já para a variável MA, o tratamento hidroxiapatita sem PRP apresentou maior mediana.

A tabela 4 faz alusão a frequência relativa para a variável biomaterial remanescente através do emprego do teste não paramétrico de Fisher.

Tabela 4: Frequência relativa para a variável biomaterial remanescente (BR) nos períodos 60 e 90 após as intervenções.

Variáveis	Tratamentos												p-valor*	
	HÁ				BONEFILL				BIOSS					
	Com PRP		Sem PRP		Com PRP		Sem PRP		Com PRP		Sem PRP			
	n	%	n	%	n	%	n	%	N	%	n	%		
60 dias														
BR	3	60 ^A	5	100 ^A	5	100 ^A	2	50	4	80 ^A	0	0 ^b	0.010 7	
90 dias														
BR	5	100	5	100	3	60	1	20	4	80	2	50	0.086 6	

n: frequência absoluta da presença de biomaterial (Sim); *p-valor teste exato de Fisher. Letras iguais representam médias iguais.

Fonte: Autor

Quando comparado a frequência de material remanescente (BR) apenas houve diferença entre os tratamentos de 60 dias e o tratamento bio-oss® com PRP foi o que apresentou a menor frequência relativa.

Por outro lado, os tratamentos HA sem PRP e bonefill® com PRP apresentaram biomaterial em todas as amostras. Já aos 90 dias, todos os tratamentos apresentaram frequências estatisticamente iguais.

5- 9- 3 Análise histomorfométrica

As preposições de normalidade e independência dos resíduos, assim como a homogeneidade das variâncias foram previamente testados. Inicialmente as pressuposições não foram atendidas e com isso foi realizado a transformação de box-cox (SAKIA, 1992).

Após, foi realizada análise de variância satisfazendo o seguinte modelo estatístico: $y_{ijk} = \mu + Biomaterial_i + PRP_j + Biomaterial \times PRP_{ij} + \varepsilon_{ijk}$, no qual y_{ijk} : variáveis analisadas (área (μm) e percentagem); μ : média geral de todas n observações; biomaterial_i: biomateriais utilizados (hidroxiapatita, bio-oss® e bonefill®); PRP_j: presença ou ausência de PRP; biomaterial x PRP_{ij}: interação entre biomaterial e presente ou ausência de PRP e ε_{ijk} : erro experimental ($N \sim (0, \sigma^2)$). Caso observado diferença estatística, os tratamentos foram comparados por meio do teste de Tukey. Foi utilizado o nível de significância de 5%. Para isso, foi utilizado o programa estatístico R Studio (CORE TEAM, 2000).

A tabela 5 apresenta os resultados obtidos a partir dos testes de comparação de média de Tukey entre os diferentes tratamentos.

Tabela 5: Teste de comparação de média de Tukey entre os tratamentos avaliados para as variáveis histomorfométricas (tipo I) nos períodos 60 e 90 após as intervenções.

Variáveis	Biomaterial						p-valor*		
	HA		BONEFILL		BIOSS				
	Com PRP	Sem PRP	Com PRP	Sem PRP	Com PRP	Sem PRP	Biomaterial	PRP	Biomaterial x PRP
	Média ± EP	Média ± EP	Média ± EP	Média ± EP	Média ± EP	Média ± EP	Biomaterial	PRP	Biomaterial x PRP
60 dias									
Área (μm^2)	236941.2 ^C D	452061.9 ^A B	143093.5 ^D	505413.7 ^A	264806.1 ^{BC} D	289366.7 ^B C	0.619	<0.00 1	<0.001
	±	±	±	±	±	±			
	51072.55	46883.03	27223.06	50706.36	32783.23	27501.45			
Porcentagem	10.00±2.1 6 ^{CD}	19.09±1.9 8 ^{AB}	6.04±1.1 5 ^D	21.34±2.1 4 ^A	11.18±1.38 BCD	12.22±1.1 6 ^{BC}	0.619	<0.00 1	<0.001
90 dias									
Área (μm^2)	191257.1 ^A BC	114026.9 ^C	184594.2 ^{BC}	253162.7 ^A B	220193.7 ^{AB} C	348866.7 ^A			
	±	±	±	±	±	±			
	19582.59	19715.91	27919.04	25038.24	30950.53	46341.14			
Percentagem	8.08±0.83 ^A BC	4.81±0.83 C	7.79±1.1 8 ^{BC}	10.69±1.0 6 ^{AB}	9.30±1.31 ^A BC	14.73±1.9 6 ^A	<0.001	0.201	<0.001

*Letras iguais representam médias iguais por meio do teste de Tukey (5%).

Fonte: Autor

Ao avaliar a área (em micrômetros) e a porcentagem aos 60 e 90 dias para o tipo I, a associação entre o biomaterial com o PRP apresentou diferença estatística (Tabela 4). Portanto existe diferença entre os seis tratamentos avaliados.

Aos 60 dias, o tratamento que apresentou menor média de área e porcentagem foi o tratamento bonefill® com PRP (Figura 44).

Por outro lado, o tratamento bio-oss® sem PRP apresentou as maiores médias para área e porcentagem aos 90 dias.

As comparações de média de Tukey entre os tratamentos avaliados para as variáveis histomorfométricas (tipo III) são apresentadas na tabela 6.

Tabela 6. Teste de comparação de média de Tukey entre os tratamentos avaliados para as variáveis histomorfométricas (tipo III) nos dias 60 e 90 após a intervenção.

Variáveis	Biomaterial						p-valor		
	HA		BOM		BIO		Biomateri al	PRP	Biomateri al x PRP
	Com PRP	Sem PRP	Com PRP	Sem PRP	Com PRP	Sem PRP			
	Média ± EP	Biomateri al	PRP	Biomateri al x PRP					
60 dias									
Área (μm^2)	88788.72 ±	58602.25 ±	75758.06 ±	95129.04 ±	129127.9 1	117925.6 7	<0.001	0.847	0.190
Percentage m	18382.91	9007.77	13002.58	12158.53	18958.15	12979.30			
Área (μm^2)	171393.3 5 ^A	68250.13 B	136260.9 6 ^A	175645.6 1 ^A	189526.0 7 ^A	179828.8 5 ^A	<0.001	<0.001	<0.001
Percentage m	25383.90	13125.87	19783.85	37196.48	25640.88	24728.40			
Área (μm^2)	7.24±1.07 A	2.88±0.5 5 ^B	5.75±0.84 A	7.42±1.57 A	8.00±1.08 A	7.59±1.04 A	<0.001	<0.001	<0.001
Percentage m									

*Letras iguais representam médias iguais por meio do teste de Tukey (5%).

Fonte: Autor

Ao avaliar o tipo III no período 60 dias não houve diferença estatística da associação entre o biomaterial com a presença ou ausência de PRP para as variáveis área e porcentagem (Tabela 6). Por outro lado, foram encontradas diferenças estatísticas entre os três biomateriais estudados.

Aos 60 dias, o biomaterial que apresentou a maior área foi o bio-oss®, já os biomateriais bonefill® e HA apresentaram resultados semelhantes. Já quando comparada a porcentagem, o biomaterial bonefill® apresentou resultado semelhante ao bio-oss®.

Já aos 90 dias, a associação entre os três biomateriais e a presença/ausência de PRP não apresentou diferença estatística ($p<0,05$). O tratamento que apresentou o pior resultado, tanto para a variável área quanto para a variável percentagem, foi o HA sem PRP. Os demais tratamentos apresentaram resultados estatisticamente semelhantes.

6 DISCUSSÃO

O modelo de crescimento ósseo guiado *in vivo* empregado neste estudo baseado na criação de um espaço segregado para a neovascularização e proliferação de células osteoprogenitoras, conforme sugerem Dinato *et al.* (2007), com o objetivo de estabelecer uma barreira contra o crescimento de tecidos alheios ao tecido ósseo, que possuem velocidade de migração maior que as células osteogênicas foi adequado.

Segundo Stockman *et al.* (2011) a técnica de regeneração óssea guiada pode melhorar a qualidade óssea no processo regenerativo, todavia não foi possível afirmar com base no estudo aqui discutido, uma vez que demandaria de um prazo maior de avaliação, ou até mesmo a comparação com um grupo controle com a criação de um defeito crítico para a promoção da regeneração.

Haddad *et al.* (2006); Levandowski (2009) e Kuci (2017) sugerem que o método consiste na implantação de barreiras mecânicas para isolamento do tratamento estudado e do defeito ósseo propriamente dito, permitindo, assim, que as células ósseas precursoras acessem um espaço isolado destinado à regeneração do tecido ósseo. Para Daahlin *et al.* (1988) o recobrimento dos enxertos com membranas, absorvíveis ou não, está baseado no fato de isolar a área de reparo (enxerto) para evitar a migração e proliferação de células indesejadas (nesse caso, células do tecido conjuntivo), permitindo o povoamento do enxerto com células ósseas, osteoclastos e proteínas em suas partículas, o que permite, dessa forma, a osseointegração eficaz de suas partículas. O emprego das campânulas confeccionadas com náilon favoreceu este isolamento, além de não terem sido observadas reações de incompatibilidade ao material, portanto inerte durante o período avaliado.

De acordo com Junqueira & Carneiro (2004), histologicamente, em todos os animais nos quais a neoformação óssea foi observada, o osso recém-formado apresentou aspecto imaturo, acompanhado de intensa formação vascular e fibras colágenas organizadas irregularmente, o que foi possível constatar pelas análises histológicas realizadas nesse experimento com o emprego da coloração de hematoxilia-eosina. Caso as coletas de amostras fossem realizadas em períodos mais prolongados, sem intercorrências, seria possível a visualização de osso maduro pela presença preponderante de osteócitos.

Uma alternativa ao uso das campânulas para a comparação entre diferentes tratamentos para a reparação óssea seria a criação de defeitos críticos, entretanto em calvárias de coelhos haveria necessidade da criação de defeitos maiores de 15mm de diâmetro, uma vez que conforme Zhao *et al.* (2011), defeitos ósseos com 8mm e 10mm de diâmetro, não podem ser considerados críticos, pois ocorrerá formação óssea no centro do defeito, o que o descaracteriza como um defeito crítico.

Para Gupta *et al.* (1982); Paley (1986); Clockie *et al.* (2002) e Zhao *et al.* (2011) os defeitos críticos na calvária de coelhos podem chegar até 15mm de diâmetro, no entanto, com esta dimensão, apenas um defeito por calvária seria possível, o que permitiria a realização de apenas um tratamento por modelo experimental, o que justifica a escolha pelo crescimento guiado e não pelo defeito crítico no modelo experimental deste trabalho.

A literatura apresenta vários estudos com o emprego de calvária de coelhos como modelo experimental utilizando diversas cerâmicas para auxiliar o reparo ósseo, evidenciando capacidade osteogênica desses biomateriais, sendo considerados osteocondutores, como os trabalhos de Levandowski (2009); Kuci (2017) e Vargas (2018), o que justificou a escolha da espécie nesta pesquisa.

Andrade & Oliveira (2002) afirmam que o estudo em coelhos apresenta vantagens, como fácil manutenção e observação, o fato de possuírem ciclos vitais curtos, permitir o emprego de um número de animais grande, padronizando o ambiente e a genética; além de possibilitar a realização de transplantes e a existência de grande quantidade de informação disponível sobre esse modelo animal, o que ficou confirmado por este estudo, além da relativa facilidade de aquisição, baixo custo alimentar e facilidade de manejo.

Apesar das diferenças entre a calcificação da calvária de coelhos e em humanos, é muito frequente a utilização desta espécie, como nos experimentos de Pelegrine *et al.* (2010) e Pelegrine *et al.* (2010) b, o que também corroborou para a escolha da espécie para o estudo de biomateriais que são comumente empregados em odontologia, valorizando os possíveis resultados aqui obtidos para sua efetiva utilização.

