



Rodrigo Capalbo da Silva

ANÁLISE DA INCORPORAÇÃO ÓSSEA DE BIOMATERIAL À BASE DE
HIDROXIAPATITA/B-TRICÁLCIO FOSFATO EM BLOCO: CARACTERIZAÇÃO
TOPOGRÁFICA E ESTUDO HISTOLÓGICO

Araçatuba

2023



Rodrigo Capalbo da Silva

ANÁLISE DA INCORPORAÇÃO ÓSSEA DE BIOMATERIAL À BASE DE
HIDROXIAPATITA/B-TRICÁLCIO FOSFATO EM BLOCO: CARACTERIZAÇÃO
TOPOGRÁFICA E ESTUDO HISTOLÓGICO

Monografia apresentada ao Programa de pós-graduação em Odontologia da Faculdade Sete Lagoas - FACSETE, como requisito parcial a obtenção do título de especialista em Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Perri de Carvalho

Araçatuba

2023

Catálogo na Publicação (CIP)

S586a

Silva, Rodrigo Capalbo da.

Análise da incorporação óssea de biomaterial à base de hidroxiapatita/ β -tricálcio fosfato em bloco : caracterização topográfica e estudo histológico / Rodrigo Capalbo da Silva. - Sete Lagoas, 2023

37 f. : il. ; tab.

Monografia (Especialização em Implantodontia) –
Faculdade Sete Lagoas – FACSETE

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Perri de Carvalho

1. Condução óssea 2. Materiais biocompatíveis 3. Transplante ósseo 4. Durapatita I T.

Black D7
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550



Monografia intitulada “ANÁLISE DA INCORPORAÇÃO ÓSSEA DE BIOMATERIAL À BASE DE HIDROXIAPATITA/B-TRICÁLCIO FOSFATO EM BLOCO: CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA E ESTUDO HISTOLÓGICO” de autoria do aluno Rodrigo Capalbo da Silva.

Aprovada em ___ / ___ / ___ pela banca constituída dos seguintes professores:

Prof. Dr. Paulo Sérgio Perri de Carvalho

Prof. Dr. Fernando Luppino

Profa. Dra. Mariliza Comar Astolphi De Carvalho

Araçatuba, 30 de março de 2023

Faculdade Seta Lagoas - FACSETE
Rua Ítalo Pontelo 50 – 35.700-170 _ Set Lagoas, MG Telefone (31) 3773 3268 -
www.facsete.edu.br

Dedico este trabalho à Deus e minha família, o meu alicerce

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Pai amado, que com todo seu amor e cuidado me capacitou e me proporcionou momentos incríveis durante esta trajetória. Me deu força nos momentos mais difíceis, me guiou dando discernimento durante as minhas escolhas, abriu portas e sempre esteve ao meu lado. Agradeço a oportunidade que o senhor me dá todos os dias de cuidar de pessoas.

Aos meus pais Jorge e Érica, que mais do que eu, batalharam por essa conquista e fizeram de tudo para permitir que eu corresse atrás dos meus sonhos. Obrigado por todo o suporte, por nos momentos mais difíceis não me deixarem cair e ajudar na minha formação. Vocês são a maior referência e exemplo que tenho como pessoas, tudo o que fiz e faço é por vocês. Amo vocês mais que tudo!

Ao meu irmão Rafael, meu companheiro e amigo que sempre esteve ao meu lado torcendo pela minha felicidade. Obrigado por todos os momentos que vivemos juntos, por me fazer crescer e acompanhar o seu crescimento. Sempre estarei ao seu lado batalhando para que você seja muito feliz.

Aos meus familiares, por todo apoio que sempre deram a mim e minha família. Sou muito feliz por saber que tenho uma família tão unida, que está presente em todos os momentos.

A minha noiva Hiskell Fernandes, minha melhor amiga, companheira, meu porto seguro. Esse momento não seria possível sem você, que me deu forças nas situações mais difíceis e sempre me apoiou nas minhas escolhas. Sempre estarei ao seu lado.

Ao meu professor e orientador deste trabalho Professor Doutor Paulo Sérgio Perri de Carvalho, que foi fundamental para a minha formação desde a minha primeira atualização em Implantodontia, até o presente momento que tenho a honra de poder compor a sua equipe. O senhor é uma referência para mim. Sou muito grato por todo conhecimento compartilhado, por sempre se mostrar disponível e pelas oportunidades que o senhor me deu confiando em meu trabalho.

Aos Professores do Núcleo de Educação Continuada de Odontologia (NEC Odonto) Dra. Mariliza Comar Astolphi de Carvalho, Dr. Fernando Luppino, Dr.

Felisteus, que contribuíram de forma tão gentil e única para a minha formação, vocês me inspiram como profissionais e pessoas.

A todos os funcionários do Núcleo de Educação Continuada de Odontologia (NEC Odonto) sempre muito solícitos e grandes companheiros.

“Quem é rico em sonhos não envelhece nunca. Pode até ser que morra de repente. Mas morrerá em pleno voo...”

Rubem Alves

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a incorporação óssea de blocos autógenos e de Hidroxiapatita associada ao β -tricálcico fosfato. A caracterização topográfica do biomaterial foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura acoplada à espectroscopia de energia dispersiva por raios X (MEV-EDS). Dez coelhos receberam aleatoriamente em seus ângulos mandibulares direito e esquerdo o enxerto ósseo autógeno obtido da tíbia (Grupo Autógeno - AG) ou o biomaterial sintético à base de β -tricálcico fosfato (Grupo Biomaterial - BG). A eutanásia foi realizada em 30 e 60 dias pós-operatórios. O MEV-EDS evidenciou uma superfície com formação de aglomerados de cristais e poros de aproximadamente 100 μm de diâmetro. A análise qualitativa histológica em BG no período de 30 dias mostrou um processo de incorporação mais lento que o AG. No período de 60 dias, o processo de incorporação do AG apresentou-se em estágio avançado, com uma linha de cimentação entre o enxerto e o leito receptor, enquanto o BG mostrou-se com remanescentes de biomaterial envolvido pelo tecido ósseo. A análise quantitativa mostrou que os valores médios do tecido ósseo neoformado no AG foram estatisticamente superiores quando comparados ao BG. Análise imunohistoquímica mostrou formação e maturação óssea precoce do AG com coloração mais intensa de osteopontina e osteocalcina. Em conclusão, o biomaterial mostrou-se como possível substituto ósseo, sendo incorporado ao leito receptor, no entanto mostrou um atraso na incorporação óssea, bem como menor neoformação óssea em comparação ao osso autógeno.

Palavras-chave: Condução óssea, Materiais biocompatíveis, Trans-plante ósseo, Durapatita I T.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the bone incorporation of autogenous and Hydroxyapatite associated with β -tricalcium phosphate blocks. The topographic characterization of the biomaterial was performed using scanning electron microscopy coupled with energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDS). Ten rabbits randomly received in their right and left mandibular angles the autogenous bone graft obtained from the tibia (Autogenous Group - AG) or the synthetic biomaterial based on β -tricalcium phosphate (Biomaterial Group - BG). Euthanasia was performed at 30 and 60 days postoperatively. SEM-EDS showed a surface with formation of crystal agglomerates and pores of approximately 100 μm in diameter. Qualitative histological analysis on BG within 30 days showed a slower incorporation process than AG. In the period of 60 days, the AG incorporation process was at an advanced stage, with a cementation line between the graft and the recipient bed, while the BG showed remnants of biomaterial involved by bone tissue. Quantitative analysis showed that the mean values of new bone formation in AG were statistically higher when compared to BG. Immunohistochemical analysis showed early bone formation and maturation of AG with more intense staining of osteopontin and osteocalcin. In conclusion, the biomaterial proved to be a possible bone substitute, being incorporated into the receptor bed, however it showed a delay in bone incorporation, as well as less bone formation compared to autogenous bone.

Key words: Bone Conduction, Biocompatible, Materials, Bone Grafting, Calcium Hydroxyapatite.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 MATERIAIS E MÉTODOS	14
3 RESULTADOS	19
4 DISCUSSÃO	27
5 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32
ANEXOS	37

1. INTRODUÇÃO

Os resultados da reabsorção óssea alveolar após perda dentária, trauma e infecções podem promover um local desfavorável para a reabilitação de implantes dentários de acordo com o planejamento protético adequado. Os defeitos ósseos apresentam padrões e tamanhos diferentes, e sua reconstrução pode ser classificada basicamente em aumentos verticais e horizontais (ESPOSITO, 2009). A literatura apresenta várias técnicas para o tratamento de defeitos ósseos, incluindo substitutos ósseos de diferentes origens, como o osso autógeno, heterógeno e aloplástico, em formas variadas de apresentação, como partículas, cimento e bloco (KAMM, 2015; DE AZAMBUJA CARVALHO, 2019).

