

ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO APÓS A IMPLANTAÇÃO DE ESFERAS DE
HIDROXIAPATITA CARBONATADA NANOESTRUTURADA CONTENDO 5 % de
ESTRÔNCIO EM LEVANTAMENTO DE SEIO MAXILAR DE COELHOS**

Helder Barreto Valiense

SALVADOR

2013

HELDER BARRETO VALIENSE

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO APÓS A IMPLANTAÇÃO DE ESFERAS DE
HIDROXIAPATITA CARBONATADA NANOESTRUTURADA CONTENDO 5 % de
ESTRÔNCIO EM LEVANTAMENTO DE SEIO MAXILAR DE COELHOS**

**Dissertação apresentada Programa de Pós-
graduação em Odontologia da Escola
Bahiana de Medicina e Saúde Pública, como
requisito para qualificação no Mestrado em
Odontologia, área de concentração
Implantodontia.**

Orientador: Prof. Dr. Maurício Barreto

SALVADOR

2013

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO APÓS A IMPLANTAÇÃO DE ESFERAS DE
HIDROXIAPATITA CARBONATADA NANOESTRUTURADA CONTENDO 5 % de
ESTRÔNCIO EM LEVANTAMENTO DE SEIO MAXILAR DE COELHOS**

HELDER BARRETO VALIENSE

Comissão Julgadora

Prof^a.Dr^aMônicaDiuanaCalasans Maia

Doutora em Patologia pela UFF

Professora Associado II da Disciplina de Cirurgia Bucal UFF

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFF

Prof^o.Dr. Fulvio Miguel

Professor Dr. da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Prof^aDr^a. Livia Pugliesi

Prof^a.Dr^a da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Suplente:

Prof^a.Dr^a Silvia Regina de Almeida Reis

Professora Adjunto da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

SALVADOR

2013

*Ensinar não é transferir conhecimento,
mas criar as possibilidades para a produção
ou a sua construção. Quem ensina aprende ao ensinar
e quem aprende ensina ao aprender.*

Paulo Freire

Dedico esta dissertação de mestrado a minha
Morena Gabriela, a minha pequena
Camilla, a meus pais e a todos aqueles que
contribuíram para a realização deste
trabalho.

Agradeço a Deus, por ter me oportunizado conhecer e conviver com pessoas fantásticas nesta minha caminhada.

A minha esposa Gabriela, pelo apoio sempre singular e importante, pelo amor, carinho e dedicação com que sempre conduziu a nossa família nos momentos de minha ausência. Te amo.

À moreninha Camilla, símbolo de amor incondicional e eterno.

Aos meus pais, Carlos e Vilma, pelo exemplo de vida e ensinamentos que carrego comigo com orgulho de tê-los como meus primeiros mestres, muito obrigado.

As minhas irmãs Helma, fonte inesgotável de amor e alegria, e Halana pela tranquilidade e beleza com que vive a vida.

Aos meus sobrinhos (filhos), pela alegria dos seus ensinamentos na ternura da criança e por fazer os meus dias tão especiais.

Ao meu sogro José Carlos e minha Sogra Dina Maria, pelo apoio incondicional e serenidade muitas vezes transmitida em momentos de descontração ou mesmo difíceis.

Ao amigo, parceiro e irmão Marcelo Teles, exemplo de caráter e dedicação à profissão, timoneiro mestre dessa minha jornada.

Rodrigo Resende, grande parceiro que com sua humildade, conhecimento e dedicação ao que faz, foi um grande incentivador.

A minha querida Silvia Albuquerque, pelo apoio incondicional, sabedoria e maneira sempre divertida e simpática com que nos conduziu.

Aos anestesistas Fábio, Maria Alice Guess e Douglas, que com dedicação, cuidado e zelo com os animais contribuíram de forma singular para a execução deste trabalho.

Agradecimentos especiais

Aos meus dois orientadores: Maurício Barreto pela confiança, apoio e maneira sempre carinhosa com a qual conduziu e lapidou o meu lado docente, meus sinceros agradecimentos; e à Doutora Mônica pelo carinho, atenção e retidão com que direciona seus alunos, sempre movida de uma alegria que contagia e contamina a todos - a senhora foi uma mãezona, obrigado!

INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS

BAHIANA
ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA



**Centro Brasileiro de
Pesquisas Físicas**

**Ministério da
Ciência, Tecnologia
e Inovação**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al	Alumínio
ANVISA:	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG	Células gigantes
Cl ⁻	Íon Cloro
(CO ₃) ⁻²	Íon Carbonato
Co	Cobalto
Cr	Cromo
Cu	Cobre
DEF	Defeito
DRX	Difração de Raios X
EVITF	Espectroscopia Vibracional do Infravermelho com Transformada de Fourier
F ⁻	Íon Flúor
Fe	Ferro
FHA	Fluorapatita
HA	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina e Eosina
ii	Infiltrado Inflamatório
LPC	Laboratório de Produção de Coelho
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Mg	Magnésio
NAL	Núcleo de Animais de Laboratório
NCHa	Nano hidroxiapatita carbonatada
NCHaSr	Nano hidroxiapatita carbonatada com Estrôncio
Ni	Níquel
Nm	Nanometro
ONF	Oso neoformado
OPE	Oso pré-existente
RGB	Do inglês Red, Green, Blue
Sr	Estrôncio
Sr ²⁺	Ion Estrôncio
TC	Tecido Conjuntivo
UFF	Universidade Federal Fluminense
VO ₄ ⁻³	Ion Vanadatos
Zn ²⁺	Zinco

LISTAS DAS ILUSTRAÇÕES

Figura 01 -A Visão do Laboratório de Produção de Coelho.....	38
Figura 02 –Bloco obtido da região envolvendo os seios maxilares.....	39
Figura 03– Procedimento realizado para anestesia geral	40
Figura 04 -Procedimento cirúrgico inicial.....	42
Figura 05–Sequência do procedimento cirúrgico.....	42
Figura 06 -Desenho esquemático de acesso aos seios maxilares.....	43
Gráfico 07 - Difratograma de raio-x comparativo dos Biomateriais.....	46
Gráfico 08 - Especto de Raio-x comparativo dos biomateriais.....	47
Figura 09 - Microscopia eletrônica de Varredura.....	48
Figura 10- Fotomicrografia da ncHA- 4 semanas.....	50
Figura 11 - Fotomicrografia da ncHA- 12 semanas.....	51
Figura 12 - Fotomicrografia da nSrcHA- 4 semanas.....	52
Figura 13 -Fotomicrografia da nSrcHA- 12 semanas.....	53
Gráfico14 -Gráfico representativo do biomaterial residual.....	54
Gráfico15 -Gráficorepresentativo do osso neoformado.....	54
Gráfico 16- Gráfico representativo do tecido conjuntivo.....	55

SUMÁRIO

Apresentação.....	11
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	12
Manuscrito I.....	13
Resumo.....	14
2. INTRODUÇÃO.....	15
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	26
<i>Abstract</i>	27
REFERÊNCIAS.....	28
Manuscrito II.....	32
Resumo.....	33
5. INTRODUÇÃO.....	34
6.MATERIAL E MÉTODO.....	36
6.1-Biomateriais.....	36
6.2- Caracterização dos biomateriais.....	36
6.2.1- Difração de Raio x.....	36
6.2.2- Espectroscopia Vibracional no Infravermelho com transformada de Fourier (EVFITR).....	37
6.3- Princípios éticos no estudo animal.....	37
6.4- Caracterização dos animais.....	38
6.5- Distribuição dos Grupos.....	38
6.6- Procedimento de Anestesia.....	39
6.7- Procedimento Cirúrgico.....	40
6.8- Medicação pós-operatória.....	43
6.9- Eutanásia dos animais e obtenção das amostras.....	43
6.10- Análise Histomorfométrica.....	44
6.11- Tratamento Estatístico dos Dados.....	45
7. RESULTADOS.....	46
7.1- Caracterização Físico-Química.....	46
7.1.1-Difração de Raio x.....	46
7.1.2- Espectroscopia Vibracional no Infravermelho com transformada de Fourier (EVFITR).....	47
7.1.3- Microscopia Eletrônica de Varredura.....	47
7.2 – Análise histomorfométrica.....	49
7.3 – Resultados Histomorfométricos.....	53
7.3.1 – Densidade de volume de biomaterial.....	54
7.3.2 - Densidade de volume de osso neoformado.....	54
7.3.3 - Densidade de volume de tecido conjuntivo.....	55
8. DISCUSSÃO.....	56
9. CONCLUSÃO.....	62
<i>Abstract</i>	63
REFERÊNCIAS.....	64
10. ANEXO.....	69