Constantinescu (2002) e Marieb & Mallatti (2003) trouxeram em seus trabalhos que a superfície externa do osso não coberto por cartilagem articular

está envolta por periósteo, que é constituído por membrana conjuntiva densa irregular e unido à base óssea pelas fibras de Sharpey, oriundas das fibras presentes na matriz óssea, o que ficou evidente durante os procedimentos cirúrgicos, já que para a fixação das campânulas junto aos ossos frontal e parietal, inicialmente era necessário o afastamento delicado do periósteo, que contém fibras nervosas, vasos linfáticos e sanguíneos.

A obtenção do plasma rico em plaquetas foi conduzida através da técnica adaptada de Vendramini *et al.* (2006), pela qual foi obtido um incremento médio de 2,45 vezes na contagem de plaquetas, embora Garg *et al.* (2000) afirmem que mediante o processo de preparação do PRP a concentração plaquetária pode aumentar em seis vezes em relação ao sangue normal.

Os fatores de crescimento que agem na consolidação óssea são as proteínas morfogenéticas ósseas (BPMs), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), o fator de crescimento transformador tipo beta (TGF- β), o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator de crescimento insulínico (IGF), as prostaglandinas (PGE-1 e PGE-2), as somatomedinas, o fator de crescimento epidermal, os fatores angiogênicos, a fibronectina, as interleucinas 1 e 2 (IL-1 e IL-2), o fator ativador de osteoclastos, as bradicininas e o fator de necrose tumoral (LIEBERMAN *et al.*, 2002; CROCI *et al.*, 2003). Gerstenfeld (2003) complementa que esses fatores recrutam células inflamatórias, aumentam a síntese da matriz extracelular e estimulam a angiogênese. Muitos destes importantes elementos estão contidos em grânulos plaquetários, o que justificou o estudo do plasma rico em plaquetas, que já é bem aceito como promotor do crescimento em vários tecidos.

Para Frost (1989) a consolidação óssea segue uma sequência bem determinada de fases contínuas e que se superpõem, podendo resumidamente serem divididas e quantificadas em termos do tempo total de consolidação em fase inflamatória (10%), fase de reparação (40%) e fase de remodelação (70%). Conforme os tipos celulares observados nos estudos histológicos, o processo de regeneração óssea durante o período estava em fase predominante de proliferação, muito embora com a interposição de fases, não foi marcante a presença de células comumente presentes em fase de remodelação como macrófagos.

Segundo Wenz & Oesch (2001), os biomateriais podem ser definidos como uma substância ou combinação de duas ou mais substâncias, farmacologicamente inertes, de natureza sintética ou natural, que são utilizados para melhorar, aumentar ou substituir parcial ou integralmente tecidos e órgãos. Os escolhidos para este estudo têm origem sintética (hidroxiapatita) ou natural (bio-oss®, bonefill® - osso bovino), sendo comumente empregados na preparação de um leito ósseo viável para a adaptação de implantes metálicos, e também para o preenchimento em perdas ósseas críticas em decorrência de fraturas graves (cominutivas) ou ressecções ósseas extensas em caso de neoplasias.

Segundo Misch & Dietsh (1993) são materiais projetados para além de substituir partes do corpo, permitir a recuperação de funções biológicas afetadas por doenças ou acidentes. Biocompatibilidade e biofuncionalidade são as principais características necessárias para que esses materiais exerçam essas funções. A biocompatibilidade é a aceitação do biomaterial pelo corpo, já a biofuncionalidade representa a habilidade do material desempenhar a função desejada. No presente estudo, as análises realizadas, histológica, histomorfométrica e por microscopia eletrônica de varredura, permitiram estimar a biocompatibilidade e biofuncionalidade dos biomateriais (hidroxiapatita, bio-oss® e bonefill®). Biocompatibilidade foi confirmada uma vez que não ocorreram reações do tipo corpo estranho; assim como biofuncionalidade, já que o propósito de funcionarem como um arcabouço permitindo crescimento ósseo foi atingido.

Com base no teste de comparação das medianas dos resultados histológicos, dos seis tratamentos avaliados, aos 60 dias de pós-operatório, o tratamento bonefill® com PRP apresentou o menor valor para a variável NTO. Os demais tratamentos apresentaram valores estatisticamente iguais para a variável NTO. Esse resultado vai ao encontro daqueles observados subjetivamente nas imagens histológicas (HE), nas imagens histomorfometricas (Picrosírius) e qualitativamente nos estudos de MEV. Já para a variável OP, o tratamento que apresentou maior proporção de osso primário foi bio-oss®, também sem PRP. Dessa forma, entende-se que o emprego do PRP impactou de forma negativa o processo de reparação óssea, discordando de Pontes (2020), que em seus achados obteve maior NTO com o emprego de fibrina associada ao biomaterial.

Entre as variáveis histológicas analisadas no período de 90 dias, houve diferença estatística ($p<0,05$) para as variáveis NTO e MA. No que se refere a NTO, bonefill® sem PRP e bio-oss® sem PRP apresentaram as maiores medianas, indicando que o emprego do bonefill® e do bio-oss® isolados foi mais efetivo para a formação de tecido ósseo, discordando de Statkiewicz (2022), que encontrou melhores resultados no que se refere a capacidade osteogênica com o bonefill®.

Quando comparada a frequência de material remanescente (BR) apenas houve diferença entre os tratamentos de 60 dias, e o tratamento bio-oss® com PRP foi o que apresentou a menor frequência relativa, o que indica maior atividade osteoclastica e desta forma maior degradação do material no período, concordando com Pontes (2020), que encontraram maior quantidade de macrófagos no grupo envolvendo fibrina associada ao biomaterial. Já aos 90 dias, todos os tratamentos apresentaram frequências estatisticamente iguais. Para melhor comparação entre os biomateriais no que concerne a degradação experimentos por períodos maiores seriam mais esclarecedores.

Na execução dos estudos envolvendo regeneração óssea as avaliações histomorfométricas são muito úteis para as análises. De modo análogo aos estudos de Borie *et al.* (2001) e Kim *et al.* (2012) a histomorformetria permitiu uma análise quantitativa importante, complementando os achados histológicos que em geral são mais qualitativos. Ainda que os histológicos tenham um caráter mais qualitativo, o emprego da técnica de Valiatti *et al.* (2011) favoreceu, mesmo que subjetivamente, uma quantificação que possibilitou a validação dos resultados obtidos estatisticamente.

Nos estudos histomorfométricos, ao avaliar a área (em micrômetros) e a porcentagem aos 60 e 90 dias para o tipo I (tecido conjuntivo e ou ósseo imaturo) a associação entre o biomaterial com o PRP apresentou diferença estatística entre os seis tratamentos avaliados. Aos 60 dias, o tratamento que apresentou menor média de área e porcentagem foi o tratamento bonefill® com PRP, corroborando com a hipótese de não favorecimento da regeneração óssea pelo acréscimo do PRP. Em contrapartida, o tratamento bio-oss® sem PRP apresentou as maiores médias para área e porcentagem aos 90 dias. Os achados discordam com os dos pesquisadores Aghaloo *et al.* (2005) que em estudo

avaliando o efeito do PRP na regeneração óssea de defeito crítico no crânio de coelhos não observaram diferença significativa entre os grupos sem e com PRP, embora tenham percebido uma tendência ao aumento da densidade e da área óssea nos grupos que receberam o PRP. Também vão de encontro aos achados de Viegas *et al.* (2006) que utilizaram PRP na regeneração do tecido ósseo alveolar e cortical e verificaram que o comprimento e área óssea foram afetadas, com valores superiores nos acrescidos de PRP, relativamente ao controle, o que ratificou para os pesquisadores que o PRP apresenta potencial para estimular a regeneração óssea.

Concordando com Camarini *et al.* (2006) que avaliaram o possível favorecimento do processo de reparo ósseo através da utilização do plasma rico em plaquetas (PRP), associado a biomateriais em cavidades ósseas cranianas de cães e concluiram que os materiais estudados (hidroxiapatita e bio-oss®) apresentaram propriedade osteocondutora e ausência de reação inflamatória. Todavia para os autores, a presença ou não do PRP não interferiu na evolução do reparo, o que não foi constatado neste trabalho.

Conforme Whitman *et al.* (1997), o PRP pode ser utilizado em defeitos ósseos ao redor de implantes de titânio associados a enxertos ósseos, por isso a escolha da metodologia envolvendo PRP em associação com enxertos para a promoção da regeneração óssea guiada. Vargas (2018) também demonstrou que a HA associada a fatores de crescimento pode formar osso em sítio ectópico, como no pavilhão auricular de coelhos. Esta cerâmica ofereceu uma aceitável armação para o crescimento ósseo, e juntamente com o PRP foram biocompatíveis, biodegradáveis, osteoindutivos e de natureza osteogênica.

Pissiotis & Spangberg (1990), em um estudo de implantação da HA e HA associada ao colágeno na mandíbula de cobaias, não observaram alteração da biocompatibilidade em nenhum dos dois tratamentos, entretanto verificaram que no período de oito semanas de pós-operatório o grupo implantado com HA associada ao colágeno não apresentava indícios de reparação óssea, ao contrário do grupo tratado somente com HA, o que também ficou evidente no presente estudo, uma vez que não ocorreram reações de imcompatibilidade, houve crescimento de células da linhagem óssea, muito embora o uso isolado do biomaterial foi mais efetivo na reparação óssea guiada.

A hidroxiapatita vem sendo empregada em medicina regenerativa para a substituição de ossos perdidos em fraturas graves. Esta substância é um fosfato de cálcio que tem uma baixa taxa de biodegradação dentro do corpo e de fato representa a principal substância componente da estrutura mineral óssea, por isso vem sendo realizados estudos com hidroxiapatita na consolidação óssea, como adjuvante ou arcabouço para a colocação de material de osteossíntese (KIM *et al.*, 2009; CAO & HENCH, 1996; KATTI, 2004; KATTHAGEN & MITTELMEIER, 1984). O presente estudo corroborou com as informações dos autores acima, uma vez que percebeu-se parcial degradação do material, já que os tratamentos HA sem PRP e bonefill® com PRP apresentaram biomaterial em todas as amostras. Por outro lado, tratamento bio-oss® com PRP apresentou a menor frequência relativa de biomaterial remanescente o que sugere interferência do emprego do PRP na degradação do biomaterial.

Para Nagahara & Isogai (1997), Overgaard *et al.* (1997) a hidroxiapatita sintética é um material biocompatível, não imunogênico e biodegradável. Os achados deste trabalho concordam com os autores nos aspectos comentados pelos pesquisadores.

Corroborando com Najjar (1991) os estudos histológicos e histomorfométricos realizados evidenciaram atividade osteoblástica com formação de tecido conjuntivo e osso imaturo após o implante com HA, demonstrando osteocondutividade do material.

Para Louise *et al.* (1992), as fibras colágenas intimamente associadas com a superfície da hidroxiapatita ou localizadas em áreas de deposição de osteoide são orientadas de maneira perpendicular a esses grânulos. Em contraste, o tecido conjuntivo que rodeia a cápsula fibrosa apresenta camadas estratificadas de fibras colágenas e fibroblastos arranjados paralelamente à superfície do grânulo, o que também foi verificado nesta pesquisa, mostrando a adequada adesão celular ao biomaterial, bem como compatibilidade.