Em particular, o enxerto em bloco apresenta-se como o tratamento de escolha para vários casos de reconstrução horizontal, principalmente em atrofia alveolar em níveis mais avançados (ATEF, 2019). Para recriar uma anatomia adequada da crista óssea alveolar, o osso autógeno é considerado padrão-ouro, por ser o único enxerto que apresenta características osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras juntas (LYE, 2008). A osteoindução implica no recrutamento e estimulação de células mesenquimais imaturas nas proximidades do local cirúrgico para diferenciarem-se em células da linhagem osteoblástica (ALEXANDER, 1987). Este mecanismo é regulado pela atividade das proteínas osteomorfogênicas presentes na matriz óssea. A osteogênese requer osteoblastos e células precursoras de osteoblastos viáveis presentes no enxerto para promover a neoformação óssea e conseqüentemente sua incorporação. A osteocondução consiste na substituição gradual do enxerto pelas células hospedeiras osteoprogenitoras, de acordo com um equilíbrio estável entre reabsorção e aposição óssea (ALBREKTSSON, 2001). Por outro lado, o procedimento de obtenção do enxerto ósseo autógeno pode apresentar desvantagens, incluindo o risco de lesões neurovasculares no local doador, a necessidade de um local cirúrgico adicional, um tempo cirúrgico prolongado, uma crescente morbidade pós-operatória do paciente, um tempo de recuperação prolongado e ocasionalmente associado à hospitalização do paciente quando os leitos doadores de escolha são extraorais. Sendo assim, pesquisas têm sido direcionadas ao uso de biomateriais como substitutos ósseos para as cirurgias reconstrutivas, objetivando a redução dos riscos provocados pela obtenção do enxerto

ósseo autógeno. Atualmente, uma grande variedade de biomateriais sintéticos ou biológicos está disponível comercialmente.

Entre os diferentes biomateriais, a cerâmica a base de β -tricálcio fosfato (β -TCP) foi introduzida como substituto ósseo, atuando como um arcabouço promovendo a neoformação óssea através da osteocondução. Como resultado de sua biocompatibilidade, bioatividade, incorporação favorável e propriedades osteocondutoras, o β -TCP sintético tem sido geralmente aceito e avaliado nas reconstruções ósseas (BEST, 2008; WAKIMOTO, 2011). Sua característica estrutural, semelhante a fase mineral do osso, é outro fator que traz grandes expectativas para esse material como substituto ósseo (TEBYANIAN, 2019). Como desvantagem, o biomaterial de β -tricálcio fosfato apresenta alta solubilidade, não sendo satisfatório em reconstruções que precisam manter e criar volume ósseo (GALLINETTI, 2014). No intuito de reduzir e retardar sua rápida absorção, a associação de β -TCP com hidroxiapatita em diferentes proporções tem sido estudada, e observou-se que a composição bifásica composta por HA e β -TCP fornece melhores capacidades osteocondutivas quando comparada à cerâmica monofásica (DACULSI, 2009), diminuindo a atividade osteoclástica e permitindo a formação de uma estrutura que favorece a osteocondução (YAMADA, 1997). A busca da proporção ideal de hidroxiapatita e de β -tricálcio fosfato é discutida na literatura e é considerada de extrema importância, pois modifica a solubilidade do biomaterial e influencia o tempo de sua reabsorção. Em um estudo de biocompatibilidade e biomecânico, a associação de 60% / 40% de HA / β -TCP foi testada e sugerida como a proporção ideal desses componentes (WANG, 2017). A combinação de 60% de HA / 40% de BTCP foi utilizada em um estudo para levantamento da membrana do seio maxilar em humanos, obtendo resultados favoráveis à neoformação óssea, demonstrando ser uma proporção interessante (OHAYON, 2014). Diferentes estudos experimentais em animais e ensaios clínicos mostraram a incorporação favorável da composição bifásica, no preenchimento de defeitos críticos confeccionados em calvária de ratos (SCHMIDT, 2019), seio maxilar de humanos (OHAYON, 2014) e na preservação alveolar após exodontia (KAKAR, 2017). Entretanto, a maioria dos estudos com biomaterial de β -TCP foram realizadas reconstruções de defeitos que apresentavam 2 ou mais paredes preenchidas com cimentos ou biomateriais em granulos, aproveitando o potencial osteocondutor do material, o que pode favorecer a neoformação óssea. Poucos estudos são encontrados

avaliando a incorporação desse material em apresentações em bloco para aumento horizontal da crista alveolar (KAKAR, 2018; Jensen, 2006).

2. PROPOSIÇÃO

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi analisar e comparar o processo de incorporação óssea de enxerto ósseo autógeno e blocos 60HA / 40 β -TCP (Grafts® BCP, Substituto Ósseo Inteligente, Aix-En-Provence, França) fixados por parafusos bicorticais para os ângulos mandibulares de coelhos, simulando a reconstrução horizontal alveolar.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais e grupos experimentais

O protocolo do estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade do Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, com o número de identificação 00999/2011. O cálculo amostral foi baseado nos valores das análises histométricas e imuno-histoquímica do estudo piloto do autor (dados não publicados) antes do início do estudo. A neoformação óssea foi determinada como desfecho primário. Assim, foi considerada uma diferença significativa de 5% (desvio padrão de 2%) e, para 80% de potência e ajuste de alfa em 0,05, foram necessários cinco enxertos por grupo para comparar dois grupos diferentes. A amostra foi constituída por 10 coelhos adultos Nova Zelândia da variação *albinus*, machos, com peso variando de 3 a 4 kg. Os animais foram alojados nas instalações dos animais do campus da UNESP - Araçatuba em gaiolas individuais em ambiente com umidade e temperatura controladas, em círculo claro-escuro (12:12 h) e alimentados com água e ração para coelho (Procoelho - Primor, São Paulo, SP, Brasil) ad libitum. Após a randomização no site Research Randomizer (<https://www.randomizer.org/>), os animais receberam aleatoriamente em suas mandíbulas os blocos dos substitutos ósseos que geraram os dois grupos experimentais da pesquisa:

- Grupo autógeno (AG): blocos ósseos autógenos colhidos na porção medial da metáfise tibial esquerda foram enxertados aleatoriamente nos ângulos mandibulares esquerdo e direito dos animais.

- Grupo biomaterial (BG): os blocos de biomaterial compostos por um componente estável (hidroxiapatita - HA) e um componente bioabsorvível (β -TCP) na proporção de 60:40, respectivamente comercialmente disponível (Grafts® BCP, Smart Bone Substitute, Aix-En-Provence, France) foram enxertados aleatoriamente nos ângulos mandibulares esquerdo e direito dos animais.

Microscopia eletrônica de varredura acoplada à espectroscopia de raios X por dispersão em energia (MEV-EDS)

Após a cobertura do biomaterial com uma fina camada de carbono, a topografia superficial do biomaterial foi analisada em microscópio eletrônico (MEV ZEISS, modelo EVO LS15), com o objetivo de analisar a morfologia da superfície do biomaterial e sua porosidade, acopladas à espectroscopia de raios X por dispersão em energia (Oxford model EDX microanalysis detector, Inca X-act, Germany), para análise semiquantitativa da composição química das superfícies.

3.2. Cirurgia experimental

A anestesia geral foi induzida por injeções intramusculares de cloridrato de ketamina (Vetaset - Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) na dose de 50 mg / kg de peso corporal associada ao cloridrato de xilazina (Dopaser - Laboratório Calier do Brasil Ltda, Osasco, São Paulo, Brasil) na dose de 5 mg / kg de peso corporal. Posteriormente, foram realizadas tricotomia e antissepsia tópica nas duas regiões do ângulo mandibular e na tíbia esquerda com solução de iodo (PVPI 10%, Riodeína, Rioquímica, São José do Rio Preto, Brasil). Além disso, a infiltração local de cloridrato de mepivacaína (0,3 ml / kg, Scandicaine 2% com epinefrina 1: 100.000, Septodont, França) foi usada como anestesia local. Foi realizada uma incisão dérmica de 2 cm com uma lâmina de bisturi nº 15 (Feather Industries Ltda, Tóquio, Japão) montada em cabo de bisturi nº 3 em correspondência com cada ângulo mandibular. Os tecidos moles foram dissecados respeitando os planos de tecido até atingir o periósteo. Finalmente, o tecido periosteal foi incisado para expor o tecido ósseo da área receptora (Figura 1a). A decorticalização discreta da tábua óssea lateral do ângulo mandibular foi