APRESENTAÇÃO

Este trabalho consiste em uma dissertação de mestrado, com área de concentração em Implantodontia, apresentado ao programa de pós-graduação em Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. O trabalho será dividido em duas partes. A primeira é uma revisão de literatura sobre o tema proposto sob a forma de Manuscrito I intitulado: Alterações estruturais da hidroxiapatita, suas implicações e possíveis benefícios biológicos. A segunda parte do trabalho consiste na pesquisa científica, apresentando informações acerca de resultados sob a forma do Manuscrito II intitulado: Avaliação do reparo ósseo após a implantação de esferas de hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada contendo 5 % de estrôncio em levantamento de seio maxilar de coelhos. Trata-se de um estudo inédito do tipo experimental cujo objetivo é avaliar a biocompatibilidade eo comportamento osteocondutor da hidroxiapatitananoestruturada contendo 5% de estrôncio e carbonatos à sua estrutura molecular.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A busca por biomateriais que apresentem taxa de bioabsorção e capacidade de regeneração óssea mais próximas do osso autógeno é fonte de intensa investigação científica. A hidroxiapatita(HA) é, sem dúvida alguma, o composto mais pesquisado e utilizado para esta finalidade. Apesar da HA ser constituída por partículas de dimensões nanométricas, os biomateriais comerciais à base desse composto não fazem uso de suas características nanoestruturadas, pois ao processá-lo para o uso clínico, o material passa por tratamentos térmicos em altas temperaturas, transformando-o num sistema cerâmico com partículas maiores que 100 nm. A sinterização melhora as propriedades mecânicas do material, porém anula as suas características nanoestruturadas, diminuindo sua atividade química e propriedade de bioabsorção quando em meio biológico. A substituição de íons cálcio por estrôncio está descrita na literatura. O efeito deste metal está associado ao potencial estimulador na formação óssea, portanto favorecendo a atividade osteoblástica, como também apresenta efeito inibidor da atividade osteoclastica, observado nos fármacos para tratamentos da osteopenia, tais como o ranelato de estrôncio. A adição de carbonatos à estrutura molecular da hidroxiapatita favorece a biodegradação da HA, sendo considerado um biomaterial com características semelhantes ao da apatita biológica e apresentando grau de bioabsorção superior ao da hidroxiapatita estequiométrica. Neste estudo foram utilizados fosfatos de cálcio com propriedades biomiméticas com relação à fase mineral do osso humano. Após a síntese o material não sofreu tratamento térmico (sinterização) mantendo as características nanoestruturadas do material original, favorecendo desta maneira a neoformação óssea por substituição ao biomaterial bioabsorvível.

O objetivo deste estudo é avaliar de forma descritiva e comparativa esferas de hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada com esferas de hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada contendo 5% de estrôncio implantadas em seio maxilar de coelhos.

MANUSCRITO I

**ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DA HIDROXIAPATITA: SUAS
IMPLICAÇÕES E POSSÍVEIS BENEFÍCIOS BIOLÓGICOS**

RESUMO

Para o tratamento e recuperação de defeitos ósseos que podem ter diferentes etiologias como traumas, infecções e malformações, uma série de estudos científicos visando à produção de materiais com características biológicas foi realizada ao longo desses anos. Diversos tipos de biomateriais são comumente utilizados na busca da regeneração óssea tanto no campo da medicina como também na odontologia, independente da sua origem - quer seja homogênea, xenógena ou mesmo sintéticos. Por apresentar similiariedade e composição química próximo do tecido ósseo natural, a hidroxiapatita vem sendo largamente estudada, principalmente sua composição sintética, visto que a isenta de questões religiosas bem como risco de transmissão de doenças ou mesmo resposta imunológica. Mudanças na composição da hidroxiapatita, com o intuito de otimizar sua capacidade osteocondutora favorecendo a biodegradação são motivos de estudo. O presente estudo pretende discutir as possíveis alterações catiônicas e aniônicas da hidroxiapatita, variações de temperatura, sua influência na morfologia do substrato formado e seu possível efeito modulador como biomaterial. Aqui deveria entrar a conclusão da sua revisão, como por exemplo a substituição por íons Sr, carbonato torna o material mais bioabsorvível, etc.

Palavras chaves: Hidroxiapatita; Biocompatibilidade; Reparo ósseo; Substituições catiônicas e aniônicas.

2. INTRODUÇÃO

A busca por substitutos ósseos com propriedades adequadas que favoreçam a regeneração óssea é um desafio para as ciências biomédicas, razão pela qual a literatura apresenta um crescente interesse por substitutos ósseos que possam apresentar maior similaridade com os tecidos mineralizados, especialmente os materiais sintéticos que mimetizam o osso natural humano¹. Partindo desse conceito, houve a integração multidisciplinar envolvendo grupos de pesquisas de diferentes especialidades, quer seja no campo das ciências biológicas, envolvendo a Medicina, a Odontologia e a Biologia como também nos das ciências exatas como a Física, a Química e a Engenharia, compondo duas grandes áreas - biotecnologia e a bioengenharia. Esta interação multi e interdisciplinar fortalece o desenvolvimento de pesquisas e uma constante busca por um material sintético ou semi-sintético que possa favorecer ou estimular o reparo ósseo de forma semelhante ao osso fisiológico.

Dentre os fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita (HA) tem sido amplamente utilizada como importante recurso para a substituição óssea e se distingue das demais cerâmicas à base de fosfato de cálcio por ser similar à porção inorgânica do tecido ósseo humano², constituindo cerca de 30 a 70% da massa dos ossos e dentes, sendo, portanto, o principal mineral dos tecidos mineralizados³. Seu equivalente sintético possui propriedades de biocompatibilidade e de osteocondução, porém apresenta como limitações a alta cristalinidade e a baixa taxa de absorção. Segundo Doi *et al.*⁴, a biocompatibilidade e a capacidade de reabsorção proporcional ao crescimento ósseo são características de grande relevância na escolha de um biomaterial como substituto ósseo.

A hidroxiapatita é um material inorgânico que tem como característica a biocompatibilidade, similaridade com estrutura óssea humana sendo um biomaterial largamente utilizado na Odontologia para preenchimento alveolar pós-extração, aumento de rebordo alveolar, defeitos periodontais e cirurgia de levantamento de seio maxilar⁵.

A HA pode apresentar um grande número de substituições isomórficas, ou seja, pode formar diversos derivados à custa da alteração de radicais na molécula base⁶. Essas substituições podem favorecer as atividades osteoindutora e osseocondutora, contribuindo, desta forma, para uma otimização do reparo ósseo.

Alguns autores⁷⁻⁹ sugeriram em seus trabalhos que a modificação estrutural desse versátil mineral, quer seja no radical catiônico, na hidroxila ou no grupo fosfato, por moléculas de estrôncio, carboxila ou zinco, respectivamente, altera a sua geometria estrutural obtendo melhor

comportamento nos estudos *in vivo*. Desta forma, o tamanho das partículas como estruturas nanométricas, bem como substituições de radicais na composição química do biomaterial tem sido objeto de intensa investigação, porém a literatura ainda não é conclusiva quanto aos benefícios oriundos dessas alterações estruturais, após tais modificações. O objetivo deste artigo é revisar as possíveis substituições isomorfométricas da hidroxiapatita, suas caracterizações assim como seu comportamento celular em meio biológico.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Com a perda do elemento dental, o osso alveolar tende a reabsorver, chegando, após seis meses, a uma perda de 60% do volume inicial¹⁰, podendo ainda estar acompanhada de outros agravantes, como pneumatização do seio maxilar, acarretando também deficiência em espessura e altura, implicando, desta forma, em comprometimento no planejamento de implantes osseointegrados, necessitando, para tanto, da aplicação de técnicas cirúrgicas reconstrutivas que viabilizam o seu tratamento¹¹. Além disso, o osso constitui o principal reservatório de cálcio do nosso organismo.

Por razões imunológicas, os enxertos autógenos são os que melhor atendem aos critérios de bio-histocompatibilidade, além de terem os melhores resultados quanto ao estímulo da regeneração óssea¹². Sua capacidade osteogênica efetiva torna o enxerto ósseo autógeno “padrão ouro” para as técnicas reconstrutivas, porém, a área doadora, seja ela intra ou extra oral, proporciona uma maior morbidade, aumenta o tempo cirúrgico, limita a quantidade óssea desejada e apresenta um custo mais elevado¹³, além da possibilidade do osso autógeno poder apresentar uma taxa de reabsorção que pode variar de 30 a 60 %, comprometendo assim a terapia com implantes osseointegrados¹⁴.

A única fonte de material que promove crescimento ósseo e apresenta as três propriedades importantes do enxerto é o osso autógeno, o qual promove a osteocondução— que consiste em crescimento por aposição do osso circunjacente e ocorre na presença de osso ou células mesenquimais indiferenciadas. Já a propriedade de osteoindução é caracterizada pela formação de osso novo a partir das células osteoprogenitoras, derivadas de células mesenquimais indiferenciadas sobre influência de agentes indutores que emanam de matriz óssea do enxerto e, por fim, a ação osteogênica que promove o crescimento ósseo derivado de células viáveis, transferidas dentro do enxerto¹⁰.

Os enxertos ósseos xenógenos são caracterizados por serem retirados de espécie diferente daquela do receptor, fabricados a partir da porção inorgânica do tecido ósseo de origem animal, e classificados como osteocondutores. Os principais animais utilizados são os bovinos podendo também ser retirados de suínos e eqüinos (refs). Em função da similaridade química entre tais materiais e a parte mineral óssea, os tecidos ósseos se ligam a eles, permitindo a osteocondução através do recobrimento por células ósseas.