Marchiolli & Moreno (2022) apresentaram um caso clínico de regeneração óssea guiada com uso de fibrina rica em plaquetas e leucócitos. Após a exodontia foi conduzida a instalação imediata do implante e regeneração óssea guiada. Observaram no estudo a integridade do substituto ósseo na região enxertada. No

presente estudo a adição do PRP ao biomaterial também favoreceu a sua justaposição no interior das campânulas.

As observações histológicas deste estudo concordam com as de Misch & Dietsh (1993); Nishibori *et al.*, (1994); Geesink & Hoefnagels (1995), Yildirim (2001); Hallman *et al.* (2002) e Boeck-Neto *et al.* (2002) que perceberam em implantes de hidroxiapatita, osteoblastos e osteócitos maduros em contato com a hidroxiapatita, sem interferência de tecido fibroso, mostrando que esse biomaterial serve como um arcabouço para o crescimento ósseo. Portanto, tais materiais podem ser adicionados aos enxertos autógenos ou xenógenos em casos com limitada quantidade tecidual das áreas doadoras, muitas vezes funcionando como arcabouços, auxiliando o crescimento ósseo, o que pode ser também confirmado com o emprego de enxertos obtidos de ossos bovinos (bio-oss® e bonefill®).

Gomi *et al.* (1993) mostraram a presença de células multinucleadas na interface hidroxiapatita e osso depois da implantação, que podem ser caracterizadas morfologicamente como osteoclastos, responsáveis pela biodegradação da hidroxiapatita, o que não foi marcante neste trabalho, em função do curto período avaliativo, envolvendo as fases inflamatória e proliferativa da regeneração óssea e não tanto a fase de remodelação. Também Hemmerle e colaboradores (1997) encontraram cristais de hidroxiapatita separados e espalhados em citoplasma de células com fatores ultraestruturais semelhantes a macrófagos, sugerindo absorção, o que foi observado de forma não tão intensa no período proposto, mas que era esperado, uma vez que segundo Louise *et al.* (1992) a biodegradação da HA é lenta.

Borges (1998) encontrou osteoclastos ativos sobre a HA e alguns grânulos do produto no interior de macrófagos. Li *et al.* (1995) e Edwards *et al.* (1997) observaram que a reabsorção celular de grânulos de hidroxiapatita ocorre concomitantemente com a formação adjacente de osso novo. Neste estudo também observou-se a interposição de fases de reparação. São importantes estudos com períodos de coleta de material para análise histológica mais longos para avaliar o grau de absorção do xenoenxerto.

Nagahara & Isogai (1997) asseveraram que a hidroxiapatita não induz neoformação óssea, entretanto Edwards e colaboradores (1997) e Borges

(1998) demonstraram reação de células osteogênicas com hidroxiapatita *in vivo*, enquanto Bagambisa (1990) o fizeram em ensaios e *in vitro*, mostrando que a sua superfície é osteocondutiva. O resultado dessa atividade foi a deposição de tecido ósseo diretamente sobre a superfície da hidroxiapatita implantada, sem nenhuma evidência de encapsulação ou tecido de granulação, o que também foi observado no presente estudo, mediante análises histológicas e histomorfométricas.

Para Teixeira (2009) a porosidade determina a colonização celular entre os grânulos do biomaterial que é uma característica bastante importante para a eficácia da reação do material com o meio biológico. As interconexões entre os poros formados pela distribuição do biomaterial implantado assumem um sistema similar a túneis, permitindo o trânsito de fluidos biológicos e células ósseas, facilitando, assim, a formação do novo tecido ósseo no interior do material substituto implantado. Esse aspecto foi verificado através da presença de prolongamentos citoplasmáticos entre os poros, através do estudo de microscopia eletrônica de varredura. Todavia, a proliferação foi mais presente nos tratamentos sem PRP.

Concordando com Aristizabal *et al.* (2017) que concluíram através de seus estudos que as biocerâmicas de fosfatos de cálcio nanoestruturadas micromacro porosas em grânulos de absorção lenta e moderada podem ser indicadas para o tratamento de defeitos ósseos críticos. As biocerâmicas permitem um tipo de crescimento ósseo direto, por meio da formação de um tecido fibrovascular, diferenciação e migração ao local de células, o que pode ser observado através das análises, especialmente as de MEV que possibilitaram a verificação de prolongamentos fibroblásticos entre os poros, de forma mais acentuada nos grupos que receberam tratamento sem PRP.

Para Su-Gwan *et al.* (2001) o tamanho dos cristais de bio-oss® e bonfefill® são comparáveis aos cristais de apatita do osso humano, o que pode facilitar a sua absorção. Citam também que a sua especial arquitetura porosa natural e com um trabeculado muito semelhante ao osso humano promove uma melhor revascularização e, ainda, mantém um arcabouço para a osteocondutividade, aumentando a estabilização do coágulo e absorção sanguínea natural entre os micros e macroporos. Através dos estudos de MEV foi possível verificar que a

porosidade destes compostos, de fato permitiu a penetração de proliferação celular entre os mesmos, especialmente nos tratamentos sem PRP.

Teixeira (2009) afirmam que a absorção dos xenoenxertos derivados de osso bovino tende a ser demorada, pois o tamanho da partícula do biomaterial impacta diretamente no tamanho da área da superfície disponível para reagir com células e fluido biológico. Quanto maior o tamanho das partículas, maior será o tempo de absorção do material. Neste estudo, aos 90 dias de análises todas as amostras continham biomaterial remanescente. Dependendo do propósito clínico é favorável a absorção lenta a demorada para a manutenção da consistência do leito receptor até que ocorra adequada mineralização óssea e dessa forma resistência.

Statkiewicz (2022) relatou que com o uso do bonefill® (6 meses de avaliação) ocorreu um padrão de tecido ósseo com pouco tecido conjuntivo intertrabecular, pouco biomaterial remanescente em toda a área de interesse, com grande incorporação de tecido ósseo maduro pela presença de lacunas preenchidas por osteócitos. Já com o bio-oss® foi notada a permanência de grande quantidade de partículas de biomaterial envolta por tecido ósseo neoformado e entremeado por tecido conjuntivo em desenvolvimento com infiltrado inflamatório, e um padrão de tecido ósseo envolto por uma matriz conjuntiva não mineralizada predominou em todos os espécimes estudados. No período avaliativo em questão (90 dias) não foi possível estabelecer uma comparação sobre o aspecto degradação, todos os tratamentos apresentavam biomaterial remanescente sem diferença significativa entre eles.

Gomi *et al.* (1993) mostraram a presença de células multinucleadas na interface hidroxiapatita e osso depois da implantação, que podem ser caracterizadas morfológicamente como osteoclastos, responsáveis pela biodegradação da hidroxiapatita, assim como Hemmerle *et al.* (1997) e Borges (1998) encontraram cristais de hidroxiapatita separados e espalhados em citoplasma de células com fatores ultraestruturais semelhantes a macrófagos, o que é esperado já que o biomaterial em questão é considerado de degradação lenta. No presente experimento a presença deste tipo celular não foi expressiva, devido ao período de avaliação contemplar mais as fases inflamatória e

proliferativa em detrimento da fase de remodelação que cursa com maior atividade osteoclástica.

Li *et al.* (1995) e Edwards *et al.* (1997) observaram que a reabsorção celular de grânulos de hidroxiapatita ocorre concomitantemente com a formação adjacente de osso novo, o que também foi percebido, uma vez que as fases do processo de reparação se interpõem, devido a vários fatores que tanto podem acelerar ou prolongar o processo, como condição clínica do paciente, tipo de falha óssea, implante e técnica empregadas.

Geesink & Hoefnagels (1995), em implantes de hidroxiapatita colocados no fêmur de cães, observaram após seis semanas de pós-operatório tecido periosteal, osteoblastos e osteócitos maduros em contato com a hidroxiapatita, sem interferência de tecido fibroso. No trabalho aqui discutido o implante foi fixado junto ao endósteo mediante afastamento do periôsteo, mas de forma análoga aos achados dos autores não ocorreu interferência de tecido fibroso, mostranto uma boa adesão celular do enxerto.

Nos estudos de Borges (1998), tecido fibrovascular circundando a HA e tecido ósseo novo na região endosteal foram vistos no oitavo dia após o implante, tanto no grupo-controle como no tratado. O pesquisador observou a evolução da reparação óssea e aos 120 dias, que o defeito possuía característica de osso normal. O exame histológico revelou, em alguns casos, reação tipo corpo estranho caracterizada por células gigantes, macrófagos e presença de tecido conjuntivo ao redor da HA. Neste estudo não ficaram explícitas reações do tipo corpo estranho aos diferentes biomateriais empregados.

Para Bose & Tarafder (2012) e Santos *et al.* (2012), as partículas inorgânicas das biocerâmicas têm relação cálcio e fósforo muito próxima aquela dos ossos, o que acaba deixando o enxerto com alta dureza, tornando os ossos nos quais foram implantados mais quebradiços. No que diz respeito ao teste de dureza, aos 60 dias de pós-operatório os tratamentos bonefill® sem PRP e bio-oss® sem PRP apresentaram as maiores médias para a variável dureza, de forma significativa estatisticamente, mostrando que a adição de PRP aos tratamentos causou uma dureza menor as neoformações. Já aos 90 dias de pós-operatório não houve diferente estatística entre os diferentes tratamentos no quesito dureza.

De acordo com Bonan *et al.* (2014), por possuir resistência mecânica baixa e alta fragilidade, a utilização da HA isolada torna-se restrita apenas a áreas que exigem pouco esforço mecânico e, por esse motivo são realizadas associações da HA com outros materiais como zircônia, alumina, titânio e biovidro para melhora das propriedades biomecânicas dos biomateriais. Reiterando, foi observado que a associação dos biomateriais com o PRP diminuiu suas respecivas durezas.

Segundo Einhorn (1998), o mecanismo de calcificação envolve a atividade mitocondrial que contém grânulos de cálcio, criando hipóxia no local da fratura. Depois de preparar o citoplasma, os condróцитos do calo da fratura e os grânulos de cálcio são transportados para a matriz extracelular onde se precipitam com o fosfato e iniciam a formação de depósitos minerais. Esses depósitos de cálcio e fosfato se agrupam e formam cristais de apatita. O pico de formação do calo rígido é atingido geralmente em 14 dias em modelos animais, conforme definido pela histomorfometria de tecido mineralizado, mas também pela mensuração de marcadores de matriz extracelular, como o colágeno tipo I, osteocalcina, fosfatase alcalina e osteonectina. Aos 60 dias de pós-operatório os tratamentos bonefill® sem PRP e bio-oss® sem PRP apresentaram as maiores médias para a variável dureza, de forma significativa estatisticamente, o que sugere que o emprego do PRP tenha influenciado negativamente a deposição de minerais, uma vez que a dureza óssea é conferida principalmente pela presença de cálcio e fosfato.

Basilio & Lacerda (2018) relataram um caso clínico de tratamento na região posterior da maxila de enxerto em seio maxilar utilizando hidroxiapatita (HA) sintética versus xenoenxerto (bio-oss®) acompanhado de L-PRF (fibrina rica em plaquetas e leucócitos) com o objetivo de instalar implantes dentais e posterior análise clínica e histológica da neoformação óssea. Os biomateriais utilizados no caso clínico foram selecionados por suas características físico-químicas, com granulação 0,25mm a 1,00mm e de baixa cristalinidade. Estas características dos biomateriais proporcionaram sua substituição gradual por tecido ósseo e uma regeneração óssea adequada, além de promoverem a osseocondução para a formação de novo osso em contato íntimo com o biomaterial, observado na histologia, o que também ocorreu neste trabalho, no qual foi empregada

granulometria de 0,25 – 1mm e 0,6 – 1,5mm, para o bio-oss® e bonefill®, respectivamente.