realizada por meio de broca rotativa nº 701 (Maillefer Instruments, Ballaigues, Suíça), montada em peça reta cirúrgica (Kavo do Brasil, Joinvile, Brasil), sob irrigação constante de solução salina estéril a 0,9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil). No AG, após a exposição da área receptora, osso autógeno foi obtido da tíbia. Foi feita uma incisão linear de 2 cm em correspondência com a metáfise tibial esquerda. Um retalho cutâneo de espessura total, incluindo pele, músculo e perióstio, foi elevado expondo a superfície do osso. Foi realizada osteotomia circular (Figura 1b) por meio de uma broca de trefina de 8 mm de diâmetro interno (Neodent®, Curitiba, Paraná, Brasil) montada em contra-ângulo com redução de 20: 1 (Kavo® do Brasil, Joinvile, Brasil) a uma velocidade de 1500 rpm, sob irrigação constante com cloreto de sódio a 0,9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil). O osso foi cuidadosamente removido da trefina e preservado em solução salina estéril. No BG, foram colhidos blocos cerâmicos bifásicos de 60HA / 40β-TCP, utilizando o mesmo tamanho de trefina, para coletar enxertos do mesmo diâmetro nos dois grupos experimentais padronizando-os. Os enxertos autógenos (Figura 1c) ou biomaterial (Figura 1d) foram subsequentemente perfurados e fixados aleatoriamente no ângulo mandibular esquerdo ou direito por meio de parafusos bicorticais de osteossíntese 1,6 x 8 mm (SIN, Sistema de Implante Nacional, São Paulo, Brasil). Os tecidos moles foram cuidadosamente reposicionados e suturados em diferentes camadas para fechamento primário da ferida usando uma sutura absorvível (Polyglactin 910 - Vicryl 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil), enquanto a sutura com fio monofilamentar não reabsorvível (Nylon 4.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil) foi utilizado para suturas interrompidas da pele. Antissepsia adicional com PVPI foi realizada após a sutura. Nês pós-operatório imediato foi administrado pentabiótico intramuscular (0,1 mL / kg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, SP, Brasil). Também foi administrada uma dose única de dipirona sódica (1 mg / kg / dia, Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda, São Paulo, SP, Brasil). Nenhuma restrição alimentar ou de movimento foi aplicada aos animais que permaneceram em gaiolas individuais durante o período experimental. Aos 30 e 60 dias pós-operatórios, foi realizada a eutanásia de 5 animais de cada grupo por uma dose letal de pentobarbital (200 mg / kg). Os tecidos moles foram então dissecados e a mandíbula de cada coelho foi extraída.

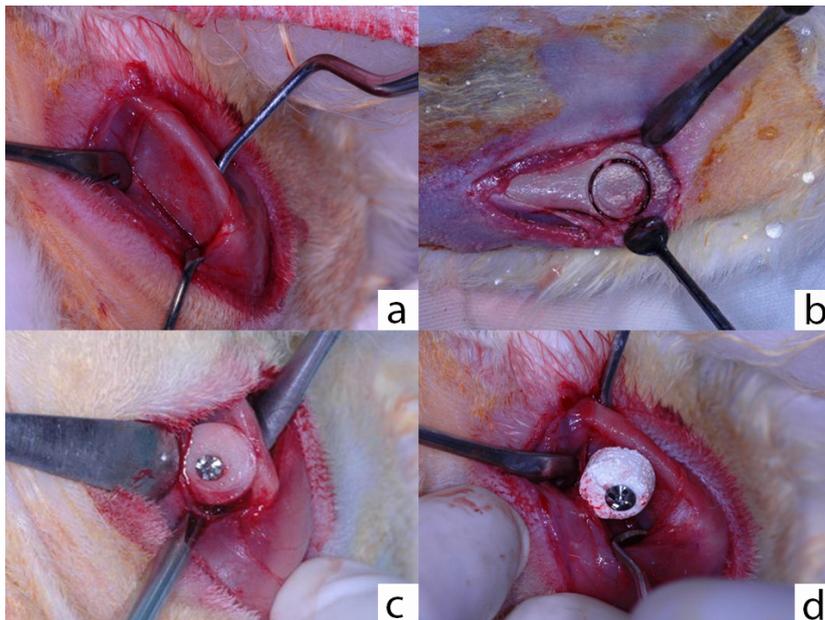


Figura 1: Procedimento cirúrgico experimental. a: exposição do leito receptor. b: obtenção do enxerto autógeno. c: Fixação do enxerto autógeno. d: Fixação do biomaterial.

3.3. Processamento laboratorial histológico

Osteotomias foram realizadas em cada mandíbula para obter amostras ósseas com pelo menos 3 cm de margens circunferencialmente ao redor da área enxertada. Todas as amostras foram fixadas por imersão em formalina tamponada neutra a 10% (Reagentes Analíticos®, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) e descalcificadas em EDTA a 10% (ácido etilenodiaminotetraacético Merck) dissolvido em água Milli-Q, substituído semanalmente por um período de 6 semanas, em temperatura ambiente. Após a descalcificação, os parafusos da osteossíntese foram cuidadosamente removidos. As amostras foram desidratadas em uma série crescente de concentrações de álcoois (70, 90, 95 e álcool absoluto), alterando as soluções a cada hora em um agitador orbital (KLine CT - 150®, Cientec - Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil). A diafanização foi realizada com xilol para posterior inclusão em parafina e preparadas usando uma lâmina de precisão para obter seções de 5 μ m de espessura. As seções foram montadas em lâminas e coradas com hematoxilina eosina (HE Merck & Co., Inc., NJ, EUA) para a análise subsequente.

3.4. Análise histológica qualitativa

A avaliação qualitativa foi realizada sob microscópio óptico binocular JENAMED 2 (Carl-Zeiss), considerando a parte interna do enxerto ósseo, a interface entre o enxerto ósseo e o leito receptor e o tecido recém-formado.

3.5. Análise histométrica

A análise quantitativa foi realizada no software Image J, capturando a imagem da área de interesse (envolvendo substituto ósseo, interface e leito receptor), gerando a área total. Posteriormente, através da ferramenta "polígono", o substituto ósseo, o tecido conjuntivo e o tecido ósseo neoformado foram delimitados e sua área percentual correspondente à área total foi calculada e submetida a testes estatísticos.

3.6. Análise estatística

Os dados colhidos na análise histométrica foram levados a testes estatísticos. Após o teste de normalidade, foram realizados os testes T para dados paramétricos e Mann-Whitney para dados não paramétricos (tecido conjuntivo no período de 30 dias), adotando nível de significância de $p < 0,05$.

3.7. Análise imuno-histoquímica

Após a obtenção de lâminas histológicas, as reações imuno-histoquímicas foram usadas para mostrar o início do processo de mineralização via precipitação de íons fosfato; osteopontina (OP) (SC10593, Santa Cruz Biotechnology, Inc. 10410 Finnell Street, Dallas, TX 75220 EUA); e osteocalcina (OC) (SC18319, Santa Cruz Biotechnology, Inc. 10410 Finnell Street, Dallas, TX 75220 EUA), que marcam osteoblastos maduros e o início da atividade de mineralização óssea. Para caracterizar o processo de reabsorção óssea, foi utilizada a proteína fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP) (SC30832, Santa Cruz Biotechnology, Inc. 10410 Finnell Street, Dallas, TX 75220 EUA), que marca osteoclastos ativos, evidenciando assim o tecido ósseo em remodelação na região de interesse. Essas proteínas foram analisadas nos períodos de 30 e 60 dias após cirurgia do enxerto ósseo.

A experimentação imuno-histoquímica foi realizada utilizando a imunoperoxidase como método de detecção. O anticorpo secundário de coelho anti-Goat IgG (H + L), Biotin (Pierce Biotechnology, Waltham, Massachusetts, EUA) foi

usado; o amplificador era a estreptavidina (Dako North America, Inc. 6392 Via Real Carpinteria, CA 93013, Estados Unidos) e o cromogênio era a diaminobenzidina (Dako North America, Inc. 6392 Via Real Carpinteria, CA 93013, Estados Unidos). Para cada anticorpo utilizado, a expressão de proteínas foi avaliada semiquantitativamente, atribuindo diferentes "escores", de acordo com o número de células imunomarcadas no processo de reparo. A análise foi realizada com um microscópio óptico (Leica DMLB, Heerbrugg, Suíça) por meio de escores (análise qualitativa ordinal), nos quais os escores apresentaram marcação leve (++) , marcação moderada (+++) e marcação intensa (++++). As marcações com diaminobenzidina foram consideradas positivas, sendo cauteloso em manter controles negativos para avaliação da especificidade dos anticorpos. Esses escores foram estabelecidos de acordo com Pedrosa et al. (2009), Manrique et al. (2015) e Palin et al. (2018): a marcação leve representava cerca de 25% da área de marcação imunológica nas lâminas; marcação moderada representou cerca de 50% da área de marcação imunológica nas lâminas; e coloração intensa representou cerca de 75% da área de marcação imunológica nas lâminas.