Quando o material bioativo é implantado no corpo, uma série de reações bioquímicas e biofísicas ocorrem na interface implante/tecido. A interface de ligação das reações do biomaterial com o osso se faz por intermédio de uma ligação química e não física^{15,16}. Esse tipo de substituto ósseo apresenta como vantagens a grande quantidade disponível e a facilidade de manipulação. Porém, apresentam como desvantagens o risco de transmissão de doenças, resposta imunológica do hospedeiro e aspectos religiosos.

Os enxertos alógenos são obtidos de doadores humanos vivos ou de cadáveres, possuindo a vantagem de se evitar um segundo acesso cirúrgico, causando assim menor morbidade operatória, entretanto pode haver uma resposta imunológica exacerbada¹⁷, o que possibilita a transmissão de doenças, principalmente, o osso fresco congelado. Esse tipo de material é obtido de banco de ossos, com disponibilidade limitada, quando comparado com biomateriais sintéticos.

Os materiais sintéticos utilizados na regeneração incluem as cerâmicas de fosfato de cálcio sintéticas, dentre elas a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)¹⁸. Estudos científicos vêm avançando muito na busca e desenvolvimento de novos substitutos ósseos, utilizando esse fosfato como matriz cerâmica básica para ampliar a sua aplicação clínica visando a regeneração óssea, principalmente na área da odontologia e ortopedia¹⁹. Isso pode ser observado no quadro 01 que demonstra a relação entre os autores, diferentes substituições de radicais e temperaturas de síntese da HA.

Além desses estudos, há uma intensificação também de trabalhos que buscam a nanotecnologia como ferramenta promissora para a síntese de biomateriais que possam mimetizar as características físico-químicas deste substrato, pois nestas condições há uma maior semelhança com a apatita biológica, possibilitando assim uma maior interação e, conseqüentemente, uma maior bioreabsorção²⁰.

O termo nanotecnologia foi utilizado pela primeira vez em uma publicação científica no documento Norio Taniguchi 1974. A definição da palavra nano está associada a dimensões menores que 100 nm em uma de suas dimensões. Estes materiais podem mimetizar as propriedades de superfície dos tecidos naturais, apresentando ainda citocompatibilidade, propriedades mecânicas, elétricas, ópticas e magnéticas superior aos materiais convencionais²⁰.

Por apresentar excelente biocompatibilidade e por conduzir o osso neoformado por entre seus poros, trabalho recente têm demonstrado que a hidroxiapatita nanoestruturada (NanoHA), apresenta

tamanho e morfologia da apatita biológica, isso porque nesse formato os cristais estão mais próximos da sua estrutura, melhorando assim sua osteocondutividade⁷.

Quadro 1 - Tipos de substituições descritas na literatura para as hidroxiapatitas de acordo com o ano e autores.

Autor	Ano	Modelo	Análises	Tipo de substituição	Método químico	Material	Resultado
Doi et al.	1999	<i>In vitro</i>	DRX, MEV		Úmido	α -TCP, CA, TeCP, HA, β -TCP, DCPD, OCP	Conclui que a carbonatoapatita apresenta uma resposta biológica mais favorável quando comparada com a Ha.
Landhia et al	2003	<i>In vivo</i>	DRX, EFT-IR, MEV	Substituição na Hidroxila e no grupo fosfato.	Úmido	HA / CHa	As CHa apresentaram Biocompatibilidade, maior ação osteocondutora e bioreabsorção em relação a Ha.
Bigi et al.	2007		DRX, MET,	Catiônica: Ca / Sr	Síntese Direta em meio aquoso	HA	A incorporação de Sr. Provoca mudanças na morfologia e na cristalinidade.
O'donnell et al.	2008		DRX, Ramam, Rietveld	Catiônica Substituição Ca/ Sr	Úmido	HA	
Calasans-Maia et al.	2008	<i>In Vivo</i>	Histomorfometria	Catiônica Substituição De Ca/ Zn	Úmido	HA	Otimização Na Formação Óssea
Keiichi et al.	2009	<i>In vivo</i>	Micro CT e Histologia HE		Úmido	CHa, HA	A baixa temperatura de síntese é um fator que pode interferir na textura superficial, favorecendo a adesão celular.
Takeuchiet et al.	2009	<i>In vitro</i>	MEV, XDR, EFT-IR	Temperatura 100,150,200°C	Hidrotermal	CHa-(α -TCP + H ₂ O destilada)	Foi observado que o teor de carbonatos diminui com o aumento da temperatura, alterando assim a cristalinidade.
Machado et al.	2010	<i>In vivo</i>	Histomorfometria	Catiônica Substituição Ca/ Sr		HA SrHa	Melhor resposta reparadora para as amostras com Sr.
Habibovic et al.	2010	<i>In vivo</i>	EFT-IR,DRX Histomorfometria,	Substituição na OH e PO ₄		CHa	Maior formação óssea para a carbonato apatita do tipo A.
Montazelli et al	2010	<i>In vitro</i>	XRD,EFT-IR,MEV, SELETIVA DE F	Hidroxila / Flúor	Hidrotermal	HA	Efeito Estimulante Para Proliferação Celular Quanto Para Depósito De Matriz Extra-Celular De Cálcio.
Kim et al.	2010	<i>In vivo</i>	MEV, EFT-IR E Histomorfometria	Comparação entre Cha Sintética e Xenógena.		CHa	Significativamente maior comprimento de contato e área de tecido ósseo neoformado na Ca Sintetica em comparação com a Ca Bovina.
Zang et al.	2011	<i>In vitro</i>	DRX, FT-IR,FRX	Catiônica: Cálcio/ Sr		HA,Silicato de Ca e de boro	Conclui que a presença de Sr muda a degradação até a química de degradação, para os três biomateriais testados.
Li et al.	2010	<i>In vivo</i>	MEV, DRX, Microscopia de Força Atômica, Espectroscopia de fotoelétrons.	Catiônica: Ca/ Sr	Sol / Gel	HA	A incorporação de Sr no revestimento do implante apresentou melhor osseointegração quando comparados com os revestidos por Ha. O autor sugere o revestimento de implantes com SrHA para melhorar a fixação de implantes em osso osteoporótico.
Ramlil et al.	2011	<i>In vitro</i>	DRX, EFT-IR		Úmido	HA	Utilização da quitosana na síntese da HA para obtenção de cerâmicas nanoporosas.
Li et al.	2012	<i>In vitro</i>	EFT-IR, DRX, Microscopia eletrônica de Varredura(SEM)	Substituição da Hidroxila por carbonatos	Úmida	HA e Carvão ativio	As carbonatoapatitas porosas apresentam bioatividade mais elevada que as HA convencional

Quando em presença de meio biológico, os biomateriais são classificados de acordo com a sua resposta frente aos tecidos em: bioinertes, bioativos, bioreativos, bioestável, biocompatível, biotolerante e biofuncional². As cerâmicas bioinertes têm como característica não estabelecer ligação química com o tecido como a alumina e a zircônia, enquanto as bioativas possuem a

propriedade de estimular uma resposta biológica específica na interface do material, tendo como resultante a formação de uma ligação química com o tecido, como a hidroxiapatita²⁰. Após a implantação *in vivo* deste tipo de material, uma série de reações bioquímicas e biofísicas ocorrem na interface implante/tecido. Essas reações, eventualmente, resultam em ligação interfacial de natureza química e não física^{15,16}.

A alumina, zircônia, fosfato tricálcio, vidros bioativos, vidros cerâmicos e a hidroxiapatita - por apresentarem propriedades biocompatíveis são materiais de escolha em inúmeras aplicações médicas. Esses materiais em meio biológico podem apresentar duas propriedades, a saber; bioinertes, ou seja, não apresentam nenhuma ligação química com os tecidos, como a alumina e a zircônia, ou mesmo apresentarem propriedade de estimular uma resposta biológica específica, resultando numa ligação química com o tecido; característica essa atribuída aos materiais bioativos, como: vidros bioativos, hidroxiapatita sintética e animal e compósitos bioativos²¹.

A exemplo de materiais bioativos estão o titânio, nióbio e tântalo que são largamente utilizados na ortopedia como também na implantodontia, esses metais adquirem a bioatividade após um tratamento de ativação da superfície e estão situados entre o limite dos materiais bioinertes e bioativos². Os materiais biofuncionais são indicados quando a sua aplicação está diretamente relacionada com a função à qual se destina²², as propriedades quer seja: mecânicas, químicas, ópticas e elétricas, não podem provocar ou estimular reações alérgicas ou inflamatórias². Os materiais relacionados com essas características de funcionabilidade apresentam características para uma dada função, porém podem ser inadequados se indicados para outra aplicação². Os biotoleráveis apresentam como características o encapsulamento por tecido fibroso e não podem ser eliminados pelo corpo como por exemplo²³.

Os compósitos quando submetidos a altas temperaturas apresentam produtos com baixa biocompatibilidade com os tecidos vizinhos, podendo até bloquear o potencial osteoindutor das células resistentes¹⁹. A temperatura e o tempo de sinterização, porosidade, rugosidade superficial, tamanho dos grãos parecem ser variáveis importantes em relação à bioabsorção (refs). Um dos métodos mais utilizados para síntese da hidroxiapatita é a precipitação, que envolve reações por via úmida, via seca e hidrotermal²⁴.