Andrade *et al.*, (2007) consideram um fator importante a ser levado em consideração o qual sustenta a ideia de melhor reparação óssea nos tratamentos com PRP é o incremento no reparo dos tecidos moles que revestem defeitos ósseos tratados com enxerto e PRP, o que devido a metodologia empregada não pode ser considerado, em função de tratar-se de um crescimento ósseo guiado isolado dos tecidos moles adjacentes.

Uma forma complementar para a determinação ou não do benefício do PRP para a aceleração do processo de regeneração óssea seria o acompanhamento radiográfico, bem como a verificação da expressão dos fatores de crescimento PDGF-B e TGF- β , assim como Souza (2010) que avaliou a cicatrização óssea de fraturas experimentais em cães tratados com PRP, observando maior expressão destes fatores.

Para Mandelli (2010), o emprego do PRP representa um dos grandes avanços na cirurgia reconstrutiva, uma vez que oferece acesso aos fatores de crescimento com uma tecnologia simples e acessível, o que foi comfirmado neste experimento. Além disso, PRP apresenta capacidade de formar um gel biológico no qual pode ser acrescido o enxerto, estabilizando o coágulo, de modo a funcionar como um adesivo, o que de fato foi observado durante os procedimentos cirúrgicos deste estudo.

Nas análises histomorfométricas, ao avaliar o tipo III (tecido ósseo maduro), no período 60 dias não houve diferença estatística da associação entre o biomaterial com a presença ou ausência de PRP para as variáveis área e porcentagem, discordando de Torres *et al.* (2009) que realizaram um ensaio clínico randomizado de enxertia em cavidade oral com um grupo controle com bio-oss® e um grupo de teste bio-oss® com PRP, no qual os resultados indicaram que o PRP poderia melhorar a osteocondutividade e as propriedades do biomaterial, aumentando o novo osso formado. Todavia, foram encontradas diferenças estatísticas entre os três biomateriais estudados.

Os resultados obtidos diferem daqueles encontrados por Pontes (2020) que realizou pesquisa cujo objetivo foi analisar histomorfometricamente alvéolos dentários humanos pós-extração tratados com fibrina autóloga, fosfato de cálcio

bifásico ou uma associação de ambos. Foram testados diferentes tratamentos: preenchimento com fibrina autóloga na forma de *plug* recoberto por membrana de fibrina (G1), fibrina associada a enxerto aloplástico a base de hidroxiapatita e beta fosfato tricálcio recobertos por membrana de colágeno (G2) ou enxerto aloplástico a base de beta fosfato tricálcio recoberto por membrana de colágeno (controle). A avaliação histomorfométrica de cada amostra foi baseada em três microtomias e dez campos histológicos por microtromia, sendo analisada a média e o desvio padrão de osso neoformado, tecido conjuntivo, biomaterial remanescente e outras estruturas, a semelhança do estudo aqui apresentado. Em seus achados concluíram um melhor padrão de regeneração óssea com uso de fibrina.

Aos 60 dias, o biomaterial que apresentou a maior área foi o bio-oss®, já os biomateriais bonefill® e HA apresentaram resultados semelhantes. Quando comparada a porcentagem, o biomaterial bonefill® apresentou resultado semelhante ao bio-oss®. Estes resultados diferem dos de Statkiewicz (2022) que comparando através de análise histométrica e imunoistoquímica o comportamento dos biomateriais bonefill®, bio-oss® e do osso autógeno na enxertia de seios maxilares de humanos, encontrou maior formação de osso maduro com o emprego do bonefill®.

Já aos 90 dias, a associação entre os três biomateriais e a presença/ausência de PRP não apresentou diferença estatística ($p<0,05$). O tratamento que apresentou o pior resultado, tanto para a variável área quanto para a variável percentagem, foi o HA sem PRP, concordando com Penteado & Colombo (2013) que testaram o uso de VB - uma cerâmica com óxido de silício associado a PRP na calvária de 10 coelhos, sugerindo que o PRP carreando fatores de crescimento como PDGF, TGF-β, VEGF, IGF-I entre outros seja de fundamental importância para estimular a diferenciação osteogênica local. Os demais tratamentos apresentaram resultados estatisticamente semelhantes.

Com base no teste de comparação das medianas dos seis tratamentos avaliados (biomaterial + PRP), o tratamento bonefill® com PRP apresentou o menor valor para a variável NTO, discordando de Torres *et al.* (2009). Os demais tratamentos apresentaram valores estatisticamente iguais para a variável NTO.

Em relação aos resultados dos tratamentos aos 90 dias somente foi observada a presença de biomaterial remanescente no tratamento com PRP. Comparando bonefill® aos tratamentos com HA e bio-oss® a presença de osteoblastos e osteócitos foi menos evidente com o bonefill® tanto com como sem o PRP. Para a variável OP, o tratamento que apresentou maior proporção de osso primário foi bio-oss® sem PRP. A semelhança dos achados nos tratamentos com HA e bio-oss®, no tratamento com o biomaterial bonefill® acrescido por PRP, foi marcante a presença de tecido mieloide. Esses achados indicam que neste estudo a associação do PRP aos biomateriais não contribuiu para uma regeneração mais rápida, discordando dos autores Claudino & Alves (2019) que em sua pesquisa concluíram que o plasma rico em plaquetas atua como um fator de crescimento para enxertos ósseos.

Através dos estudos de histomorfometria foi possível observar comparativamente entre as imagens obtidas que nas imagens aos 60 dias, o tratamento sem PRP evidenciou maior presença de conjuntivo e/ ou ósseo imaturo (coloração vermelha). Já nas imagens de 90 dias, o grupo sem PRP evidenciou maior crescimento ósseo (verde), em detrimento do com PRP, em consonância com os estudos de Vargas (2018) que concluiu que a aplicação do PRP não apresentou influência no crescimento ósseo quando comparado ao mesmo biomaterial associado ao coágulo.

7 CONCLUSÕES

O delineamento e o modelo experimental adotados permitiram a promoção do crescimento ósseo guiado em calvárias de coelhos para a comparação de diferentes tratamentos.

O acréscimo do plasma rico em plaquetas aos diferentes biomateriais (HA, bio-oss® e bonefill®) não promoveu melhora no processo de reparação óssea, levando a uma maior formação de tecido adioiso, menor formação de tecido ósseo e piora na infiltração celular entre os poros dos biomateriais.

Na avaliação aos 60 dias a adição de plasma rico em plaquetas causou menor dureza das neoformações ósseas. Entretanto não houve diferença na dureza aos 90 dias de pós-operatório entre os tratamentos com e sem PRP.

Com relação aos diferentes biomateriais, na comparação entre si, sem PRP, o que proporcionou maior percentual de osso neoformado mediante as análises empregadas, no período de 90 dias foi o bio-oss®.

Sobre a variável biomaterial remanescente o estudo não evidenciou diferenças significativas, muito embora para esta a comparação, que diz respeito a absorção dos biomateriais são necessários experimentos com períodos mais prolongados de avaliação.

O mercado de biomateriais está em constante expansão, tendo em vista o avanço tecnológico, no sentido de atender as demandas da população e dos animais geriátricos, promovendo a longevidade. O padrão de vida de países emergentes como o Brasil tem a necessidade de viabilizar ainda mais o acesso a tratamentos cirúrgicos envolvendo a reparação óssea, inclusive para animais domésticos, de companhia, exposição, competição ou reprodução. Diante da carência desse tipo de produto no segmento veterinário e do agronegócio, é importante expandir os horizontes para atender esse mercado que cresce de forma tão exponencial.

REFERÊNCIAS

- AGHALOO, T. L.; MOY, P. K.; FREYMILLER, E. G. **Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study.** J Oral Maxil Surg, V. 60, P. 1176-1181, 2005.
- AI-AQL, Z. S; ALAGL, A. S.; GRAVES, D. T. **Molecular Mechanisms Controlling Bone Formation during Fracture Healing and Distraction Osteogenesis.** J. Dent. Res. February; V. 87(2): 107–118, 2008.
- AKASAWA, T.; KOBAYASSHI, M. **Surface characteristics of hydroxyapatite controlling albumin adsorption behavior.** Journal of Materials Science Letters. V. 15, P. 1319-1320, 1996.
- AKERS, R. M.; DENBOW, D. M. **Integumentary system. In: Anatomy and Physiology of Domestic Animals**, Blackwell Publishing Asia, Australia, P. 117–132, 2008.
- ALMEIDA, R. S.; RIBEIRO, I. I.; SILVA, M. H. **Avaliação da fase inicial do reparo ósseo após implantação de biomateriais.** Revista de Ciências Médicas e Biológicas, V. 13, N. 3, P. 331-336, 2014.
- ALOUISE, A.C.; PELEGRINE, A. A.; ZIMMERMANN, A. M.; OLVEIRA, R.; FERREIRA, L. M. **Repair of critical-size bone defects using bone marrow stem cells or autogenous bone with or without collagen membrane: A histomorphometric study in rabbit calvária.** Int J Oral Maxillofac Implants.; V. 30(1), P. 208-215, 2015. 460. 1995.
- ALVES, L. C. **Avaliação histomorfométrica do reparo ósseo após levantamento de soalho de seio maxilar em humanos, utilizando enxerto autógeno associado a xenógeno (BONEFILL).** 2005. 104 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2005.37>.
- ANDIA, I. **New insights into and novel applications for platelet-richfibrin therapies.** Biotechnology. V.24. N.5. May, 2006.
- ANDRADE, A. P.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório, criação e experimentação.** (on line) Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002, 388 p. ISBN 978-85-7542-386-9 <<http://books.scielo.gov>>.
- ANDRADE, M. G. S.; DANTAS, D. B.; SADIGURSKY, M. Efeitos biológicos do plasma rico em plaquetas. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, [S. I.], v. 6, n. 2, p. 204–213, 2007.

ANITUA, E. **Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants.** J Oral Maxillofac Implants, Jul-Aug; V. 14(4), P. 529-35, 1999.

ARAKAKI, N.; KAWAKAMI, S.; NAKAMURA, O. **Evidence for the presence of an inactive precursor of human hepatocyte growth factor in plasma and sera of patients with liver diseases.** Hepatology, V. 22, P. 1728-1734, 1995.

ARISTIZABAL, L. P; CASTRO, J. A. V.; CASTRO, M. I. V. **Avaliação histológica e por microscopia eletrônica de varredura da biocerâmica de fosfato de cálcio nano-estruturada micromacro porosa em grânulos em defeito crítico de rádio de coelhos.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.69, n.6, p.1539-1550, 2017.

ARTZI, Z. **Histopathological Morphometric Evaluation of 2 Different Hydroxyapatite-Bone Derivatives in Sinus Augmentation Procedures: A Comparative Study in Humans.** Journal of periodontology. V. 72. P. 911-920. Julho 2001.

AZEVEDO, A. G.; STRECKER, K.; GORGULHO, H. F. **Effect of temperature in process of sintering of hydroxyapatite powders.** Cerâmica, V. .61, N. 357, São Paulo Jan./Mar, 2015.

BAGAMBISA, F. **Preliminary studies on the phenomenological behaviour of osteoblasts cultured on hydroxyapatite ceramics.** Biomaterials, V. 11, P. 50-56, 1990.

BAIS, M. V.; WIGNER, N.; YOUNG, M. **BMP2 is essential for post natal osteogenesis but not for recruitment of osteogenic stem cells.** Bone, V. 45, P. 254-266, 2009.

BARRIONUEVO, D.V.; LAPOSY, C.B.; ABEGÃO, K.G. **Comparison of experimentally-induced wounds in rabbits treated with different sources of platelet-rich plasma.** Lab. Anim., v.49, p.209-214, 2015.