4. RESULTADOS

4.1. Microscopia eletrônica de varredura acoplada à espectroscopia de raios X por dispersão em energia (MEV-EDS)

As análises MEV-EDX evidenciaram uma superfície com formação de aglomerados de cristais e entre eles uma alta macroporosidade ($> 100 \mu\text{m}$). Os poros mostraram forma de cratera e aproximadamente $100 \mu\text{m}$ a $200 \mu\text{m}$ de diâmetro de maneiras multidirecionais (Figura 2a). Foi possível observar regiões com diferentes alturas na mesma superfície do bloco (Figura 2b). A base do biomaterial mostrou a irregularidade como a superfície acompanhada por sua porosidade, bem como os aglomerados de cristais em diferentes formas e tamanhos (Figura 2c, d, e). A análise por espectroscopia de raios X por dispersão em energia mostrou a presença da quantidade de íons fósforo (467), oxigênio (372) e cálcio (365), respectivamente, seguidos por presença quase inexpressiva de magnésio (Figura 2f).

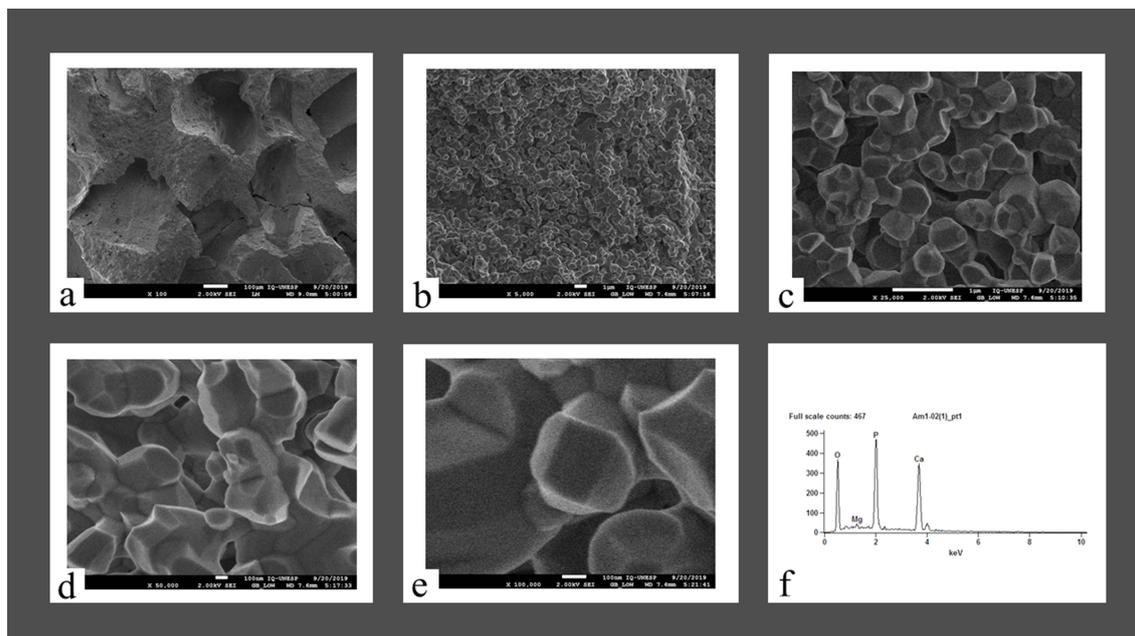


Figura 2: a, b, c, d, e - MEV nas ampliações x100, x5.000, x25.000, x50.000 e x100.000, respectivamente na superfície do biomaterial. f: EDX. valores da espectrometria antes da cirurgia. Os elementos encontrados foram fósforo, oxigênio, cálcio e magnésio.

4.2. Análise histológica qualitativa

1) Grupo autógeno

No AG, nos 30 dias pós-operatórios (Figura 3a), foi possível observar o enxerto ósseo autógeno (A) posicionado sobre o leito receptor (B). O espaço entre o enxerto e o leito receptor foi ocupado por tecido ósseo com um número relevante de trabéculas em estágio de maturação com alta atividade celular e boa vascularização (C). Na vista aproximada do enxerto (Figura 3b), osso autógeno (A) e osso recém-formado (B) puderam ser identificados. Na parte interna do enxerto ósseo autógeno, pequenas áreas de reabsorção (setas pretas) sugerem fase de remodelação.

No AG, aos 60 dias pós-operatórios (Figura 4a), foi possível observar o enxerto ósseo autógeno (A) em contato com o tecido ósseo neoformado (B). Internamente ao enxerto, a presença de tecido conjuntivo pode sugerir uma fase de remodelação do osso. Na análise microscópica em uma vista mais próxima (Figura 4b), foi possível distinguir o enxerto ósseo autógeno (A) e o tecido ósseo neoformado (B) separados por uma linha de cimentação (seta preta). Na parte interna do enxerto ósseo autógeno, foram

observadas áreas de tecido conjuntivo, confirmando a fase de remodelação do osso. Osteócitos eram claramente visíveis (setas vermelhas).

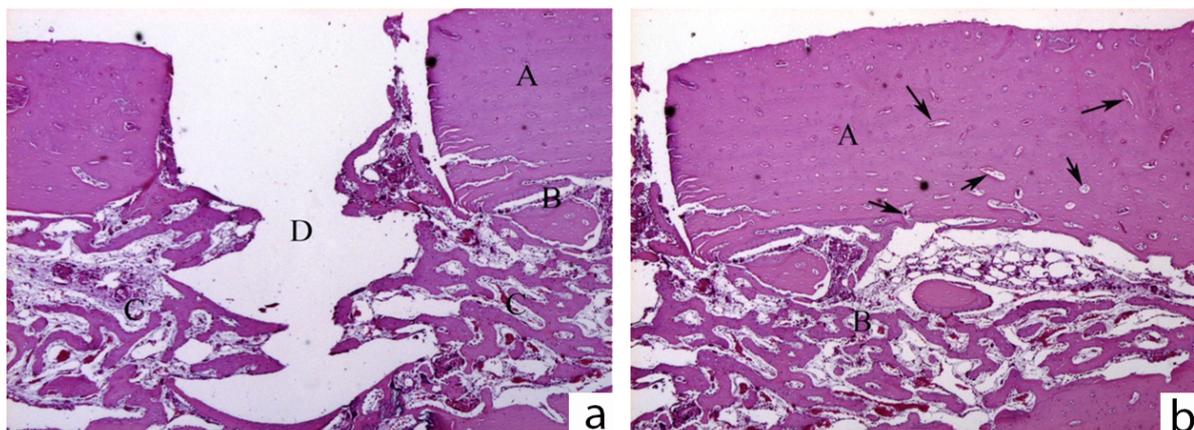


Figura 3: Grupo autólogo, 30 dias. a: HE 40x. Enxerto ósseo autólogo (A) posicionado sobre o leito receptor (B), trabéculas em estágio de maturação com alta atividade celular e boa vascularização (C). b: HE 125x. Osso autólogo (A) e osso neoformado (B), pequenas áreas de reabsorção (setas pretas).

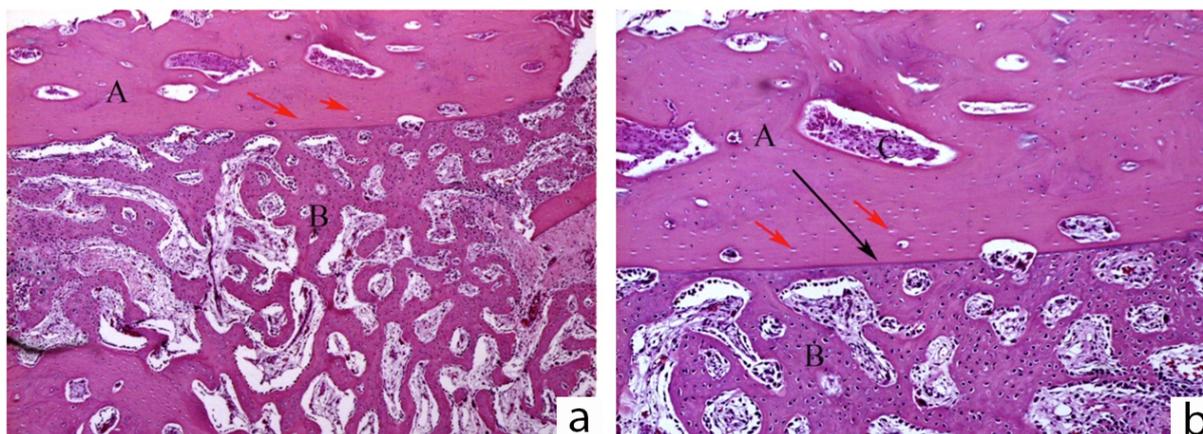


Figura 4: Grupo autólogo, 60 dias. a: HE 40x. Enxerto ósseo autólogo (A) em contato com o osso neoformado (B). b: HE 125x. Enxerto ósseo autólogo (A) e osso neoformado (B) linha de cimentação (seta preta)

2) Grupo Biomaterial

No período de 30 dias pós-operatório (Figura 5a), pode-se observar o biomaterial (A) em íntimo contato com o tecido ósseo neoformado (B), e ao leito receptor residual (C). Na periferia do tecido ósseo neoformado (D) foi possível observar um grande número de células compatíveis com osteoblastos (setas azuis) sugerindo que os mesmos estão em fase de síntese de matriz. Na região abaixo do tecido ósseo do leito receptor observou-se também um tecido em íntima aposição ao leito, compatível com tecido muscular (E). No mesmo período de 30 dias pós-operatório em uma vista mais aproximada (Figura 5b) pode-se observar o íntimo contato do biomaterial (A) como o tecido ósseo neoformado (B). Observou-se também na periferia do tecido ósseo neoformado a presença de osteoblastos (C setas azuis).