Os métodos úmidos apresentam duas vias de reação: a de ácido-base e a entre sais de fosfatos. Nesse tipo de síntese, o produto é um pó de partículas pequenas e cristalinidade similar aos tecidos naturais⁶. Através destas reações podem-se preparar materiais com diferentes morfologias, estequiometria e diferentes cristalinidades²¹, representada pela tabela abaixo:

Tabela 1: Tipos de reações e substratos utilizados para obtenção da hidroxiapatita através das duas reações utilizando o método úmido.

VIA ÚMIDA	
Reação Ácido- Base	Reação Sais de Cálcio
$10\text{Ca}(\text{OH})_2 + 6 \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 18\text{H}_2\text{O}$	$10\text{CaCl}_2 + \text{Na}_2\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 12\text{NaCl} + 8\text{HCl}$

Tabela 2: Reação e substratos utilizados para obtenção da hidroxiapatita utilizando o método seco.

VIA SECA
$6 \text{CaHPO}_4 + 2 \text{H}_2\text{O} + 4 \text{CaCO}_3 \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 4 \text{CO}_2 + 14 \text{H}_2\text{O}$

O método hidrotermal consiste em um método idêntico à via úmida submetido à pressão e temperatura. O produto final é um pó com dimensões nanométricas ou micrométrico sendo possível a obtenção de materiais com porosidade similar às HA obtidas de corais²³. Por esta via, pode-se também obter diversas morfologias e formatos, assim como materiais de densos a extremamente porosos²⁴.

A superfície dos biomateriais pode ser alterada quanto à sua topografia, facilitando a adesão celular e dos tecidos a esta superfície. Estudos mostram que, em testes de cultura de células, a adesão celular foi maior em superfície rugosa²⁴. Corroborando, Granjeiro *et al* (2004)²⁵, afirmaram que os materiais sintéticos vêm revolucionando os campos da pesquisa e tratamento, pois podem apresentar diferentes formas (pó, partículas, pastilhas ou blocos) tamanhos, texturas, graus de porosidades (macro ou microporoso) e cristalinidades (cristalino ou amorfo) e presença de uma ou mais fases cristalinas e solubilidade.

Takeuchi *et al*²⁶ avaliaram em seu estudo a influência de diferentes temperaturas a 100, 150 e 200⁰ C sobre a cristalinidade da hidroxiapatita carbonatada preparada através do método hidrotermal e concluíram que o teor de carbonatos diminui com o aumento da temperatura, e isso influencia de

forma direta o grau de cristalinidade, ou seja, a temperatura tem efeito direto na cristalinidade, modificando assim a morfologia microscópica desses compósitos. Keiichiet *al*²⁷ concluíram que a baixa temperatura de síntese é um fator que pode contribuir com a textura superficial das hidroxiapatitas carbonatadas melhorando tanto sua biodegradabilidade como também pode se comportar como carreador de fator de crescimento, ampliando, dessa forma, suas características e aplicação clínica. Barroset *al*²⁸ concluíram em seu trabalho que a hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada sintetizada a 5^oC quando comparada com a hidroxiapatita sintetizada a 90^oC apresenta uma melhor taxa de bioabsorção, citocompatibilidade e biocompatibilidade concluindo que a baixa temperatura de síntese influencia na resposta biológica.

Uma das vantagens das biocerâmicas à base de fosfatos de cálcio utilizadas como enxertos ósseos, é que tanto os íons cálcio quanto os íons fosfatos não interferem na função celular e fisiológica dos tecidos adjacentes, proporcionando uma resposta tecidual favorável ao tratamento²⁷. Uma outra substituição que a hidroxiapatita pode sofrer é na hidroxila que apresenta como característica uma ligação fraca, podendo ser facilmente substituída por íons halogênicos ou carbonatos. Esta alteração iônica pode modificar as propriedades da apatita, e essas trocas iônicas podem ocorrer por meio de três reações: as de meio aquoso em baixa temperatura que envolvem apatitas bem cristalizadas, as que envolvem as apatitas nanocristalinas e as reações que ocorrem em altas temperaturas²⁹.

A solubilidade, estabilidade térmica e reatividade superficial da hidroxiapatita, está diretamente relacionada com o grande número de substituições isomórficas que ela pode sofrer²⁶, podendo assim apresentar alterações de seus radicais por diversos metais, tais como: Zn⁺², Fe⁺², Cu²⁺, Mg²⁺, Al, Ni, Cr, Co, Sr, (Tabela 3) os quais modificam o cálcio, F⁻, Cl⁻ ou o (CO₃)⁻², substituem a hidroxila e o ânion como o VO₄⁻³ ou CO₃⁻², o grupo fosfato²¹. Autores como Narasarajuet *al*¹⁸, citam o I⁻ e AsO₄⁻³, como substitutos para hidroxila e grupo fosfato, respectivamente. As modificações desses radicais podem ser realizadas através dos métodos úmido, seco ou hidrotermal. Essas substituições modulam as características físico-químicas e biológicas no composto formado por essas modificações. Zafleet *al*³⁰ concluíram em seu estudo que a liberação de íons parece ser um fator importante na capacidade osteoindutora. Em 2005, os mesmos autores afirmaram em outro estudo que o processo de fabricação pode influenciar na cristalinidade, alterar a composição química do composto formado dependendo diretamente das matéria primas iniciais, sendo que a liberação dos íons teria um papel direto com a capacidade osteoindutora do material.

Tabela 3: Principais substituições na estrutura das hidroxiapatitas, suas fórmulas moleculares e parâmetro de rede.

Nome	Fórmula Molecular	Parâmetro de rede (nm) ac	
Hidroxiapatita de Bário	Ba ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	1,019	0,770
Hidroxiapatita de Cádmio	Cd ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	0,901	0,661
Hidroxiapatita de Cálcio	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	0,942	0,688
Hidroxiapatita de Estrôncio	Sr ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	0,976	0,728
Hidroxiapatita de chumbo	Pb ₁₀ (PO ₄) ₆ Cl ₂	1,047	0,743
Hidroxiapatita de chumbo Fluorapatita	Pb ₁₀ (PO ₄) ₆ F ₂	1,047	0,743
Carbonato Apatita	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ CO ₃	0,956	0,687
Hidroxiapatita de zinco 5%	Ca _{9,5} Zn _{0,5} (PO ₄) ₆ (OH) ₂	0,9422	0,6855

A substituição por carbonatos pode ocorrer tanto na hidroxila, como também no radical fosfato, sendo denominado, portanto como tipoA e tipoB respectivamente^{32,33}. Landia *et al*³³, em seu estudo em 2003, afirmaram que a presença de carbonatos na rede da HA do tipoB causou uma redução na cristalinidade e consequentemente um aumento da solubilidade tanto *in vitro* como *in vivo*, com uma maior presença de osso neoformado e efeito osteoindutor no interior dos macroporos das hidroxiapatitas carbonatadas sintéticas quando comparadas com a hidroxiapatita estequiométrica.

Segundo Doi *et al*⁴, aglomerados de hidroxiapatita carbonatada apresentam características que podem ser comparadas favoravelmente com as características dos ossos, especialmente com relação ao comportamento em meio ácido.

A hidroxiapatita carbonatada apresenta uma resposta biológica mais favorável como substituto ósseo, visto que a presença de carbonatos na estrutura da rede da apatita aumenta a reatividade química contribuindo com uma reabsorção no tecido ósseo mais facilitado. Habibovic *et al*³², observaram um crescimento no nível de carbonatação na hidroxiapatita carbonatada do tipoA, apresentando uma maior cristalinidade, taxa de dissolução significativamente aumentada e concentração de cálcio 1,5 vezes maior quando comparado com a hidroxiapatita carbonatada do tipoB, sugerindo que os eventos *in vivo* e que os eventos de dissolução/reprecipitação que resultam na formação de apatitas biológicas são mais acentuadas nas cerâmicas teoricamente menos solúveis.

Em estudo piloto preliminar em defeitos não críticos em calvária de ratos, utilizando hidroxiapatita estequiométrica nanoestruturada (controle) e hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada, observou-se que as análises microscópicas apresentaram neoformação óssea, ausência de processo inflamatório e presença de biomaterial somente no período de uma semana para o grupo

experimental. Dentro dos limites desta análise, os autores concluíram que a hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada é biocompatível, absorvível e com características osteocondutoras, podendo ser indicada como material substituto ósseo³⁴.

Há também uma diferenciação entre carbonatos sintéticos e de origem animal, como observado por Kim *et al*³⁵ em seu estudo *in vivo*, que observou a interface entre osso novo e biomaterial nos três períodos experimentais e concluiu que foi significativamente maior a quantidade de osso novo no grupo sintético do que nos derivados xenógenos. Os dois substitutos ósseos particulados compartilham propriedades similares e têm micro-estruturas diferentes. Sendo assim, o autor sugere que as porosidades em substitutos particulados podem ter influência na neoformação óssea.