BASILIO, J. C.; LACERDA, E. J. R. **Análise Histológica de Levantamento de Seio Maxilar Utilizando Biomaterial Xenógeno Versus Sintético + L-Prf (Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos).** Research, Society and Development, v. 10, n. 12, 2018.

BAUER, T.; MUSCHLER, G. F. **Bone Graft Materials: An Overview of the Basic Science.** Clinical Orthopaedics and Related Research: V. 371, P. 10-27, 2000.

BENKE, D.; OLAH, A.; MOHLER, H. **Protein-chemical analysis of Bio-Oss bone substitute and evidence on its carbonate content.** Biomaterials, V. 22, P. 1005 -1012, 2001.

BERGLUNDH, T.; LINDHE, J. **Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss®. An experimental study in the dog.** Clinical oral implants research. V. 8, P. 117-124, 1997.

BOECK-NETO, R. J.; GABRIELLI, M. F. R.; LIA, R. C. C.; MARCANTONIO, E. SHIBLI, J. A. **Histomorphometrical Analysis of Bone Formed After Maxillary Sinus Floor Augmentation by Grafting With a Combination of Autogenous Bone and Demineralized Freeze-Dried Bone Allograft or Hydroxyapatite.** Journal of periodontology, V. 73, P. 266-270, 2002.

BOLANDER, M. E. **Regulation of Fracture Repair by Growth Factors.** Experimental Biology and Medicine, June 1, 1992.

BONAN, R. F.; BONAN, P. R. F.; BATISTA, A. U. D.; OLIVEIRA, J. E.; MENEZES, R. R.; MEDEIROS, E. S. **Métodos de reforço microestrutural da hidroxiapatita.** Cerâmica, V. 60, N. 355, P. 402-410, 2014.

BORIE, E.; FUENTES, R.; DEL SOL, M. **The influence of FDBA and autogenous bone particles on regeneration of calvaria defects in the rabbit: a pilot study.** Clin Oral Implants Res. V.193, P. 412-7, 2001.

BORGES, A.P.B. **O efeito da hidroxiapatita sintética na regeneração óssea de defeito provocado experimentalmente no terço proximal da tíbia, de cães (Canis familiars). Estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico por microscopia de luz e microscopia eletrônica de retrodispersão.** Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1998. 112p. (Tese, Doutorado).

BOSE, S.; TARAFDER, S. **Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review.** Acta biomaterialia, 8 4, 1401-21, 2012.

BOSTROM, M.; LANE, J. H.; TOMIN, E.; BRWNE, M.; BERBERIAN, W.; TUREK, T.; SMITH, J.; WOZNEY, J.; SCILDHAUER, T. **Use of morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar nonunion model.** Clinical Orthopaedics, Philadelphia, N. 327, P. 272-282, 1996.

BOYNE, P. J.; SHABAHANG, S. **An Evaluation of Bone Induction Delivery Materials in Conjunction with Root-Form Implant Placement.** International. Journal of Periodontics & Restorative Dentistry, V. 21, P. 1-11, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 158, de 4 de fevereiro de 2016. **Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 5 fev. 2016. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2016/prt0158_04_02_2016.html>

BURCHARDT, H. **The biology of bone graft repair.** Clinical Orthopaedics and Related Research, V. 31, P. 28-42, 1983.

CALLAN, D. P.; ROHRER, M. D. **Use of Bovine-Derived Hydroxyapatite in the Treatment of Edentulous Ridge Defects: A Human Clinical and Histologic, Case Report.** Journal of periodontology. V. 64, P. 575-582, 1993.

CAMARGO, N. H. A.; SOARES, C.; GEMELLI, E. **Elaboration and Characterization of Nanostructured Biocements for Biomedical Applications.** Material Research, V. 10, P.135-140, 2007.

CAMARGO, N. H. A.; CORREA, P.; GEMELLI, O. **Synthesis and Characterization of Nanocomposite HA/ α -Al₂O₃ Sol-Gel Powders for Biomedical Applications.** Advances in Science and Technology (Online), V. 87, P. 61-66, 2014.

CAMARINI, E. T.; YUKIO, I.; JACOBUCCI, F. **Utilização de Biomateriais Associados ou não ao Plasma Rico em Plaquetas em Cavidades Ósseas Cranianas. Estudo Microscópico em Cães.** Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada, vol. 6, núm. 2, maio-setembro, 2006, pp. 199-206 Universidade Federal da Paraíba Paraíba, Brasil.

CAMELO, M.; NELVINS, L. **Clinical, Radiographic, and Histologic Evaluation of Human Periodontal Defects Treated with Bio-Oss and Bio-Gide.** V. 4, P. 321-331, 1998.

CAMPOS JR., A.; PASSANEZI, E.; NAHAS, D.; GREGHI, S.L.A.; SEABRA, E.G.; BOSCO, A.F. **Técnicas combinadas para o tratamento regenerativo das lesões periodontais: associação entre enxerto ósseo neoformado, ataque ácido e cicatrização dirigida para lesões infra-ósseas e para lesão de furca classe II.** RGO, V. 38(4), P. 287-294, 1990.

CANCIAN, D.C.J. et al. **Use of BioGran and Calcitite in bone defects. Histologic study in monkeys (Cebus paella).** Int. J. Oral Maxillofac. Implants, Lombard, V. 14, N. 6, P. 859-864, Nov. / Dec. 1999.

CAO, W.; HENCH, L.L. **Bioactive materials.** Ceramics International, 22, 493-507. 1996. doi:10.1016/0272-8842(95)00126-3

CARANO, R. A.; FIRVAROFF, E. H. **Angiogenesis and bone repair.** Drug Discov Today, V. 21, P. 980-989, 2003.

CHEN, Y.; ALMAN, B. A. **Wnt pathway, an essential role in bone.** Journal of cellular biochemistry, V. 106, P. 353-362, 2009.

CHENG, H.; JIANG, W. **Osteogenic Activity of the Fourteen Types of Human Bone Morphogenetic Proteins (BMPs).** The Journal of Bone & Joint Surgery: August 2003 , V. 85, P. 1544-1552, 2003.

CHO, H. H.; KYOUNG, K. M.; SEO, M. J.; KIM, Y. J.; BAE, Y. C.; JUNG, J. S. **Overexpression of CXCR4 increases migration and proliferation of human adipose tissue cells, Stem Cells Development.** Larchmont, V.15, N.6, P.853-864, 2006.

CHO, B.H.; IM, C.J.; HUH, J.Y.; SUH, J.J.; LEE, S.H. **Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft.** International Journal of Oral And Maxillofacial Surgery, Copenhagen, V. 33, P. 56–59, 2004.

CLAUDINO, J.; LEVY, A. C. A. **Biomateriais: uma realidade para as cirurgias de enxerto em Odontologia - revisão da literatura.** Curso de Odontologia da Universidade Paulista, Sorocaba-SP, Brasil; Curso de Odontologia da Universidade Paulista, São Paulo-SP, Brasil, 2019.

CLOKIE, C. M.L. et al. **Closure of Critical Sized Defects With Allogenic and Alloplastic Bone Substitutes.** J Craniofac Surg. V.13, P. 111-121, 2002.

COCCO, R. **Metabolismo das plaquetas.** 2006. 7 f. Seminário apresentado na disciplina de Bioquímica do Tecido Animal, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2016.

CONSOLARO, A. **Onde devemos analisar o reparo ósseo após a colocação de enxertos particulados em cavidades ósseas cirúrgicas.** Dental Press Implantology. V. 7, P. 30-42, 2013.

CONSTANTINEUSCU, G. M. **Clinical Anatomy for Small Animal Practitioners.** 1. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 381p, 2002.

COSTA A. C. F. M; LIMA M. G; LIMA L. H. M. A. 1; CORDEIRO V. V. 1; VIANA K. M. S. 1; SOUZA C.V. 1; Lira H. L. 1 www.dema.ufcg.edu.br/revista
Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. Revista Eletrônica de Materiais e Processos, V.4.3, P. 29-38, 2009.

CROCI, A.T., CAMARGO, O.P., BITAR, G.; PEREIRA, S.L.B.; MOREIRA, M.; FREITAS Jr., S. **Effect of plasma concentrate on bone defects induced in mice fémurs via stimulation of bone formation: an experimental study.** Acta Ortopédica Brasileira, São Paulo, v. 11, n. 4, p. 230-239, Oct./Dec. 2003.

DACULSI, G.; PASSUTI, N.; MARTIN, S.; DEUDON, C.; LEGEROS, R. Z.; RAHER, S. **Macroporous calcium phosphate ceramic for long bone surgery in humans and dogs. Clinical and histological study.** Journal of Biomedical Materials Research. V. 24, P. 379-396, 1990.

DAHLIN C, GOTTLLOW J, NYMAN S. **Healing of bone defects by guided tissue regeneration.** Plast Reconstr Surg 1988.

DALLABRIDA, A.L.; CAMARGO, N. H. A.; MOARAES, A. N.; GAVA, A.; DALMÔNICO, G. M. L.; COSTA, B.; OLESKOVICZ, N. **Caracterização de biocerâmica de fosfatos de cálcio microestruturada em diferentes composições em ovinos.** Pesquisa Veterinária Brasileira. V. 38, P. 1327-1336, 2018.

DALMÔNICO, G. M. L.; SILVA, D. F.; FRANCZAK, P. F.; CAMARGO, N. H. A. **Elaboração de pós nanoestruturados bifásicos de fosfato de cálcio.** Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio. V. 54. P. 37- 43, 2015.

DALMÔNICO, G. M. L.; FRANCZAK, P. F.; LEVANDOWSKI JR.; N.; CAMARGO, N. H. A; DALLABRIDA, A. L.; COSTA, B. D.; GARCIA GIL, O.; CAMBRA-MOO, N.; RODRIGUES, M. A.; CANILHAS, M. **Estudo in vivo sobre o comportamento da formação óssea de fosfato de cálcio granular microporoso.** Ciência dos Biomateriais. V. 5, P. 1315-1325, 2017.

DAVIES, J.E., BALDAN, N. **Scan. electron microscopy of the bone-bioactive implant interface.** J. Biomed. Mater. Res., V. 36, P. 429-440, 1997.

DEDAVID, B. A. **Microscopia eletrônica de varredura – aplicações e preparações de amostras,** 2007.

DENISSEN, H.W., GROOT, K. **Immediate dental root implants from synthetic dense calcium hydroxyapatite.** J. Prosth Dent., V. 42, P. 551-555, 1990.

DIAMANTINO, A. G., NICOLAU, R. A., COSTA, D. R. **Effect of non-coherent infrared light (LED, $\lambda 945 \pm 20$ nm) on bone repair in diabetic rats—morphometric and spectral analyses.** Lasers Med Sci, V. 32, P. 1041–1049, 2017.

DILIBERTO, P. A.; GORDON, G. W. **Platelet-derived growth factor (PDGF) alpha receptor activation modulates the calcium mobilizing activity of the PDGF beta receptor in Balb/c3T3 fibroblasts.** The Journal of Biological Chemistry, V. 267, P. 11888-11897, 1992.

DIMITRIOU, R.; ELEFTHERIOS, T. **Current concepts of molecular aspects of bone healing.** Injury, V. 36, P. 1392-1404, 2005.

DINATO, J. C.; NUNES, L. S. S.; SMIDT, R. **Técnicas cirúrgicas para regeneração óssea viabilizando a instalação de implantes.** In: SABA-CHUFJI, E.; PEREIRA, S. A.S. (Org.). CIPE - Periodontologia: Integração e resultados. São Paulo: Artes Médicas, 2007. p.183-226.