Aos 60 dias pós-operatórios (Figura 6a), o biomaterial (A) foi envolvido por osso recém-formado (B). Na parte interna do biomaterial, foi possível observar ilhas de tecido ósseo neoformado, destacando a capacidade de osteocondutividade do substituto ósseo. Ao mesmo tempo, foram observadas áreas de reabsorção associadas à perda de volume, indicando alta solubilidade do biomaterial. Em maior aumento (Figura 6b), foi possível observar o substituto ósseo (A) no leito receptor (B), com a presença de células multinucleadas nas proximidades, sugerindo reabsorção do enxerto e subsequente aposição óssea (C).

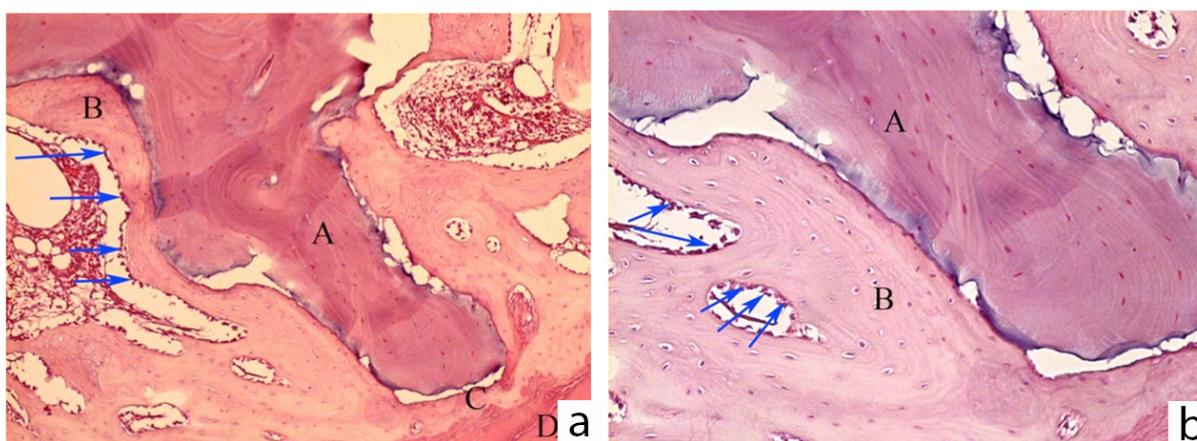


Figura 5: Grupo Biomaterial, 30 dias. a: HE 40x. Biomaterial (A) osso neoformado (B) sítio receptor (C). b: HE 125x. Biomaterial (A), osso neoformado (B), células osteoblásticas na periferia do tecido neoformado (setas azuis).

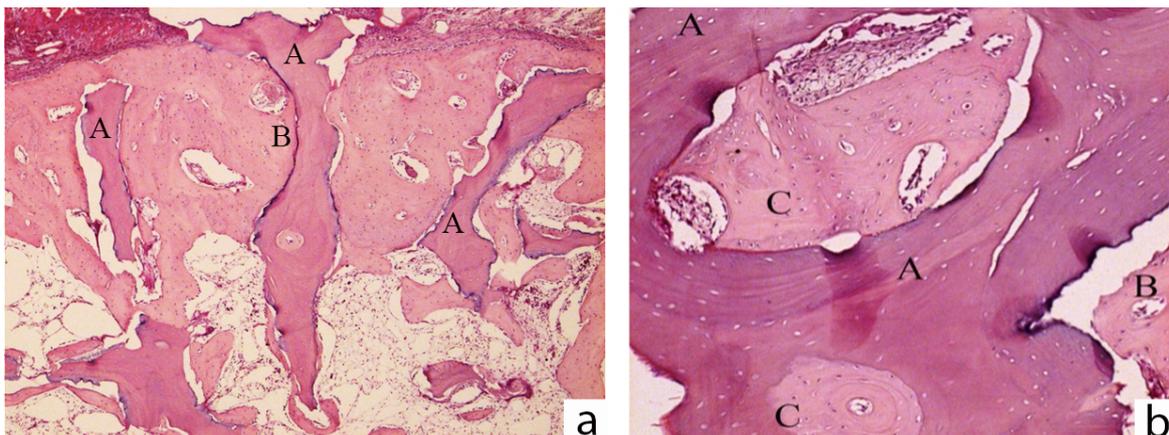


Figura 6: Grupo Biomaterial, 60 dias. a: HE 40x. biomaterial (A) osso neoformado (B). b: HE 125x. Substituto ósseo (A), leito receptor (B), células multinucleares sugerindo reabsorção do enxerto e aposição óssea (C).

4.3. Análise histométrica

A análise histométrica foi realizada no software ImageJ. Os valores médios de tecido ósseo neoformado no Grupo Autógeno foram de 3,50% e 5,02% nos 30 e 60 dias pós-operatórios, respectivamente, enquanto os valores médios de tecido conjuntivo foram de 29,16% e 27,52% nos mesmos períodos analisados. Os valores médios do remanescente do enxerto autógeno foram 28,30% e 21%, respectivamente, nos mesmos períodos. Para o Grupo Biomaterial, os valores médios do tecido ósseo recém-formado foram 1,67% e 3,31% nos 30 e 60 dias pós-operatórios, respectivamente, enquanto os valores médios do tecido conjuntivo foram 22,10% e 27,45% nos mesmos períodos analisados. Os valores médios remanescentes do biomaterial sintético à base de fosfato β -tricalcico foram 29,38% e 20,73% respectivamente nos mesmos períodos. Os dados coletados foram submetidos à análise estatística, teste T para dados paramétricos (tecido ósseo neoformado e substituto ósseo nos dois períodos de análise e tecido conjuntivo no período de 60 dias) e Mann-Whitney para dados não paramétricos (tecido conjuntivo aos 30 dias), adotando nível de significância de $p < 0,05$. Os valores médios do tecido ósseo neoformado no Grupo Autógeno foram estatisticamente maiores quando comparados aos valores médios do tecido ósseo neoformado no Grupo Biomaterial. Não houve diferença estatística entre os grupos na quantidade de tecido conjuntivo e substituto ósseo nos dois períodos. Os dados de tecido ósseo neoformado, tecido

conjuntivo e remanescentes de enxerto autógeno e biomaterial para ambos os grupos estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Análise da comparação entre biomaterial e osso autógeno em cada período de análise

PERÍODO	GRUPO	SUBSTITUTO ÓSSEO*	TECIDO CONJUNTIVO	OSSO NEOFORMADO
30 DIAS*	Biomaterial	29.38% a	22.10% a	1.67% a
	Autógeno	28.30% a	29.16% a	3.50% b
60 DIAS*	Biomaterial	20,73% a	27,45% a	3,31% a
	Autógeno	21% a	27.52% a	5.02% b

* Remanescente de osso autógeno e biomaterial

a, b- Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos, em cada período de análise

Análise imunohistoquímica

Aos 30 dias, em ambos os grupos, foi possível observar um tecido ósseo em organização, com trabéculas ósseas neoformadas, presença de células da linhagem osteoblástica. Já aos 60 dias, em ambos os grupos, existe um tecido ósseo organizado e maduro, com presença de osteócitos dentro das lacunas envoltas pela matriz óssea mineralizada.

No grupo autógeno, aos 30 dias, foi possível observar uma marcação intensa para osteopontina(++++)), mostrando uma atividade inicial de mineralização óssea bastante intensa, com positividade para as células (osteoblastos) ao redor do trabeculado ósseo, bem como a própria marcação na matrix extracelular mineralizada. (Figura 7a). Em contraposição, no mesmo período, grupo biomaterial, foi observada uma marcação leve (++) (Figura 7d), com uma matriz extracelular pouco mineralizada.

Com relação a osteocalcina, uma proteína relacionada a mineralização tardia da matriz extracelular, foi observada uma marcação moderada (+++) no grupo autógeno (Figura 7b), com células da linhagem osteoblástica e a matriz extracelular apresentando imunomarcacão positiva para esta proteína. Quando se correlaciona a marcação de

osteopontina e osteocalcina para este grupo experimental, observa-se que a atividade de mineralização óssea está nas etapas iniciais, compatível com o período de avaliação (30 dias). Já no grupo biomaterial, foi possível observar marcações positivas para osteocalcina (++) no tecido ósseo pré-existente, com células da linhagem osteoblástica e matriz extracelular marcadas positivamente (Figura 7e).