Montazeri *et al*³⁶, obtiveram amostras da HA e fluorapatita (FHA) sintetizadas através da incorporação de flúor na estrutura pelo método hidrotermal. Foi verificado, *in vitro*, que a eficiência do flúor reduzia com o aumento do seu teor e que houve um aumento da cristalinidade dos pós fluoretados em comparação com a hidroxiapatita pura. A substituição por íon fluoreto mostrou ter efeito estimulante tanto para a proliferação celular quanto para o depósito de matriz extracelular de cálcio pelas células expostas ao extrato.

O cálcio pode ser um incentivo necessário para a reabsorção osteoclástica. Diminuindo sua concentração pode haver uma diminuição da atividade dos osteoclastos⁴. Além das substituições das hidroxilas e fosfatos, a hidroxiapatita permite também substituições no grupo do cálcio. Os autores^{9,37,38} sugerem em seus estudos que a substituição do Ca^{+2} por metais, tais como Zn^{2+} e Sr^{2+} , aumenta a sua estabilidade estrutural e a dissolução deste composto.

O zinco tem importante papel no processo de formação óssea, sua presença promove um efeito osteocondutor melhorado, tendo portanto um efeito estimulatório para neoformação óssea e inibição osteoclástica⁹. Porém, sua atividade osteoindutora ainda não está confirmada. Um estudo recente avaliou a ação osteoindutora da hidroxiapatita contendo 5% de zinco em sítio intramuscular e subcutâneo em abdômen de coelhos, não apresentando tecido ósseo formado após 12 semanas de implantação³⁹.

Um outro metal também utilizado como substituto do cálcio é o metal estrôncio que faz parte da mesma família química do zinco, sendo portanto membro dos alcalinos terrosos, apresentando

assim a mesma valência $+2$, onde cada íon de cálcio removido é substituído por um de estrôncio. A simples mudança destes radicais já interfere na degradação. O tipo de ligação química e arranjo dos átomos que compõem os materiais cerâmicos estão diretamente relacionado à sua estrutura e composição^{21,36}.

Uma melhor bioatividade de superfície foi alcançada com a incorporação do Sr na HA, o resultado parece estar vinculado a um equilíbrio entre promoção e inibição de vários processos bioquímicos³², porém concentrações maiores podem inibir a proliferação, tendo assim um efeito inibidor e prejudicial. Corroborando, Machado *et al*³⁷ indicaram que o Sr incorporado a HA obteve melhores propriedades físico-químicas e de biocompatibilidade quando comparada com o biomaterial sem esse metal, sugere também que novos estudos com diferentes concentrações se faz necessário.

O estrôncio também pode ser incorporado no revestimentos de implantes para melhorar a fixação em ossos osteoporóticos, visto a larga utilização do ranelato de estrôncio em pacientes comprometidos com essa enfermidade (ref). Li *et al*⁴⁰, observaram em seu estudo *in vivo* em ratos que após 12 semanas houve uma melhora da osteointegração de implantes revestidos com hidroxiapatita contendo estrôncio, quando comparadas com os implantes revestidos de hidroxiapatita.

A busca por um biomaterial ideal continua motivando e galgando avanços importantes na bioengenharia e biotecnologia de materiais. Estudos científicos vêm avançando muito na busca e desenvolvimento de novos substitutos ósseos. A hidroxiapatita tem um maior destaque visto que é uma cerâmica que pode sofrer modificações estruturais, entretanto os aspectos e possíveis benefícios oriundos destas modificações ainda não são conclusivos. Desta forma fica claro que alguns fatores relacionados com o seu processamento, tais como: baixa temperatura de síntese, não sinterização do material, substituições de radicais, concentração destes substitutos, macroporosidade e topografia superficial modulam a um substrato com melhores propriedades osteocondutoras, otimizando assim os benefícios e ampliando as vantagens das hidroxiapatita.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A regeneração óssea é um processo complexo e contínuo que objetiva uma restauração anatômica e funcional. Inúmeros eventos ocorrem quando um determinado biomaterial entra em contato com o ambiente biológico. Fatores que podem intensificar, melhorar ou mesmo otimizar a resposta tecidual são objetos de intensa investigação científica, visto que modificações estruturais como mudanças de um ou mais radical, temperatura, e tipo de reação aplicada para a síntese deste material, irão interferir diretamente em sua cristalinidade, degradação e capacidade osteocondutora. Sendo assim, a investigação, a pesquisa e o entendimento destas interações moleculares e celulares ao redor do biomaterial são fontes inesgotáveis de estudo. Parece estar claro que a aplicabilidade deste importante substrato - a hidroxiapatita - em condições estruturais nanométricas apresenta capacidade osteocondutoras melhoradas, bem como mudanças em seus radicais quer seja no sítio catiônico, aniônico ou na hidroxila, representa um ganho maior quanto à formação óssea. No entanto valores elevados de quaisquer substitutos têm efeito inibitório. Quantificar quais são os valores ideais que podem ser incorporados à estrutura molecular da hidroxiapatita a fim de otimizar sua aplicação clínica parece ser o desafio motivador que rege os principais centros de estudos de biomateriais.

ABSTRACT

For bone defect treatment and recuperation that can have different etiologies such as traumas, infections and malformations, a series of scientific studies have been done over the years in order to produce material with biological features. Several types of biomaterials are generally used for bone regeneration search both in the medical field as well as in dentistry, regardless the origin either allogeneic, xenogenous or even synthetic. Because of its similarity and chemical composition that are close to the ones from natural bone tissue, hydroxyapatite has been widely used, mainly the synthetic composition, that avoids religious issues and the risk of diseases transmission or even immunologic response. Changes in the hydroxyapatite composition, with the aim of optimize its osteoconductive capacity, benefiting biodegradation are reasons for study in order to improve bone tissue response after implantation. The present study aims to discuss possible cationic and anionic changes of the hydroxyapatite, temperature variations, its influence in the formed substrate morphology and the possible modulator effect as biomaterial.

Key-words: Hydroxyapatite; Biocompatibility; cationic and anionic substitutions.

REFERÊNCIAS

1. Granjeiro JM et al. Aplicações da engenharia de tecidos na odontologia . In: Pontual MAB, Magini RS. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento- Das Pesquisas clínicas odontológicas. São Paulo: Santos Editora,2004.

2. Calasans-Maia,MD. A zinco apatita 0,5% como substituto ósseo promissor.Caracterização físico-química e análise normatizada da biocompatibilidade. Tese doutorado. Universidade Federal Fluminense, 2009.

3. Granjeiro JM, Soares GDA. “Materiais cerâmicos”. In Biomateriais em odontologia: Princípios, métodos investigativos e aplicações. 1^o Edição, cap 4. São Paulo,p. 57-68.

4. Doi YH, Iwanaga T, Shibutani Y, Moriwaki Y, Iwayama. Osteoclastic responses to various calcium phosphates in cell cultures. *J Biomed Mater Res.* 1999; 47:424-433.

5. Buser, D. “Regeneração óssea guiada e enxertos autógenos em bloco para o aumento horizontal do rebordo: Uma abordagem segmentada. In: Buser, D. 20 anos de Regeneração óssea guiada. 2^a Ed. São Paulo. p. 195-229.Cap. 8.

6. Costa ACFM et al. Hidroxiapatita: obtenção, caracterização e aplicações. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos* 2009; 4(3):29-38

7. CallincaPaolla Gomes MACHADO, Andrea Vaz Braga PINTOR, Maria Alice Kuster de Albuquerque GRESS, Alexandre Malta ROSSI, José Mauro GRANJEIRO, Mônica DiuanaCalasans MAIA. *Innov Implant J, BiomaterEsthet*, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 9-14, jan./abr. 2010.

9. DoiY, Shibutani T, Moriwaki Y, Kajimoto T, Iwayama Y. Sintered carbonate apatites as bioresorbable bone substitutes.*J Biomed Mater Res*, 39, 603–610, 1998

10. Calasans-Maia, MD et al. Effect of Hydroxyapatite and Zinc-contain Hydroxyapatite on Osseous Repair of Critical Size Defect in the Rat Calvaria. *Key Eng Mater*, 361-363:1273-1276, 2008.