DODGE, I. I. R.; YAVUZER, B.; LAKADRI, A.; JACKSON, I. T. **Spontaneous bone healing in the rabbit.** J. Craniofasc Surg, V 11(4), P. 346-349, 2000.

DONATH, K. **Reaction of tissue to calcium phosphate ceramics.** In: HEIMKE, G. **Osseointegrated implants.** New York: CRC Press, 1990, P.99-125.

EDWARDS, J.T., BRUNSKI, J.B., HIGUCHI, H.W. **Mechanical and morphologic investigation of the tensile strength of a bone-hydroxyapatite interface.** J. Biomed. Mater. Res., V.36, P. 454-468, 1997.

E'GUES, M. A. 2005. **Compósito de colágeno com silicato e hidroxiapatita como material para endodontia.** 2005. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

EINHORN, T. A.; LANE, J. M.; BURSTEIN, A. H.; KOPMAN, C. R. **The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix.** A radiographic and biomechanical study. The Journal of Bone and Joint surgery, V. 31, P. 274-279, 1984.

EINHORN, T. A. **The Cell and Molecular Biology of Fracture Healing.** Clinical Orthopaedics and Related Research, V. 355, P. S7-S21, 1998.

ELGALI, I.; TURRI, A. **Guided bone regeneration using resorbable membrane and different bone substitutes: Early histological and molecular events.** Acta Biomaterialia, V. 29, P. 409-423, 2016.

EVERTS, P.; ONISHI, K.; JAYARAM, P.; LANA, J.F.; MAUTNER, K. **Platelet-Rich Plasma: New Performance Understandings and Therapeutic Considerations in 2020.** International Journal of Molecular Sciences. V. 29, 2020.

EZIRGANLI, S.; KAZANCIOGLU, H. O. **Effects of different biomaterials on augmented bone volume resorptions.** Clinical oral implants research, V. 26, P. 1482-1488, 2015.

FABI S, SUNDARAM H. **The Potential of topical and injectable growth factors and cytokines for skin rejuvenation.** Facial Plastic Surgery. New York, v. 30, n. 2, p.157-71, mai. 2014.

FERNANDEZ, E; GINEBRA, M.P. **Calcium phosphate bone cements for clinical applications- part II.** Journal of Materials Science - Materials in Medicine V. 10, P. 177183, 1999.

FERREIRA, J. R. M. **Enxertos ósseos xenógenos utilizados na implantodontia oral.** Revista Implantnews, V. 4, N. 3, P. 303-306, 2007.

FINNDIKCIOGLU, K.; FINNDIKCIOGLU, F.; YAVUZER, R. **Effect of Platelet-Rich Plasma and Fibrin Glue on Healing of Critical-Size Calvarial Bone Defects.** Journal of Craniofacial Surgery, V 20, P. 34-40, 2009.

FLORES J.R., GALLEGOS M.A.P., GARCÍA-DENCHE J.T.. Plasma rico en plaquetas: fundamentos biológicos y aplicaciones en cirugía maxilofacial y estética oral. Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial Barcelona, v. 34, n. 1, p. 8-17, mar. 2012.

FORELL, E. B.; STRAW, R. C. **Bone morphogeneticproteins and bone derived growth factors.** Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology, Stuttgart, V.6, P.166-171, 1993.

FOSSUM. Cirurgia de pequenos animais. 2^a ed. São Paulo: Roca, 2005. 107p.

FRAME, J. W. **A convenient animal model for testing bone substitute materials.** Journal of Oral Surgery, V. 29, P. 176-180, 1980.

FROST, H. M. **The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part II.** Clinical Orthopaedics and Related Research, V. 31, P. 294-309, 1989.

FROUM, S. J.; WALLACE, S.S.; SANG-CHOON, C.; NICOLAS, E. **Histomorphometric Comparison of a Biphasic Bone Ceramic to Anorganic Bovine Bone for Sinus Augmentation: 6- to 8-Month Postsurgical Assessment of Vital Bone Formation. A Pilot Study. International.** Journal of Periodontics & Restorative Dentistry. V. 28, P. 272-281, 2008.

FULMER, M. T.; M, MARTINR. I.; BROWN, P. W. **Formation of Calcium deficient Hidroxyapatite at near-physiological temperature.** Journal of Materials Science: Materials in Medicine, V. 3, P. 299-305, 1992.

FURUSAWA, T.; MIZUNUMA, K. **Osteoconductive properties and efficacy of resorbable bioactive glass as a bone-grafting material.** Implant Dentistry, V. 31, P. 93-101, 1997.

GARG, A. K.; GARGENESE, D.; PEACE, I. **Using platelet-rich plasma to develop an autologous membrane for growth factor delivery in dental implant therapy. Dental Implantology Update.** The International Forum for Continuing Education, V. 11, P. 41-44, 2000.

GENTILE, P.; GARCOVICH, S. **Systematic Review—The Potential Implications of Different Platelet-Rich Plasma (PRP) Concentrations in Regenerative Medicine for Tissue Repair.** International Journal of Molecular Sciences. V. 21, 2020.

GEESINK, R. G.; HOEFNAGELS, N. H. **Six-year results of hydroxyapatite-coated total hip replacement.** The jurnal of bone and joint surgery, V. 77, 1995.

GEMELLI, E.; FRANCO, C. J.; CAMARGO, N. H. A. **Elaboração de hidroxiapatita sinterizada a alta temperatura para aplicações odontológicas.** V 25, n.4, 2020.

GERSTENFELD, L. C.; ALKHIARY, Y. M. **Three-dimensional Reconstruction of Fracture Callus Morphogenesis.** Journal of Histochemistry & Cytochemistry, V. 54, P. 1215-1228, 2006.

GERSTENFELD, L. C. **Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation.** Journal of cellular biochemistry, V. 88, P. 873-884, 2003.

GINEBRA, M. P.; ESPANOL, M.; MONTUFAR, E. B. **New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine.** Acta Biomaterialia, V. 6, P. 2863-2873, 2010.

GOMI, K., LOWENBER, B, SHAPIRO, G.E. et al. **Resorption of sintered synthetic hydroxyapatite by osteoclasts "in vitro".** Biomaterials, V.14, P. 91-96, 1993.

GRANERO-MOLTO, F.; WEIS, J. A.; MIGA, M. I.; LANDIS, B. **Regenerative Effects of Transplanted Mesenchymal Stem Cells in Fracture Healing.** Stem cells, V. 27, P. 1887-1898, 2009.

GRANJEIRO, J. M.; TAGA, E. M.; FONSECA, M. A. **Hidroxiapatita para uso clínico: caracterização físico-química / Hydroxyapatite for clinical use: physicochemical characterization.** RGO (Porto Alegre) ; 40(2): 130-4, mar.-abr. 1992.

GREGHI, S. L. A.; CAMPOS JR, A. **Estudo comparativo de biocompatibilidade de materiais cerâmicos diversos em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos.** Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru, Bauru, V. 2, N. 4, P. 73-81, 1994.

GUASTALDI, A. C.; HERRERA, A. **Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos.** Quím. Nova, V.33, N.6, 2016.

GUO, J.; MENG, Z.; CHEN, G. **Restoration of critical-size defects in the rabbit mandible using porous nanohydroxyapatite-polyamide scaffolds.** Tissue Eng Part A. V. 18, P. 1239-52, 2012.

GUPTA, D.; KHANNA, S.; TULI, S. M. **Bridging large bone defects with a xenograft composited with autologous bone marrow. An experimental study.** Int Orthop. V. 6, P. 79-85, 1982.

GUTWALD, R.; HABERSTROH, J.; KUSCHNIERZ, J. **Mesenchymal Stem Cells And Inorganic Bovine Bone Mineral In Sinus Augmentation: Comparison With Augmentation By Autologous Bone In Adult Sheep.** British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, V. 48, N. 4, P. 285-290, 2010.

HADDAD, A.J.; PELL, S. A.; CLOKIE, C. M.; SANDOR, G. K. **Closure of rabbit calvarial critical-sized defects using protective composite allogeneic and alloplastic bone substitutes.** Clin Oral Implants Res. V. 17, P. 926-934, 2006.

HALLMAN, M.; SENNERBY, L.; LUNDGREN, S. A clinical and histologic evaluation of implant integration in the posterior maxilla after sinus floor augmentation with autogenous bone, bovine hydroxyapatite, or a 20:80 mixture. J Oral Maxillofac Implants, V. 17, P. 635-643, 2002.

HARUN, W. S. W.; ASRIA, R. I. M.; ALIASC, F. H. **A comprehensive review of hydroxyapatite-based coatings adhesion on metallic biomaterials.** Ceramics International, V. 44, N. 2, P. 1250-1268, 2018.

HEIKKILA, J., AHO, A.J., YLI-URPO, A. **Bioactive glass versus hydroxylapatite in reconstruction of osteochondral defects in rabbit.** Acta Orthop. Scand., V. 64, P. 678-682, 1993.

HELDIN, C. H.; WESTERMARK, B. **Mechanism of Action and In Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor.** Physiological reviews, V. 79, P. 1283-1316, 1999.

HEMMERLE, J.; ONÇAQ, A; ERTURK, S. **Ultrastructural features of the bone response to a plasma-sprayed hydroxyapatite coating in sheep.** Journal of Biomedical Materials Research, V. 36, P. 418-425, 1997.

HWANG, K.; LIM, Y. **Chemical and structural changes of hydroxyapatite films by using a solgel method. Surface and Coatings. Technology,** V. 115, P. 172-175, 1999.

JANG HY; KIM HC; LEE SC; LEE JY. **Choice Of Graft Material In Relation To Maxillary Sinus Width In Internal Sinus Floor Augmentation.** J Oral Maxillofac Surg. 2010; 68(8):1859-68.

JENSEN, T.; SCHOU, S.; STAVROPOULOS, A. et al. **Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as**

graft in animals: a systematic review. Int J Oral Maxillofac Surg. V. 12, P. 345-52, 2011.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica.** 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KASSOLIS, J. D.; ROSEN, P. S.; REYNOLDS, M. A. **Alveolar Ridge and Sinus Augmentation Utilizing Platelet-Rich Plasma in Combination With Freeze-Dried Bone Allograft: Case Series.** Journal of periodontology, V. 71, P. 1654-1661, 2000.

KATTI, K. S. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.** Volume 39, Issue 3, 10 December 2004, Pages 133-142, 2004.

KATTHAGEN, B.; MITTELMEIER, H. **Experimental animal investigation of bone regeneration with collagen-apatite.** Arch. Orth. Traum. Surg. V., P. 291–302, 1984.

KERAMARIS, I. C.; CALORI, G.M.; NIKOLAOU, V. S., SCHENUTSCH, E. H.; GIANNoudis, P. V. **Fracture vascularity and bone healing: A systematic review of the role of VEGF.** Injury, V. 39, Supplement 2, P. 45-57, 2008.

KIM, Y. K.; YUM, P. Y.; KIM, S. G. et al. **Analysis of the healing process in sinus bone grafting using various grafting materials.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. V. 107, P. 204-211, 2009.

KIM, J.; LEE, K. B.; KIM, M. K. et al. **Bone Regeneration in a Rabbit Critical-Sized Calvarial Model Using Tyrosine-Derived Polycarbonate Scaffolds.** Tissue Eng Part A. V. 18, P. 1132-9, 2012.