A expressão para TRAP, mostrando osteoclastos em atividade de reabsorção óssea, mostrou-se leve (++) para o Grupo Autógeno (Figura 7c), com poucos osteoclastos em atividade e, moderada (+++) para o Grupo Biomaterial (Figura 7f), indicando reabsorção atividade neste grupo.

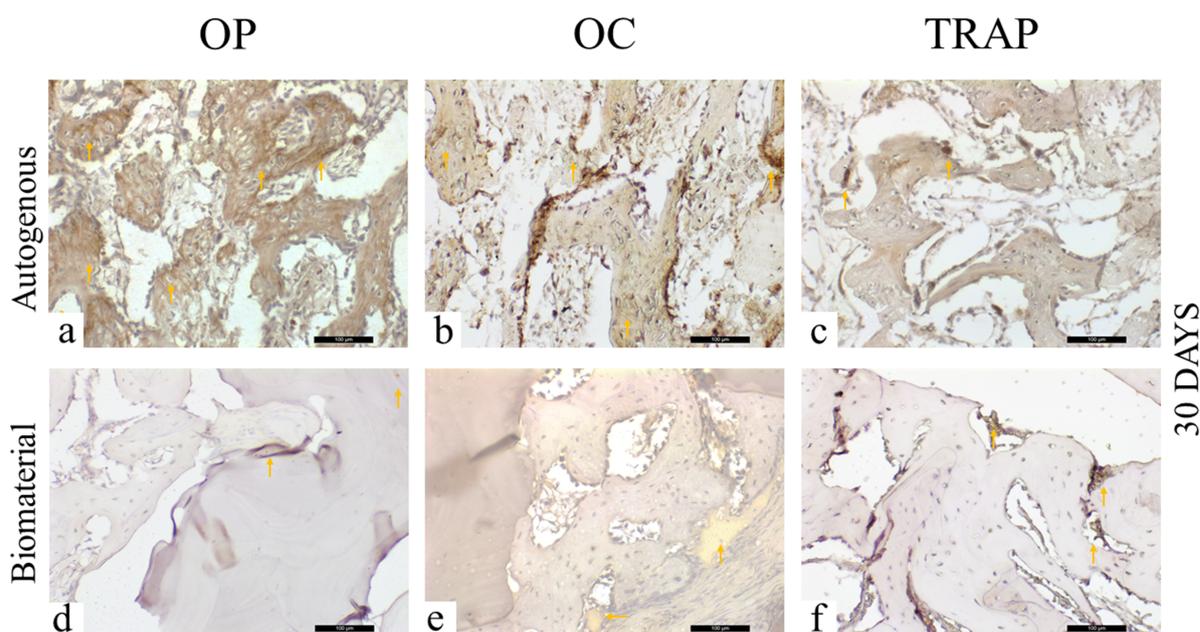


Figura 7: Imunocoloração por Osteopontin (OP), Osteocalcina (OC) e Ácido fosfatase resistente a Tartrate (TRAP) aos 30 dias para os grupos experimentais. A marcação imunológica é indicada por setas amarelas.

Aos 60 dias, no Grupo Autógeno, foi observada marcação moderada (+++) para osteopontina (Figura 8a), com a presença de células marcadas positivamente próximas ao tecido ósseo. Vale destacar a organização do tecido ósseo presente na região de interesse. A osteocalcina foi marcada de forma mais intensa (++++), com áreas de precipitação no tecido ósseo maduro (Figura 8b). Observam-se osteócitos marcados positivamente, caracterizando a maturidade do tecido ósseo nesse período. A proteína

TRAP foi levemente marcada (++), com poucos osteoclastos em atividade de reabsorção (Figura 8c).

Para o Grupo Biomaterial, foi observada marcação leve (++) para osteopontina, osteocalcina e TRAP, mostrando poucas células marcadas para cada uma dessas proteínas (Figura 8d, e, f). Com relação a osteopontina e osteocalcina, que são proteínas de matriz extracelular, portanto, apresentando marcações sobre a matriz mineralizada, destaca-se a baixa atividade de mineralização para ambas as proteínas neste período mais tardio. Também foram evidenciadas poucas marcações para TRAP na região de interesse.

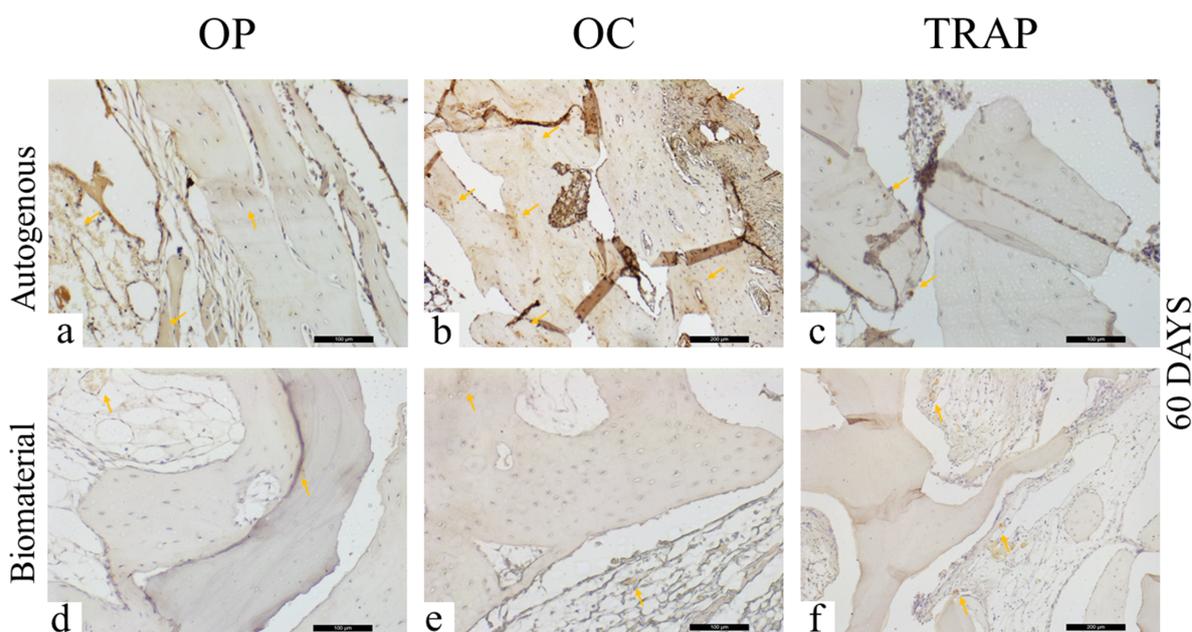


Figura 8: Imunomarcação de Osteopontin (OP), Osteocalcina (OC) e Ácido fosfatase resistente a Tartrate (TRAP) aos 60 dias para os grupos experimentais. A marcação imunológica é indicada por setas amarelas.

Os escores da análise imunohistoquímica nos períodos de 30 e 60 dias estão listados nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2. Imunomarcção por Osteopontina (OP), Osteocalcina (OC) e Fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP) aos 30 dias para os grupos experimentais

	AUTÓGENO	BIOMATERIAL
OP	+++	++
OC	++++	++
TRAP	++	++

Tabela 3. Imunomarcção por Osteopontina (OP), Osteocalcina (OC) e Fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP) aos 30 dias para os grupos experimentais

	AUTÓGENO	BIOMATERIAL
OP	++++	++
OC	+++	++
TRAP	++	+++

5. DISCUSSÃO

O reparo tecidual não é um fenômeno isolado, mas está relacionado a uma série mais complexa e dinâmica de eventos biológicos. Nesse contexto, o conhecimento do comportamento fisiológico dos biomateriais durante o processo de incorporação desempenha um papel fundamental para favorecer o processo de reparação dos tecidos.

O enxerto ósseo autógeno é caracterizado por um número relevante de vantagens em relação à maioria dos substitutos ósseos, principalmente em termos de biocompatibilidade e potencial regenerador (ATEF, 2019). O osso autógeno é considerado o padrão ouro devido ao seu potencial osteogênico, além das capacidades osteoindutoras e osteocondutoras (SHAMSODDIN, 2019), promovendo a aposição de novo tecido ósseo do osso preexistente como modelo para nova formação óssea. No presente estudo, essas propriedades foram validadas ao analisar as imagens microscópicas do enxerto autógeno em bloco aos 60 dias pós-operatórios. Observou-se um contato próximo entre o leito receptor e o bloco autógeno enxertado, juntamente com a presença de linhas de cimento, osso neoformado associado a um elevado número de trabéculas e osteócitos vitais que preenchem as porções internas do enxerto. Todos

esses eventos biológicos foram promovidos pela matriz óssea, que induziu a diferenciação de células osteoprogenitoras da região receptora em osteoblastos, a fim de estimular a formação óssea recentemente (WAKIMOTO, 2011). Todas essas vantagens e características são sustentadas pelos resultados esperados da análise histométrica, onde o enxerto do Grupo Autógeno apresentou diferença estatisticamente significativa na neoformação óssea quando comparado ao Grupo Biomaterial.