11. Misch, C. M. “Aumento do osso para a inserção do implante: soluções para o enxerto ósseo” In: Misch, C. E. *Implantes dentários contemporâneos*. 2^a Ed.São Paulo, 2000.p. 451-67, cap 29

12. Matsumoto, M., “Análise microscópica de rebordos alveolares maxilares reconstruídos com enxertos autógenos de crista ilíaca e sínfisemetoniana” Bauru,1999.(Dissertação).Faculdade de Odontologia,Universidade de São Paulo.
- 13.Guimarães SC. Patologia básica da cavidade bucal.Rio de Janeiro,Guanabara Koogan, 1982.p.283-315
14. Bezerra FJ. “Acidentes e complicações em técnicas reconstrutivas”. In: Bezerra, F.J. Terapia clínica avançada em implantodontia. 1^o Edição, Cap.21. São Paulo, p.291-313, 2002
15. Buser D, Dula K, Belser UC, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. II. Surgical procedure in the mandible. Int J Periodontics Restorative Dent 1995; 15:11-29.
16. Hench LL, Wilson J. An Introduction to Bioceramics. Singapore: World Scientific Publishing Company, 1993.
17. Boss J. H. Biocompatibility: Review of the concept and its relevance to clinical practice. In: Wise DL, editor. Biomaterials and Bioengineering Handbook.New York: Marcel Dekker, 2000. 94 p.
18. Goldenberg, V.; Stevenson, S. Natural history of autografts and allografts. Clin. Orthop. Relat. Res., 225:7-16, 1987
19. Narasaraaju TSB, Phebe DE. Some physico-chemical aspects of hydroxylapatite. Journal Of Materials Science.1996;31:1-21
20. Salgado PC, Sather PC, Castro HC, Alves GG, Oliveira AM, Oliveira RC, et al. Bone Remodeling, Biomaterials and Technological Applications: Revisiting Basic Concepts. Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology.2011; 2:318-328
21. Zhang L, Webster, TJ. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. Nano Today (2009) 4 66-80
22. Dourado ER. Preparação e caracterização de hidroxiapatita nano estruturada dopada com estrôncio. Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas. Rio de Janeiro- Dezembro – 2006

23. Volkmer TM. Obtenção e caracterização de hidroxiapatita porosa pelo método *Gelcasting* de espumas para uso como implantes [Dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande Do Sul; 2006. 139p.
24. Pizzo RCA. Ablação de biomateriais: resinas compostas, cerâmicas e metais. Monografia apresentada aos professores do curso de aperfeiçoamento em Terapias Fotônicas – uso de lasers e leds – nas áreas da saúde, como requisito exigido para a conclusão do curso. São Carlos Universidade de São Paulo, 2007.
25. Wopenka B, Pasteris JD. A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Materials Science and Engineering C*. 2005;25:131-143
26. Granjeiro JM et al. Aplicações da engenharia de tecidos na odontologia . In: Pontual MAB, Magini RS. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento- das pesquisas clínicas odontológicas. São Paulo: Santos Editora,2004.
27. Takeuchi A et al. Effect of temperature on crystallinity of carbonate apatite foam prepared from α -tricalcium phosphate by hydrothermal treatment. *Bio-Medical Materials and Engineering* 2009; 19:205-211.
28. Keiichi K, Mitsunobu K, Masafumi S, Yutaka D, Toshiaki S. Induction of new bone by bFGF-loaded porous carbonate apatite implants in femur defects in rats. *Clin. Oral Impl. Res.* 2009; 20:560-565.
29. Barros E, Alvarenga J, Alves GG, Canabarro B, Fernandes G, Rossi A, Granjeiro JM, Maia, MC. In vivo and in vitro biocompatibility study of nanostructured carbonate- apatite. *Key Engineering Materials* 2012; 493-4:247-51.
30. Cazabou S, Eichert D, Ranz X, Drouet C, Combes C, Harmand MF, Rey C. Ion exchanges in apatites for biomedical applications. *Journal Of Materials Science: Materials In Medicine*. 2005;16:405-409
31. Zaffe D, Bertoldi C, Consolo U. Accumulation of aluminium in lamellar bone after implantation of titanium plates, Ti-6Al-4V screws, hydroxyapatite granules. *Biomaterials* 2004; 25:3837-44.
32. Zaffe D. Some considerations on biomaterials and bone. *Micron* 2005; 36:583-92.
33. Habibovic P, Juhl MV, Clyens S, Martinetti, R, Dolcini L, Theilgaard N et al. Comparison of two carbonated apatite ceramics in vivo. *Acta Biomaterialia* 2010; 6:2219-26.

34. Landia E, Celottia G, Logroscinob G, Tampieria A. Carbonated hydroxyapatite as bone substitute. *Journal of the European Ceramic Society* 2003; 23:2931-37.
35. Valiense H et al. Effect of Carbonate-apatite on bone repair in non-critical size defect of rat calvaria. *Key Engineering Materials* 2012; 493-494:258-262.
36. Kim DK et al. Comparison of a synthetic bone substitute composed of carbonated apatite with an anorganic bovine xenograft in particulate forms in a canine maxillary augmentation model. *Clin. Oral Impl. Res.* 2010; 21:1334-44.
37. Montazeri L et al. Hydrothermal synthesis and characterization of hydroxyapatite and fluorhydroxyapatitenano-size powders. *Biomed. Mater.* 2010; 5:7.
38. Zhang W et al. Effects of strontium in modified biomaterials. *ActaBiomaterialia* 2011; 7:800-8.
39. Nascimento L. Osseointegration evaluation of hydroxyapatite and zinc containing hydroxyapatite granules in rabbits. *Key Engineering Materials* 2012; 493-4:252-7.
40. Li Y, et al., The effect of strontium-substituted hydroxyapatite coating on implant fixation in ovariectomized rats, *Biomaterials* 2010.

MANUSCRITO II

**AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DO REPARO ÓSSEO APÓS IMPLANTAÇÃO
DE ESFERAS DE HIDROXIAPATITA CARBONATADA NANOESTRUTURADA
CONTENDO 5% de ESTRÔNCIO EM LEVANTAMENTO DE SEIO MAXILAR DE
COELHOS**

RESUMO

Para o tratamento e recuperação de defeitos ósseos que podem ter diferentes etiologias como traumas, infecções e más formações, uma série de estudos científicos visando à produção de materiais com características biológicas foi realizado ao longo desses anos. As apatitas biológicas apresentam baixa cristalinidade e contêm substituições catiônicas e aniônicas na estrutura do cristal. Essa característica faz com que a mesma seja diferente da hidroxiapatita estequiométrica. Mudanças na composição da hidroxiapatita estequiométrica são motivos de estudo com finalidade de modular a resposta do tecido ósseo após a sua implantação. O estrôncio vem a contribuir devido a sua capacidade dual que consiste na redução da reabsorção óssea assim como a indução da atividade osteoblástica, e os carbonatos favorecendo ainda mais a osteocondutividade e bioabsorção agregando dessa maneira características importantes na reestruturação morfológica da hidroxiapatita. Este estudo tem como objetivo caracterizar físico-quimicamente os biomateriais antes da implantação e analisar histologicamente e histomorfometricamente esferas de hidroxiapatita carbonatada contendo 5% de estrôncio após implantação em soalho do seio maxilar. Foram utilizados 12 coelhos brancos da Nova Zelândia, divididos de acordo com os grupos experimentais: Grupo I. Hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada contendo 5% de estrôncio (nSrcHA-Experimental) e Grupo II: Hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada (ncHA-controle) e, subdivididos de acordo com os períodos experimentais de 4 e 12 semanas. Após a confecção dos sítios cirúrgicos, foram implantados nas cavidades dos seios maxilares nSrcHA e ncHA, nos lados esquerdo e direito respectivamente. Após os períodos experimentais, os animais foram eutanasiados, os blocos ósseos foram removidos e as amostras foram processadas histologicamente. Cortes com 5µm de espessura corados com Hematoxilina e Eosina e Tricrômico de Masson foram obtidos para análise histomorfométrica. No período de 4 semanas, o grupo ncHA mostrou a presença de osso neoformado e pavimentação osteoblástica próximo da parede do defeito. No grupo nSrcHA, o biomaterial apresentou de forma difusa uma maior deposição de matriz osteogênica em torno do biomaterial, tecido ósseo neoformado, tanto próximo das paredes do defeito, quanto no interior. No período de 12 semanas o grupo ncHA exibiu biomaterial no interior do defeito e osso neoformado, enquanto no grupo nSrcHA 12 semanas uma intensa formação óssea no interior do defeito com presença de osteócitos. Contudo a análise histomorfométrica demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa para a densidade de volume entre os materiais, o tecido ósseo neoformado e tecido conjuntivo entre os grupos e períodos experimentais. Concluímos que ambos os materiais apresentaram características de biocompatibilidade e osteocondução.

Palavras Chave: Seio maxilar, coelhos, hidroxiapatita carbonatada, biomaterial, regeneração óssea, estrôncio.

5. INTRODUÇÃO

A hidroxiapatita apresenta de 30% a 70% da massa dos ossos e dentes, sendo o constituinte principal da fase mineral dos tecidos mineralizados². Seu equivalente sintético possui propriedades de biocompatibilidade, osteocondução e de osseointegração, tornando-o um dos mais promissores substitutos ósseos. Em primatas, a hidroxiapatita porosa apresentou características de osteoindução após implantação em sítio ectópico³. Dentre os fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita tem sido amplamente utilizada como um importante material para a substituição óssea e se distingue das demais cerâmicas à base de fosfato de cálcio por ser similar à porção inorgânica do tecido ósseo humano. A alta cristalinidade e a baixa taxa de absorção são limitações conhecidas das HA sintéticas.

Segundo, Carreto *et al*⁴, a hidroxiapatita, embora seja osteoindutora, tem atividade biológica dependente do processo de fabricação e síntese, o que pode gerar em alguns casos, produtos com baixa taxa de biodegradação com os tecidos circunvizinhos característica essas atribuídas a compósitos submetidos a altas temperaturas.