KIM. Y.J.; SAIKI, C.E.T.; SILVA, K.; MASSUDA, C.K.M.; FALONI, A.P.S.; BRAZ-SILVA, P.H.; PALLOS, D.; SENDYK, W.R. **Bone Formation in Grafts with Bio-Oss and Autogenous Bone at Different Proportions in Rabbit Calvaria.** International Journal of Dentistry V. 26, 2020.ID 2494128, 6 pages <https://doi.org/10.1155/2020/2494128>

KIRKER-HEAD, C. A.; GERAHART, T. N.; SCHELLING, S. H.; HENNIG, G. E. **Long-term healing of bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2.** Clinical Orthopaedics and Related Research, V. 31, P. 222-230, 1995.

KITAORI, T.; ITO, H.; SCHWAARZ, E M.; TSUTSUMI, R.; YOSHITOMI, H. **Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model.** Bone Biology, V. 60, P. 813-823, 2009.

KUCI, C. C; **Neoformação óssea comparativa de biomateriais micronanoestruturados aplicados através de um sistema guiado em calvária de coelhos *Oryctolagus cuniculus*.** Dissertação de Mestrado, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages/SC, 2017.

KULAK, C.A.M., DEMPSTER, D.W., **Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians.** Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo. V. 54, n. 2, 2010.

KVETON, J. F.; FRIEDMAN, C. D.; PIEPMEIER, J. M. **Reconstruction of suboccipital craniectomy defects with hydroxyapatite cement: A preliminary report.** Laryngoscope, V. 105, P. 156-159, 1995.

LANDI, E.; LOGROSCINO, G.; PROIETTI, L. **Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: from synthesis to in vivo behaviour.** J Mater Sci: Mater Med, V. 19, P. 239–247, 2008.

LANGE, G.L., PUTTER, C., WIJS, F.L.J.A. **Histological and ultrastructural appearance of the hydroxyapatite - bone interface.** J. Biomed. Mater. Res., V. 24, P. 829-845, 1990.

LEGEROS, R. Z. **Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review.** Advances in Dental Research. V. 2, P. 164-180, 1988.

LEMOS, C.A.A.; MELLO, C.C.; SANTOS, D.M.; VERRI, F.R.; GOIATO, M.C.; PELIZZER, E.P. **Effects of platelet-rich plasma in association with bone grafts in maxillary sinus augmentation: a systematic review and meta analysis.** J. Oral Maxillofac. Surg. 2015; tp://dx.doi.org/10.1016/j.ijom.2015.07.012, available online at <http://www.sciencedirect.com>.

LEUCHT, P.; CASTILLO, A. B.; BELLINO, M. J. **Comparison of tricalcium phosphate cement and cancellous autograft as bone void filler in acetabular fractures with marginal impaction.** Injury, v. 44, p. 969–74, 2013.

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

LEVANDOWSKI-JR, N.; CAMARGO, N.H.A; SILVA, D.F.; DALMÔNICO, G.M.L.; FRANCZAK, P.F. **Characterization of diferente nanostructured bone substitut biomaterials.** Advanced Materials Research Online: 2014-06-30 ISSN: 1662-8985, Vol. 936, pp 695-700 doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.936.695 © 2014 Trans Tech Publications, Switzerland.

LI, J., FARTASH, B., HERMANSSON, L. **Hydroxyapatite-alumina composites anb bone-bonding.** Biomaterials, V.16, P. 417-422, 1995.

LIEBERMAN, J. R.; DALUISKI, A.; ERINHORN. T. A. **The Role of Growth Factors in the Repair of Bone. Biology and Clinical Applications.** The Journal of Bone & Joint Surgery, V. 84, P. 1032-1044, 2002.

LIMA, J.L.O.; SENDYK, D.I.; SENDYK, W.R.; IBANHES, C.; CORREA, L.; DEBONI, M.C.Z. **Growth Dynamic of Allogeneic and Autogenous Bone Grafts in a Vertical Model.** Brazilian Dental Journal (2018) 29(4): 325-334
<http://dx.doi.org/10.1590/0103-6440201801994>

LIND, M. **Growth factor stimulation of bone healing.** Acta Orthopaedica Scandinavica, V. 69, DOI: 10.1080/17453674.1998.11744808, 1998.

LIU, J.; KERNS, D. G. **Mechanisms of Guided Bone Regeneration: A Review.** Open dent, V. 8, P. 56–65, 2014.

LOUISE, F., BARGHETTI, A., KEREBEL, B. in **Histologic case reports of coralline human intraosseous lesions: results 6 to 36 months postimplantation hydroxyapatite grafts placed.** Int. J. Periond., V. 12, P. 475-485, 1992.

MACNEILL, S. R.; COBB, C. M.; RAPLEY, J. W.; GLAROS, A.G. **In vivo comparison of synthetic osseous graft materials: A preliminary study.** Journal of clinical periodontology, V. 26, P. 239-245, 1999.

MANDELLI, V. E. **O uso do plasma rico em plaquetas (PRP) na cirurgia ortopédica.** Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2010.

MANFRO, R.; FONSECA, F.S.; BOROLUZZI, M.C. **Comparative, Histological and Histomorphometric Analysis of Three Anorganic Bovine Xenogenous Bone Substitutes: Bio-Oss, Bone-Fill and Gen-Ox Anorganic.** J. Maxillofac. Oral Surg. 13, P. 464–470, 2014.

MANSO, M.; LANGLET, M.; FERNANDEZ, M.; VASQUEZ, L.; MARTINEZ-DUART, J. M. **Surface and interface analysis of hydroxyapatite/TiO₂ biocompatible structures.** Materials Science and Engineering, v. 23, p. 451-454, 2003.

MARCHIOLLI, C.; MORENO, J. M. **Fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) em procedimentos de regeneração óssea guiada.** Research, Society and Development, V. 10, N. 12, 2022.

MARIEB, E. N.; MALLATT, J. **Anatomy**, Pearson Education, San Francisco, Calif, USA, 3rd edition, 2003.

MARSELL, R.; EINHORN, T. **The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair.** Injury, V. 40, P. S4-S7, 2009.

MARTINS, J. V.; PERUSSI, M. R.; ROSSI, A. C.; FREIRE, A. R.; PRADO, F. B. **Principais biomateriais utilizados em cirurgia de levantamento de seio maxilar: abordagem clínica.** Rev. Odontol. Araçatuba (Impr.) ;31(2): 22-30, jul-dez. 2010.

MAVROPOULOS, E. A. **hidroxiapatita como removedora de chumbo.** Dissertação (Mestrado). Fundação Oswaldo Cruz. Escola Nacional de Saúde Pública e Toxicologia. Rio de Janeiro, 1999.

MARX, R. E.; CARLSON, E. R.; EICHSTAEDT, R. M.; SCHIMMELE, S. R., STRAUSS, J. E.; GEORGEFF, K. R. **Platelet-rich plasma. Growth factor enhancement for bone grafts.** Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontics, V. 85, P. 638-646, 1998.

MARX, R. E. **Platelet concentrate: A strategy for accelerating and improving bone regeneration.** In: Bone Engineering. Editor: J.E. Davies, Squared Incorporated (Toronto). (2000).

MELLONG, J. T. **Human histologic evaluation of a bovine-derived bone xenograft in the treatment periodontal osseous defects.** The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry, v.20, n.1, p.19-29, 2000.

MEYER-INGOLD, W.; EICHNER, W. **Platelet-derived growth factor.** Cell Biology International, V. 19, P. 389-398, 1995.

MIKHAEL, N. W.; EL-ESAWY, F. M. Skin rejuvenation with autologous concentrated platelet-rich plasma. Egypt J Dermatol Venerol, V. 34, P 34-59, 2014.

MISCH CE. **Biomateriais utilizados em implantes dentários.** In: Misch CE, editor. Implantes dentários contemporâneos. 2. ed. São Paulo: Ed. Santos; 2000. p.271-302.

MISCH, C. E.; DIETSH, F. **Bone-grafting materials in implant dentistry.** Dec V. 2, P. 158-167, 1993.

MOUNTZIARIS, M.; MIKOS, A. G. **Tissue Engineering Part B. Reviews.** Jun V. 10, P. 179-186, 2008.

NAGAHARA, K.; ISOGAI, M. **Osteogenesis of Hydroxyapatite and Tricalcium Phosphate Used as a Bone Substitute.** International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, V. 7, P. 95-111, 1997.

NAIR, S.; NAURENCIN, C. T. **Biodegradable polymers as biomaterials.** Progress in Polymer Science, V. 32, P. 762-798, 2007.

NAJJAR, T. A. **Enhanced osseointegration of hydroxylapatite implant material.** Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, V. 71, P. 9-15, 1991.

NISHIBORI, M.; BETTS, N.; SALAMA, H. **Healing of Autogenous and Allogeneic Bone Grafts After Sinus Augmentation: A Report of 2 Cases.** Journal of periodontology, V. 65, P. 958-966, 1994.

OLIVEIRA, P. H.; SANTANA, L. A. B.; FERREIRA, N.S.; SHARIFI-ASI, S.; SHOKUHFAR, R.; SHAHBAZIAN-YASSAR, R.; DALMÔNICO, G. M. L.; WERCKMANN, J.; FARINA, M.; SANTOS, E.A. **Comportamento do manganês em cristais de hidroxiapatita revelado por diferença de raios-X mapas de Fourier.** Cerâmica Internacional. V. 46. P. 10585-10597, 2020.

OGUCHI, H., ISHIKAWA, K., MIZOUE, K. et al. **Long-term histological evaluation of hydroxyapatite ceramics in humans.** Biomaterials, V.16, P.33-38, 1995.

OSAKA, A.; MIURA, Y.; TAKEUCHI, K.; ASADA, M.; TAKAHASHI, K. **Calcium apatite prepared from calcium hydroxide and orthophosphoric acid.** Journal Materials Science. V. 2, N. 1, P. 51-55, 1991.

OVERGAARD, S., LIND, M., RAHBEK, O. et al. **Improved fixation of porous-coated versus grit-blasted surface texture of hydroxyapatite-coated implants in dogs.** Acta Orthop. Scand., V.68, P.337-343, 1997.

PALEY, D. **Percutaneous bone marrow grafting of fractures and bony defects. An experimental study in rabbits.** Clin Orthop Relat Res. V. 208, P. 300-312, 1986.

PELEGRINE, A.A.; COSTA, C. E.; CORREA, M. E. MARQUES, J. F. **Clinical and histomorphometric evaluation of extraction sockets treated with an autologous bone marrow graft.** Clin Oral Impl Res. V. 21, P. 535-542, 2010. a.

PELEGRINE, A.A.; COSTA, C. E.; SENDIK, W. R. et al. **The comparative analysis of homologous fresh frozen bone and autogenous bone graft, associated or not with autogenous bone marrow, in rabbit calvaria: a clinical and histomorphometric study.** Cell Tissue Bank. V. 12, N. 3, P. 171-184, 2010. b

PENTEADO, L. A. M., COLOMBO, C. E. D. **Evaluation of bioactive glass and platelet-rich Plasma for bone healing in rabbit calvarial defects.** J Oral Science, V. 55(3), P. 225-232, 2013.

PERREN, M. **Evolution of the internal fixation of long bone fractures.** Journal of boné and joint surgery, V. 84, N. 8, P. 1093-1110, 2002.

PETRUNGARO, P. S. **Treatment of the infected implant site using platelet-rich plasma.** Compendium of Continuing Education in Dentistry, V. 31, P. 363-370, 1995.

PETTIS, G. Y.; KABAN, L. B. **Tissue response to composite ceramic hydroxyapatite/demineralized bone implants.** Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, V. 48, P. 1068-1074, 1990.

PIATTELLI, A.; ORSINI, G.; SACARANO, A. **Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans.** J Oral Maxillofac Implants, V. 4, P. 835-840, 1999.

PIERI, F.; LUCARRELLI, E.; FINI, F. et al. **Effect of mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on the healing of standardized bone defects in the alveolar ridge: A comparative histomorphometric study in minipigs.** J Oral Maxillofac Surg. V. 67, P. 265-72, 2009. 2010.