Os achados histológicos foram confirmados pela imunomarcação das proteínas osteopontina (OP) e osteocalcina (OC). Onde a marcação do OP foi intensa em 30 dias no AG e leve no BG, mostrando atividade osteoblástica precoce no grupo autógeno. O atraso na incorporação do biomaterial é confirmado dentro de 60 dias quando o AG mostrou intensa expressão de osteocalcina, indicando maturação óssea e a BG mostrou leve expressão dessa proteína, o que representa a formação de um tecido imaturo nesse período. Em um estudo anterior publicado (DE FREITAS SILVA, 2017) sobre defeitos críticos em calvárias de ratos preenchidos com osso autógeno ou biomaterial de β -TCP, os autores avaliaram a imunocoloração de osteocalcina no período de 30 e 60 dias e observaram que o grupo autógeno apresentou maior expressão proteica em 60 dias, indicando maior maturação do tecido ósseo neoformado quando comparado ao biomaterial, o que também foi encontrado neste estudo.

Considerando o leito doador, a tíbia do coelho foi utilizada para coletar o enxerto autógeno. O motivo está relacionado à baixa morbidade pós-operatória e à facilidade da técnica cirúrgica em relação a outros locais doadores. Em particular, a obtenção de osso da calvária de coelho deixa a dura-máter exposta devido à incapacidade de separar as tábuas ósseas corticais externa e interna. A tíbia é caracterizada principalmente por osso cortical, com presença de canal intra-medular. Portanto, devido à sua composição, a tíbia poderia ser utilizada para recuperar tecido ósseo na forma de blocos, com espessura adequada para reconstruções ósseas (MICELI, 2016). Por outro lado, com o objetivo de reduzir a morbidade associada ao procedimento para a obtenção, a pesquisa tem sido direcionada ao uso de substitutos ósseos. Entre a ampla gama de biomateriais, a biocerâmica sintética está ganhando espaço no cenário clínico como alternativa aos enxertos ósseos autógenos nas reconstruções maxilo-faciais (ANTUNES, 2013; YUAN, 2002). Este estudo avaliou a incorporação de biomaterial à base de β -TCP associado a hidroxiapatita em comparação com enxerto ósseo autógeno em blocos instalados em mandíbulas de coelhos, a fim de

simular situações clínicas críticas de necessidade de aumento horizontal das cristas alveolares mandibulares, quando existem limitações para obter enxerto ósseo autógeno.

A biocompatibilidade e biofuncionalidade da biocerâmica de fosfato de cálcio na substituição do tecido ósseo foram avaliadas *in vivo* (BODDE, 2007). Concluiu-se que HA e β -TCP foram progressivamente reabsorvidos e substituídos por osso neoformado, atuando como um arcabouço que poderia ser colonizado favoravelmente por células osteogênicas. O β -TCP isolado na sua forma monofásica foi comparado à cerâmica bifásica de fosfato de cálcio contendo HA / β -TCP em uma proporção de 75:25 no processo de reparo ósseo trabecular em modelo animal (MICELI, 2016). A análise histomorfométrica demonstrou que 36% do β -TCP isolado foi absorvido em 26 semanas, enquanto o grupo HA / β -TCP se manteve intacto. A neoformação óssea ocorreu em ambos os grupos, porém maior quantidade de volume ósseo periférico foi observada no grupo cerâmica bifásica. Portanto, concluiu-se que ambos os substitutos ósseos eram biocompatíveis e se caracterizavam por um potencial osteocondutor satisfatório; no entanto, a biodegradação do β -TCP foi mais rápida alterando o volume que deveria ser mantido (ANTUNES, 2013). O presente estudo avaliou e comparou qualitativa e quantitativamente a incorporação do enxerto ósseo autógeno versus um biomaterial sintético a base de HA / β -TCP na proporção de 60:40. Foi observado que o biomaterial sofreu reabsorção gradual seguida de aposição do tecido ósseo. Entretanto, mesmo aos 60 dias de pós-operatórios, foi possível detectar uma certa quantidade considerável de substituto ósseo em contato com o osso recém-formado e o leito receptor e menor quantidade de tecido ósseo neoformado.

A capacidade das biocerâmicas em carrear células osteoblásticas ocorre principalmente devido as suas características estruturais. A porosidade que apresenta o biomaterial sintético a base de β -TCP é em torno de 70%. Isso permite uma grande área superficial com a presença de vários sítios de ligações proteicas viáveis na superfície gerando assim a possibilidade de um maior número de células osteoblásticas pré-inseridas no biomaterial, permitindo que esta adesão ocorra de forma mais estável (ZHU, 2010). Outro fator a ser considerado é o diâmetro dos poros. Outro fator a ser considerado é o diâmetro dos poros. Estudos têm demonstrado que arcabouços construídos com poros amplos e de volume acessível ($>200 \mu\text{m}$) exibem aumentada proliferação e diferenciação osteoblásticas através do material, como resultado na capacidade de transporte de oxigênio e nutrientes, bem como a revascularização

(KHUE, 1994). O mesmo conceito pode ser aplicado aos biomateriais à base de fosfato de cálcio, nos quais a presença de poros permite a migração e proliferação de osteoblastos e células mesenquimais juntamente com o processo de revascularização necessário para promover a formação óssea. Além disso, uma superfície porosa melhora a interconexão entre o biomaterial e o tecido ósseo circundante, criando uma alta estabilidade mecânica da interface osso-biomaterial do receptor (KARAGEORGIU, 2006). O MEV-EDS mostrou uma macroporosidade $> 100\mu\text{m}$ do biomaterial sintético empregado no presente estudo constituindo aproximadamente 45% de sua composição, facilitando assim as trocas biológicas necessárias para o processo osteogênico. Por outro lado, essa porosidade levou a dificuldades técnicas durante a estabilização do enxerto no leito receptor durante a cirurgia experimental. Foi necessária uma força maior para apertar os parafusos durante a fixação do enxerto, com o risco de desenvolver rachaduras e fraturas dos blocos. Consequentemente, foi dada atenção especial ao fixar o biomaterial no osso receptor, a fim de evitar fraturas pela fixação durante os períodos intra e pós-operatório.

Um estudo anterior (HOROWITZ, 2009) avaliou o β -TCP como substituto ósseo na preservação da crista alveolar para posterior inserção de implantes em humanos. As dimensões da crista foram medidas antes do procedimento de enxertia e após o período de cicatrização de 6 meses, onde durante o segundo estágio cirúrgico foi realizada a obtenção de amostras teciduais e posterior instalação dos implantes. A reabsorção alveolar de aproximadamente 9% ocorreu durante o período de reparo, onde após 6 meses, a avaliação histológica mostrou reabsorção completa do biomaterial, substituída por osso vital de boa qualidade e quantidade, o que permitiu uma inserção adequada do implante. Isso pode ressaltar as propriedades osteocondutivas do biomaterial associadas a um alto nível de solubilidade. Nesse sentido, o mesmo padrão foi observado durante a análise histológica do presente estudo. No entanto, deve-se notar que neste estudo o biomaterial foi utilizado em uma situação clínica mais desafiadora, como enxerto em bloco aposicional com intuito aumentar a espessura óssea, e não como material de preenchimento de defeitos que favorecem sua manutenção como procedimentos de preservação alveolar.

Histologicamente, aos 30 e 60 dias pós-operatórios, os animais que receberam o biomaterial de β -tricálcio fosfato apresentaram alto potencial osteocondutivo do bloco sintético, associado ao alto nível de solubilidade demonstrado por uma perda

significativa do volume do enxerto. A reabsorção do enxerto em bloco foi principalmente evidente nas amostras de 60 dias. Desde os estágios iniciais, o biomaterial apresentou boa biocompatibilidade e integração ao leito receptor, sem interposição de tecido fibroso conjuntivo. A formação óssea recente foi evidente tanto nas regiões externa quanto interna do enxerto. Com base nos achados colhidos no presente estudo, os enxertos ósseos autógenos ainda devem ser considerados a primeira opção no caso de reconstrução maxilofacial devido ao alto potencial osteogênico intrínseco.

6. CONCLUSÃO

O biomaterial em bloco de β -tricálcico fosfato associado a hidroxiapatita avaliado no presente estudo experimental serviu como arcabouço promovendo a neoformação óssea na área enxertada, evidenciando sua propriedade osteocondutora. No entanto, houve um atraso no seu processo de incorporação quando comparado ao enxerto autógeno em bloco.