Devido ao fato da hidroxiapatita permitir um grande número de substituições isomórficas, quer seja no cálcio, na hidroxila ou mesmo no ânion, pode apresentar características osteocondutoras mais potencializadas, favorecendo dessa maneira uma neoformação óssea⁵. As apatitas biológicas apresentam baixa cristalinidade e contêm substituições catiônicas e aniônicas na estrutura do cristal, por essas razões a sua composição difere da hidroxiapatitaestequiométrica⁶. Mudança na composição da hidroxiapatita é motivo de estudo com a finalidade de melhorar a resposta do tecido ósseo após a implantação.

O estrôncio vem a contribuir pois a sua incorporação aumenta a taxa de solubilidade da HA, induz a atividade osteoblástica e reduz a ação osteoclástica, além de ter um importante papel no metabolismo da formação óssea. Entendendo que as modificações nas composições químicas da hidroxiapatita, pela substituição do grupo fosfato (PO_4), por carbonatos (CO_3), leva a uma síntese de uma hidroxiapatita carbonatada (cHA), com característica que superam as limitações citadas e ampliam a capacidade terapêutica das hidroxiapatitas, este estudo visa avaliar se há benefício na neoformação óssea nos compostos incorporados com este metal.

Objetivo Geral

Avaliar o reparo ósseo da hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada com a incorporação de 5% de estrôncio como substituto ósseo no levantamento do seio maxilar em coelhos.

Objetivos específicos

Caracterizar os biomateriais antes da implantação através de Difração de Raios X (DRX) e Espectroscopia Vibracional no Infravermelho (EVIV) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);

Descrever a resposta biológica dos biomateriais implantados após 4 e 12 semanas por microscopia de luz;

Avaliar histomorfometricamente a área de osso neoformado, tecido conjuntivo e a bioabsorção dos biomateriais após os períodos experimentais de 4 e 12 semanas.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Biomateriais

As amostras compostas por partículas menores que 20nm e estequiometria variando entre $1,6 < \text{Ca/P} < 2,0$ de hidroxiapatita nanoestruturada carbonatada com 5% de estrôncio e amostras de hidroxiapatita carbonatada ($\text{Ca/P}=1,67$) foram sintetizadas e caracterizadas no Laboratório de Biomateriais (LABIOMAT) do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) sob a coordenação do pesquisador Dr. Alexandre Malta Rossi.

6.2 Caracterização dos biomateriais

As técnicas de caracterização são realizadas para definir as características estruturais, superficiais e composição química dos materiais e com isso reunir as suas informações mais importantes. Por isso faz-se necessária a caracterização do material antes da sua implantação. As técnicas que serão utilizadas nesse estudo são: Difração de Raios X (DRX) para avaliação da cristalinidade dos materiais, Espectroscopia Vibracional no Infravermelho por Transformada de Fourier (EVIVTF) para análise dos grupamentos presentes e microscopia eletrônica de varredura (MEV) para análise da morfologia superficial.

6.2.1 Difração de Raio X:

O objetivo de se empregar esta técnica neste trabalho foi de caracterizar as esferas de cHA e SrcHA 5%, através da investigação das possíveis fases presentes e do grau de cristalinidade de cada material. Os difratogramas de Raios X para as amostras de cHA e SrcHA em pó foram obtidos no Laboratório de Cristalografia e Difração de Raios-X do CBPF, com o difratômetro de pó Zeiss HZG4 usando radiação de $\text{CuK}\alpha$ ($= 1,5418 \text{ \AA}$) e varredura angular de $10 - 100^\circ$ com passo de $0,05/s$. Nesse trabalho buscou-se analisar os difratogramas obtidos fazendo comparações com padrões difratométricos de fases individuais disponíveis no JCPDS para os vários fosfatos de cálcio.

6.2.2 Espectroscopia Vibracional No Infra Vermelho Com Transformada de Fourier(EFTiR).

Esta técnica é utilizada para a identificação de grupos funcionais pela comparação do modo vibracional de um material padrão. Permite também identificar algumas substituições importantes ou alterações na composição da hidroxiapatita. Pode-se diferenciar a substituição dos grupos OH⁻ e (PO₄)⁻³ pelos grupos (CO₃)⁻² por meio da presença das bandas de absorção característica. Os espectros do infra-vermelho para as amostras em pó da cHA e SrcHAHA foram obtidos no Laboratório de Biomateriais do CBPF utilizando o espectrofotômetro por transformada de Fourier da Shimadzu, IR-Prestige 21 com detector DTGS KBr, separador de feixes de KBr . A análise foi feita por transmitância utilizando pastilhas com 1% de KBr na região mediana do infravermelho (4000 – 400 cm⁻¹).

6.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura.

Antes da implantação do biomaterial esta técnica foi empregada com o objetivo de se obter uma imagem mais detalhada das esferas e sua morfologia, para avaliação de possíveis diferenças morfológicas entre os dois biomateriais. As imagens resultaram de elétrons secundários (ES) e de observação sob condições de baixo vácuo. O equipamento usado foi o modelo Quanta FEG 250, da marca FEI, com os aumentos de 250, 1000 e 5000 vezes.

6.3 Princípios éticos no estudo animal

Este estudo foi submetido e aprovado na Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade Federal Fluminense (CEUA/UFF) com o protocolo número 190/12 (Anexo 1). Esta pesquisa foi realizada seguindo a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos – DBCA e as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA, ambas disponíveis em <http://concea.mct.gov.br>.

6.4 Caracterização dos animais.

Nesta pesquisa foram utilizados 12 coelhos da ordem *Lagomorpha*, gênero *Oryctolagus*, espécie *Oryctolagus cuniculus*, raça Nova Zelândia, variedade branco, com peso entre 3 e 4 kg, com idade entre 18 a 20 semanas, ambos os sexos, saudáveis, obtidos e mantidos no Laboratório de Produção de Coelhos (LPC) em gaiolas tradicionais e individuais em malha galvanizada medindo 0,90m x 0,60m x 0,45m, suspensas a 0,80m do chão (Figuras 1 e 2), localizado na Fazenda Escola da Faculdade de Medicina Veterinária da UFF em Cachoeiras de Macacu. Os animais foram alimentados com dieta sólida, constituída por 150 gramas ao dia, fornecida diariamente, obedecendo a horários e água *ad libitum*.



Figura 1: Visão interna do Laboratório de Produção de Coelho (LPC). A. Presença de gaiolas suspensas; B. Gaiola contendo 1 animal com ração e bebedouro tipo bico para água.

6.5 Distribuição dos grupos

Os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos experimentais, de acordo com o biomaterial utilizado: Grupo I: Hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada (controle, lado direito), Grupo II: Hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada contendo 5% de estrôncio (experimental, lado esquerdo). Seis animais foram eutanasiados após os períodos experimentais de 4 e 12 semanas de acordo com a Figura 2.

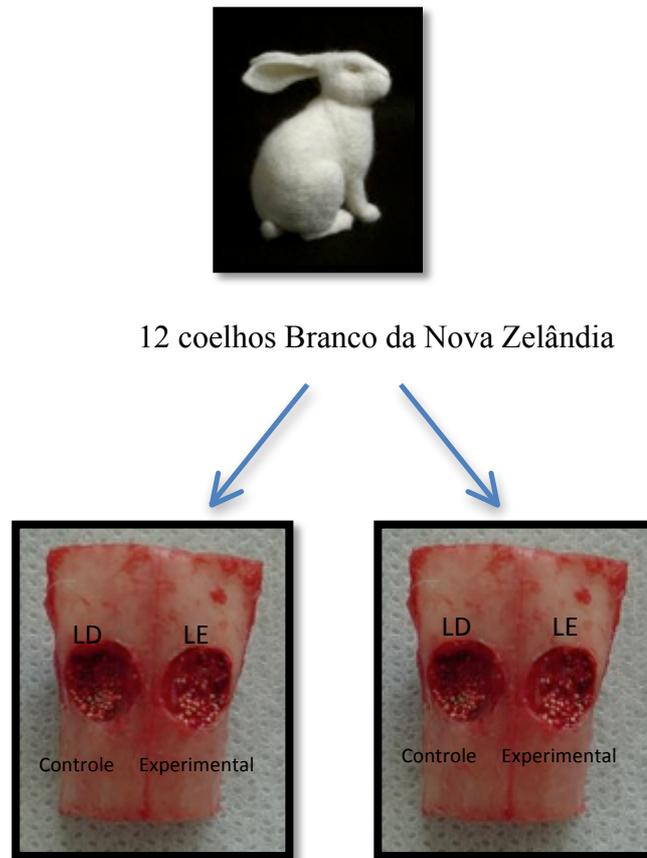
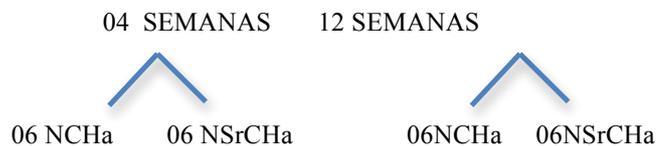


Figura 2: Bloco obtido da região envolvendo os seios maxilares direito e esquerdo com os acessos cirúrgicos utilizados para acesso ao seio maxilar



6.6 Procedimento de Anestesia

Todos os procedimentos realizados nos animais e que poderiam resultar em ansiedade e/ou dor foram conduzidos sob anestesia geral. Os animais foram privados de ração seis horas antes do ato operatório, mas não de água, e no momento da cirurgia, os animais foram pesados em uma balança eletrônica de precisão (Lucastec[®]) e as doses dos fármacos calculadas.