PISSIOTIS, E., SPANGBERG, L.S.W. **Biological evaluation of collagen gels containing calcium hydroxide and hydroxyapatite.** J. Endodontics, v.16, p.468-473, 1990.

POCATELLA, A.; CARUSO, S.; BERNARDI, S.; SCAGNOLI, L.; CONTINENZA, M.A.; GATTO, R. **Effectiveness of platelet-rich plasma as an adjunctive material to bone graft: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials.** Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 2016; #

2016 International Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

PONTES, J. S. Avaliação histomorfométrica de alvéolos dentários humanos pós-extração tratados com fibrina autóloga, fosfato de cálcio bifásico ou sua associação. 2020. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Campus de Sobral, Universidade Federal do Ceará, 2020.

RANGANATH, S. K.; SCHLUND, M.; DELATTRE, J.; FERRI, J.; CHAI, F. Bilateral double site (calvarial and mandibular) critical-size bone defect model in rabbits for evaluation of a craniofacial tissue engineering constructs. Materials Today Bio. V. 14; 2022

REDDI, A. H. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. Nature Biotech, V. 16, P. 247-252, 1998.

REZENDE, C.M.F., BORGES, A.P.B., BERNIS, W.O. et al. Aspectos clínico-cirúrgicos e radiográficos da hidroxiapatita sintética na diáfise proximal da tíbia de cães. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., V.50, P.537-545, 1998.

RIGO, E. C. S.; GEHRKE, S. A.; CARBONARI, M. Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação. Revista. Dental Press Periodontia Implantol., V. 1, N. 3, P. 39-50, 2007.

ROFFI, A.; DI MATTEO. B.; KRISHNAKUMAR, G.S.; KON, E.; FILARDO, G. Platelet-rich plasma for the treatment of bone defects: from pre-clinical rational to evidence in the clinical practice. A systematic review. International Orthopaedics (SICOT) DOI 10.1007/s00264-016-3342-9.

RODRIGUES, L.B. Aplicações de biomateriais em ortopedia. Estudos Tecnológicos em Engenharia, V. 2, N. 9, P. 63-76, 2013.

ROKN, A. R.; KHODADOOSTAN, M. A. Bone Formation with Two Types of Grafting Materials: A Histologic and Histomorphometric Study. Open Dent J, V. 5, P. 96–104, 2011. Published online 2012 Jul 7. doi: 10.2174/1874210601105010096.

ROKN, A. R.; MOSLEMI, N.; ESLAMI, B. **Histologic Evaluation of Bone Healing Following Application of Anorganic Bovine Bone and β -tricalcium Phosphate in Rabbit Calvaria.** J Dent (Tehran), V. 9(1), P. 35–40, 2011. Published online 2012 Mar 31.

ROSA, A. L.; SHAREEF, M. Y.; VAN NOORT, R. **Efeito das condições de preparação e sinterização sobre a porosidade da hidroxiapatita.** Pesquisa Odontológica Brasileira, V. 14, N. 3, P. 273-277, 2000.

ROSSI, A. M.; TERRA, J.; MAVROPOULOS, E.; MOREIRA, E. L. **A ciência e tecnologia das biocerâmicas.** Revista do CBPF. Disponível em: <http://www.cbpf.br/RevistaCBPF/pdf/Bio Mat.pdf>. Acesso: maio de 2019.

SAAFELD, T. T. **Solubility behaviour of synthetic hydroxyapatites in aqueous solution: Influence of amorphous constituents on pH value.** Biomaterials, V. 15, P. 905-908, 1994.

SAKIA, Remi M. **The Box-Cox transformation technique: a review.** Journal of the Royal Statistical Society: Series D (The Statistician), V. 41, N. 2, P. 169-178, 1992.

SAKOU, S. **Bone morphogenetic proteins: From basic studies to clinical approaches.** Bone. V. 22, P. 591-603, 1998.

SALEH, J.; BASSANI, I. A.; MOKZ, R. F.; Santos, L. A. **Obtenção e avaliação de hidroxiapatita in vivo.** XVI Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2004. [Park, J. Biomaterials science and engineering. New York: Plenum.

SANTOS, C. F. L.; SILVA, A. P.; CORREIA, I. J. et al. **Design and production of sintered β -tricalcium phosphate 3D scaffolds for bone tissue regeneration.** Materials Science and Engineering C, V. 32, N.5, P. 1293-1298, 2012.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. **The biology of platelet-rich plasma.** Oral and maxillofacial surgery, V. 59, P. 1119–1120, 2001.

SILVA, L.M.; MENSEZESA, D.S.; NAVARAYAANANB, S.; SHOKUHFARB, T.; SHAHBAZIAN-YASSARB, R., G. M. L. **Counterions present in syntheses induce the precipitation of two different populations of Sr-containing hydroxyapatite crystals.** Ceramics International. V. 46, P. 4502-4510, 2020.

SOUZA, T. F. **Expressão dos fatores de crescimento obtidos do plasma rico em plaquetas, no tratamento de fraturas experimentais do radio de cães.**

2010. 73 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, 2010.

STATKIEVICZ, C. **Estudo comparativo entre o Bonefill e o Bio-Oss na enxertia óssea de seios maxilares com elevação da membrana sinusal: análise histométrica e imunoistoquímica.** Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp - Área de Concentração em Cirurgia e Traumatologia Buco-MaxiloFacial. Araçatuba - SP 2022

STOCKMAN, P.; PARK, J.; WILMOWSKY, C. et al. **Guided bone regeneration in pig calvarial bone defects using autologous mesenchymal stem/progenitor cells - A comparison of different tissue sources.** J Craniomaxillofac Surg.junho, 2011.

SU-GWAN, K., HAK-KYUN, K., SUNG-CHUL, L. **Combined implantation of particulate dentine, plaster of Paris, and a bone xenograft (Bio-Oss®) for bone regeneration in rats.** Journal of Cranio-maxillofacial Surgery, V. 29, N. 1, P. 282-288, 2001.

TAMIMI, F. M.; TORRES, J. **Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between Bio-Oss® and a novel β -TCP/DCPD granulate.** Journal of clinical periodontology, V.33, P. 922-928, 2006.

TEAM, R. Core. R language definition. **Vienna, Austria: R foundation for statistical computing,** 2000.

TEIXEIRA, L. J. C. **Potencial osteocondutor de grânulos de hidroxiapatita em defeitos críticos na calvária de ratos.** 2009. Tese (Doutorado). Duque de Janeiro, 2009.

TORRES, J.; TAMIMI, F.; MARTINEZ, P. **Effect of platelet-rich plasma on sinus lifting: a randomized-controlled clinical trial.** Journal of clinical periodontology. V. 36, P. 677-687, 2009.

TSUJI, K.; BANDYOPATHYAY, A.; HARFE, B. **BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing.** Nat Genet, V. 38, P. 1424–1429, 2006.

TUOMINEN, T.; JÄMSÄ, T.; TUUKKANEN, J.; MARTTINEN, A.; LINDHOLM, T. S.; JALOVAARA, P. **Bovine bone implant with bovine bone morphogeneticprotein in healing a canine ulnar defect.** International Orthopaedics, Berlin, V.25, N.1, P.5-8, 2001.

URIST, M.R.; DELANGE, R. J.; FINERMAN, G. A. M. **Bone cell differentiation and growth factors.** Science, Washington, V.220, N.4598, P.680-686, 1983.

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

VARGAS, C. B. **Estudo *in vivo* do comportamento e neoformação óssea de biomateriais acrescidos de plasma rico em plaquetas implantados em calvárias de coelhos.** Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina -UDESC, 2018.

VAZ, C. E. S. **Avaliação do efeito de centrifugado osteogênico de medula óssea na consolidação de fratura: estudo experimental em coelhos.** Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Área de concentração: Ortopedia e Traumatologia. 2006.

VENDRAMIN, F. S. et al. **Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica.** Revista do colégio brasileiro de cirurgiões, V. 33, N1, P. 24-28, 2006. DOI: 10.1590/0100-69912006000100007.

VIDEAU, J. J.; DUPUIS, V. **Phosphate and biomaterials.** European Journal of Solid State and Inorganic Chemistry. V. 18, N. 1, P. 303343, 1991.

VIEGAS, C. A. A.; DIAS, M. I. R.; AZEVEDO, J. M. T.; FERREIRA, A. J.; SAN ROMAN, F.; CABRITA, M. S. **A utilização de Plasma Rico em Plaquetas na regeneração do tecido ósseoalveolar e cortical. Estudos experimentais num modelo de defeito ósseoperiodontal em cão Beagle (*Canis familiaris*) e num modelo de defeito ósseocortical na ovelha (*Ovis aries*).** Revista portuguesa de Ciências Veterinária. V. 101. P. 193-213, 2006.

ZAMBONIN, G., GRANO, M. **Biomaterials in orthopaedic surgery: effects of different hydroxyapatites and demineralized bone matrix on proliferation**

rate and bone matrix synthesis by human osteoblasts. Biomaterials, V.16, P.397-402, 1995.

ZHAO, L. Comparative study between tissue-engineered periosteum and structural allograft in rabbit critical-sized radial defect model. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. V. 97, P. 1-9, 2011.

ZHANG, Jing; ZHOU, Huanjun; YANG, Kai; YUAN, Yuan; LIU. Changsheng. RhBMP-2- loaded calcium silicate/ calcium phosphate cement scaffold with hierarchically porous structures for enhanced boné tissue regeneration. Biomaterials, 34 (2013). P. 9381-9392.

ZIGDON, A.; LEWINSON, D.; MACHTEI, E. E. Mesenchymal Stem Cells and Endothelial Progenitor Cells Stimulate Bone Regeneration and Mineral Density. Journal of periodontology, V. 85, P. 984-990, 2014.

YAMAMOTO, M., KATO, K., IKADA, Y. Ultrastructure of the interface between cultured osteoblasts and surface-modified polymer substrates. J. Biomed. Mater. Res., V.37, P.29-36, 1997.

YILDIRIM, M. S. Maxillary Sinus Augmentation with the Xenograft Bio-Oss and Autogenous Intraoral Bone for Qualitative Improvement of the Implant Site: A Histologic and Histomorphometric Clinical Study in Humans. International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, V. 16, P. 23-33, 2001.

YOSHIMURA, Y.; NOMURA, S.; KAWASAKI, S.; TSUTSUMIMOTO, T. Colocalization of Noggin and Bone Morphogenetic Protein-4 During Fracture Healing. Journal of bone and mineral research. Páginas 877-881, Volume 16, Number 5, 2001

YUKO, K.; HABAS, R. Review Wnt signal transduction pathways. Organogenesis, V. 4:2, P. 68-75, 2008.

Wähnert. Internal Fixation of Type-C Distal Femoral Fractures in Osteoporotic Bone. The Journal of Bone & Joint Surgery 92(6):p 1442-1452, June 2010.

WENZ, B.; OESCH, B. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. Biomaterials, V. 22, P. 1599-1606, 2001.

WHITE, R. A.; SHORS, E. C. Biomaterial aspects interpore-200® porous hydroxyapatite. Dental Clinics of North American. V. 30, P. 49-67, 1986.

WHITMAN, D. H.; BERRY, R. L.; GREEN, D. M. **Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery.** J Oral Maxil Surg, V. 55, P.1294-1299, 1997.

WOLFF, D.; GOLDBERG, V. M.; STEVENSON, S. **Histomorphometric analysis of the repair of a segmental diaphyseal defect with ceramic and titanium fibermetal implants: effects of bone marrow.** J Orthop Res. V. 12, P. 439-446, 1994.