REFERÊNCIAS

- ALBREKTSSON T, JOHANSSON C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **Eur Spine J.** 2001; 2: S96-101.
- ALEXANDER, JW. Bone grafting. **Vet Clin North Am Small Anim Pract** 1987; 17: 811- 9.
- ANTUNES AA, OLIVEIRA NETO P, DE SANTIS E, CANEVA M, BOTTICELI D, SALATA LA. Comparisons between Bio-Oss ® and Straumann® Bone –Ceramic in immediate and staged implant placement dogs mandible bone defects. **Clin Oral Implants Res.** 2013; 24:135-42.
- ATEF M, OSMAN AH, HAKAM M. Autogenous interpositional block graft vs onlay graft for horizontal ridge augmentation in the mandible. **Clin Implant Dent Relat Res.** 2019; 21:678-685.
- BEST SM, PORTER AE, THIAN ES, HUANG JJ. Bioceramics: past, present and for the future. **EurCeram Soc** 2008; 28:1319-2.
- BODDE EW, WOLKE JG, KOWALSKI RS, JANSEN JA. Bone regeneration of porous beta-tricalcium phosphate (conduit TCP) and biphasic calcium phosphate ceramic (BioSel) in trabecular defects in sheep. **J Biomed Mater Res A** 2007; 82:711-22.
- DACULSI G, JEGOUX F, LAYROLLE P. The micro macroporous biphasic calciumphosphate concept for bone reconstruction and tissue engineering. In: Basu B, Katti DS, Kumar A, editors. *Advance biomaterials: fundamentals processing and applications.* New York: **Wiley-American Ceramic Society** 2009; p.101–42.
- DE AZAMBUJA CARVALHO PH, DOS SANTOS TRENTO G, MOURA LB, CUNHA G, GABRIELLI MAC, PEREIRA-FILHO VA. Horizontal ridge augmentation

using xenogenous bone graft-systematic review. **Oral Maxillofac Surg.** 2019; 23:271-279.

DE FREITAS SILVA L, DE CARVALHO REIS ENR, BARBARA TA, BONARDI JP, GARCIA IR JUNIOR, DE CARVALHO PSP, PONZONI D. Assessment of bone repair in critical-size defect in the calvarium of rats after the implantation of tricalcium phosphate beta (β -TCP). **Acta Histochem.** 2017; 6:624-631.

ESPOSITO M, GRUSOVIN MG, FELICE P, KARATZOPOULOS G, WORTHINGTON HV, COULTHARD P. The efficacy of horizontal and vertical bone augmentation procedures for dental implants - a Cochrane systematic review. **Eur J Oral Implantol.** 2009; 2:167-84.

GALLINETTI S, CANAL C, GINEBRA MP, FERREIRA J. Development and Characterization of Biphasic Hydroxyapatite/ β -TCP Cements. **J Am Ceram Soc** 2014; Apr;97(4):1065-1073.

HOROWITZ RA, MAZOR Z, MILLER RJ, KRAUSER J, PRASAD HS, ROHRER MD. Clinical evaluation alveolar ridge preservation with a beta-tricalcium phosphate socket graft. **Compened Contin Educ Dent** 2009; 30:588-90.

JENSEN S, BROGGINI N, HJØRTING-HANSEN E, SCHENK R, BUSER D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. **Clin Oral Implants Res.** 2006;17(3):237-43.

KAKAR A, KAKAR K, SRIPATHI RAO BH, LINDNER A, NAGURSKY H, JAIN G, PATNEY A. Lateral alveolar ridge augmentation procedure using subperiosteal tunneling technique: a pilot study. **Maxillofac Plast Reconstr Surg.** 2018; 1:3.

KAKAR A, RAO BHS, HEGDE S, DESHPANDE N, LINDNER A, NAGURSKY H, PATNEY A, MAHAJAN H. Ridge preservation using an in situ hardening biphasic

- calcium phosphate (β -TCP/HA) bone graft substitute-a clinical, radiological, and histological study. **Int J Implant Dent.** 2017;3(1):25.
- KAMM T, KAMM S, HEPPT W. Bone substitutes used for sinus lift. **HNO.** 2015; 63:481-8.
- KARAGEORGIU V, KAPLAN D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials** 2006; 27:5474-91.
- KHUE J, BARTL R, FRISCH B, HAMMER C, JANSSON V, ZIMMER M. Bone formation in coralline hydroxyapatite. Effects of pore size studied in rabbits. **Acta Orthop Scand** 1994; 65:246-52.
- LYE KW, DEATHERAGE JR, WAITE PD. The use of desmineralized bone matrix for grafting during Le Fort I and chin osteotomies: techniques and complications. **J Oral Maxillofac Surg** 2008; 66:1580-5.
- MANRIQUE N, PEREIRA CC, LUVIZUTO ER, SÁNCHEZ MP, OKAMOTO T, OKAMOTO R. Hypertension modifies OPG, RANK, and RANKL expression during the dental socket bone healing process in spontaneously hypertensive rats. **Clin Oral Investig.** 2015; 6:1319-27.
- MICELI ALC, PEREIRA LC, TORRES TDS, CALASANS-MAIA MD, LOURO RS. Mandibular Reconstruction with Lateral Tibial Bone Graft: An Excellent Option for Oral and Maxillofacial Surgery. **Craniomaxillofac Trauma Reconstr.** 2017; 4:292-298.
- OHAYON L. Maxillary sinus floor augmentation using biphasic calcium phosphate: a histologic and histomorphometric study. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2014; 5:1143-8.
- PALIN LP, POLO TOB, BATISTA FRS, GOMES-FERREIRA PHS, GARCIA JUNIOR IR, ROSSI AC, FREIRE A, FAVERANI LP, SUMIDA DH, OKAMOTO R.

Daily melatonin administration improves osseointegration in pinealectomized rats. **J Appl Oral Sci.** 2018; 6:10-26.

PEDROSA WF JR, OKAMOTO R, FARIA PE, ARNEZ MF, XAVIER SP, SALATA LA. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone graft remodeling. Part II: calvarial bone. **Clin Oral Implants Res.** 2009; 11:1254-64.

SCHMIDT LE, HADAD H, VASCONCELOS IR, COLOMBO LT, DA SILVA RC, SANTOS AFP, CERVANTES LCC, POLI PP, SIGNORINO F, MAIORANA C, CARVALHO PSP, SOUZA FÁ. Critical Defect Healing Assessment in Rat Calvaria Filled with Injectable Calcium Phosphate Cement. **J Funct Biomater** 2019; 13;10(2). pii: E21.

SHAMSODDIN E, HOUSHMAND B, GOLABGIRAN M. Biomaterial selection for bone augmentation in implant dentistry: A systematic review. **J Adv Pharm Technol Res.** 2019;10:46-50.

TEBYANIAN H. Effects of collagen/ β -tricalcium phosphate bone graft to regenerate bone in critically sized rabbit calvarial defects. **J Appl Biomater Funct Mater** 2019; Jan-Mar;17(1):2.

WAKIMOTO M, UENO T, HIRATA A, LIDA S, AGHALOO T, MOY PK. Histologic evaluation of human alveolar sockets treated with an artificial bone substitute material. **J Craniofac Surg** 2011; 22:490-3.

WANG Y, WANG K, LI X, WEI Q, CHAI W, WANG S, CHE Y, LU T, ZHANG B. 3D fabrication and characterization of phosphoric acid scaffold with a HA/ β -TCP weight ratio of 60:40 for bone tissue engineering applications. **PLoS One.** 2017 4:e0174870.

YAMADA, S.; HEYMANN, D.; BOULER, J.M.; DACULSI, S. Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate ratios. **Biomaterials** 1997; 18, 1037–1041.

YUAN H, VAN DEN DOEL M, VAN BLITTERSWIJK CA, DE GROOT K, DE BRUIJN JD. A comparison of the osteoinductive potential of two calcium phosphate ceramics implanted intramuscularly in goats. **J Mater Sci Mater Med** 2002; 13:1275-5.

ZHU XD, ZHANG HJ, FAN HS, LI W, ZHANG XD. Effect of phase composition and microstructure of calcium phosphate ceramic particles on protein adsorption. **Acta Biomater** 2010; 6:1536-41.

ANEXO – COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

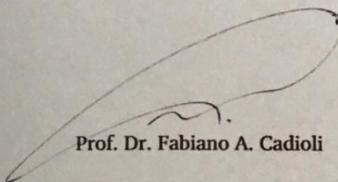
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Avaliação microscópica e histométrica de bloco hetenógeno integral em mandíbula de coelho" sob responsabilidade do Pesquisador ANA PAULA FARNEZI BASSI e colaboração de Paulo Sergio Perri de Carvalho e Emanuelle Teixeira Carrera está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo 00999-2011.

CERTIFICATE

We certify that the research Microscopic evaluation shall histometric block hetenogeno integral in jaw of rabbit", process number 00999-2011, under responsibility of ANA PAULA FARNEZI BASSI and with collaboration of Paulo Sergio Perri de Carvalho and Emanuelle Teixeira Carreta agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. Fabiano A. Cadioli

CEUA Coordinator