Todas as anestésias foram realizadas pela mesma equipe anestésica, composta pelos médicos veterinários Fabio Otero Ascoli e Maria Alice Gress. Os coelhos foram operados sob anestesia geral e monitorados através de monitor digital (Digicare[®]) com informações sobre pressão arterial,

oximetria de pulso, freqüênciacardiaca, capnografia e analisador de gases anestésicos durante todo o período trans-operatório (Figura 3A) e receberam também hidratação venosa com solução de ringer com lactate na dose de 5mg/kg/h em veia periférica (Figura3B).

Como medicação pré-anestésica, foi utilizada aquetaminana dose de 40 mg.kg⁻¹ associado a xilazinana dose 1 mg.kg⁻¹, por via IM. Após dez minutos, os animais foramtricotomizados na orelha e na região frontal (seios maxilares). Em seguida, cada coelho foi colocado na mesa cirúrgica onde foi realizada a anti-sepsia da orelha para posterior canulação da veia auricular e administração de propofol 3mg.kg⁻¹/minuto, para a indução anestésica, a manutenção anestésica foi realizada através da administração de propofol na dose de 0,3 mg.kg⁻¹minuto⁻¹. Os animais receberam oxigênio 100% durante todo o período por meio de máscara facial acoplada a região nasal. A manutenção da temperatura corpórea dos coelhos durante toda a cirurgia, foi realizada com a utilização de um colchão térmico.



Figura 3: Procedimentos realizados para a anestesia geral. A. Máscara utilizada para a realização da sedação pré-anestésica B. Região auricular tricotomizada com canulação da veia auricular para permitir a hidratação periférica no trans-operatório.

6.7.Procedimentos cirúrgicos

Todas as cirurgias foram realizadas utilizando o instrumental cirúrgico organizado em conjuntos individuais, esterilizados em autoclave, bem como equipamentos de proteção individual e observando-se todos os princípios de biossegurança como uso de campos cirúrgicos estéreis de TNT, com fenestração para o animal(Figura4A). Foi realizada a antissepsia do local operado com solução tópica de digluconato de clorexidina a 2% (LM FARMA®, Vila Guilherme, SP, Brasil) em seguida, com cabo de bisturi nº3 (Golgran Indústria e Comércio de Instrumentos Odontológicos

Ltda., São Caetano do Sul, SP, Brasil) montado com lâmina de bisturi nº15 (Med Goldman Indústria e Comércio Ltda, São José, SC, Brasil), uma incisão contínua foi realizada na pele da região maxilar, 4mm acima da junção inferior do osso incisivo e da maxila (Figura 4B). O tecido subcutâneo e muscular foi dividuccionado com o auxílio de uma tesoura romba Metzenbaum® (Erwin Guth, São Paulo, SP, Brasil), permitindo o acesso ao periósteo. O mesmo foi incisado e elevado dorsalmente utilizando um descolador do tipo Molt® (Golgran Indústria e Comércio de Instrumentos Odontológicos Ltda., São Caetano do Sul, SP, Brasil) (Figura 4C).

Para o acesso ao seio maxilar, uma janela óssea foi confeccionada com uma broca trefina de 4mm de diâmetro interno (SIN®, Sistemas de Implantes Nacionais) (Figura 4D), porém a remoção da cortical foi realizada com o auxílio de um osteótomo (descrever qual vc utilizou, nome, marca, empresa). Todas as perfurações foram feitas sob refrigeração externa constante com solução fisiológica estéril de cloreto de Sódio a 0,9% e com auxílio de um motor cirúrgico para implantes (modelo Driller 600 BML e contra-ânguloKavo® com redução de velocidade de 1/16) (Figura 5A). Após a osteotomia, a membrana do seio foi cuidadosamente deslocada e elevada com cureta modelo e marca para posterior inserção dos biomateriais (Figura 5 B) conforme ilustrado na Figura 6 A e B. De acordo com o grupo experimental, as esferas dos biomateriais foram implantadas de maneira que pudesse ser condensado em direção à parede anterior e inferior do seio.

Antes mesmo da sua colocação, os biomateriais foram manipulados com sangue e/ou solução fisiológica de forma que pudessem permanecer aglutinados e hidratados. Após os procedimentos de implantação de cada grupo, o tecido muscular foi reposicionado e suturado com fio de nylon preto 5-0 (Mononylon, Ethicon®) (Figura 5C).

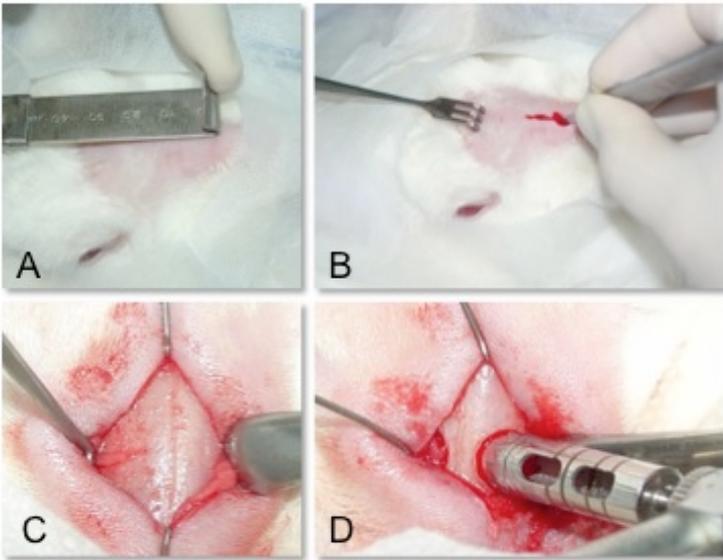


Figura 4: Procedimentos cirúrgicos para exposição do osso e osteotomia. A. Área tricotomizada e medida para a realização da incisão; B. Incisão realizada com 4 cm; C. Exposição do plano esquelético e D. Fresa trefina sendo utilizada para confecção de dois defeitos cirúrgicos de 4 mm para acesso aos seios maxilares.

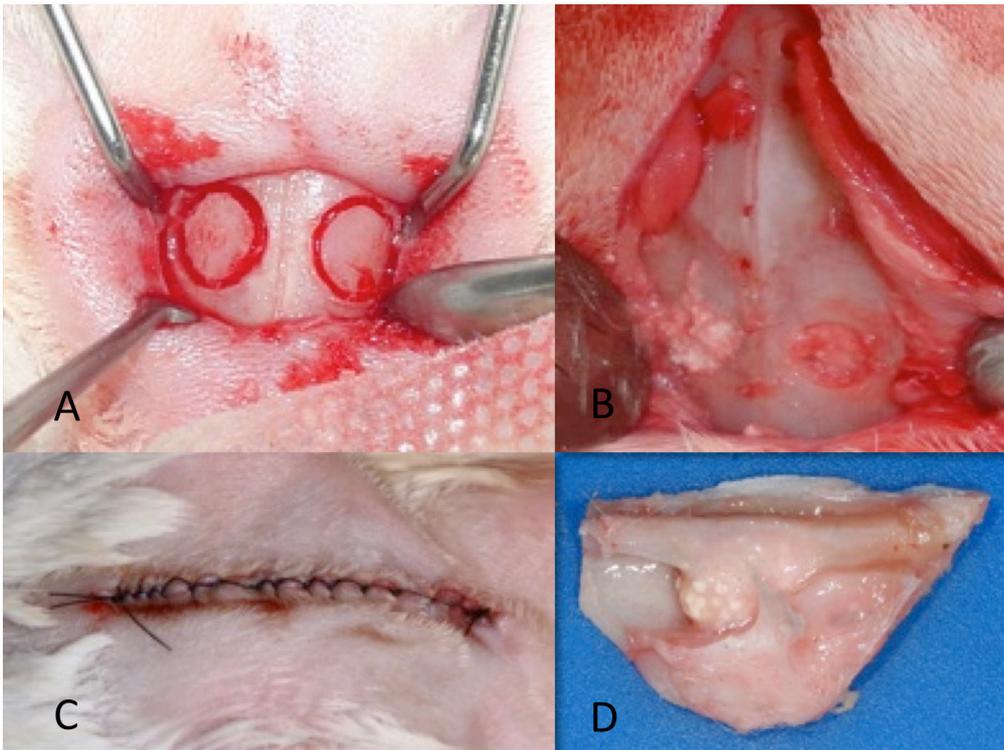


Figura 5: Sequência de procedimentos cirúrgicos realizados. A. Defeitos cirúrgicos delimitados; B. Corticais ósseas removidas e biomateriais implantados; C. Acesso cirúrgico suturado com fio de nylon 5-0; D. Bloco ósseo obtido após o período experimental de 4 semanas (grupo controle), observar a presença de esferas e ausência de infecção e/ou necrose tecidual.

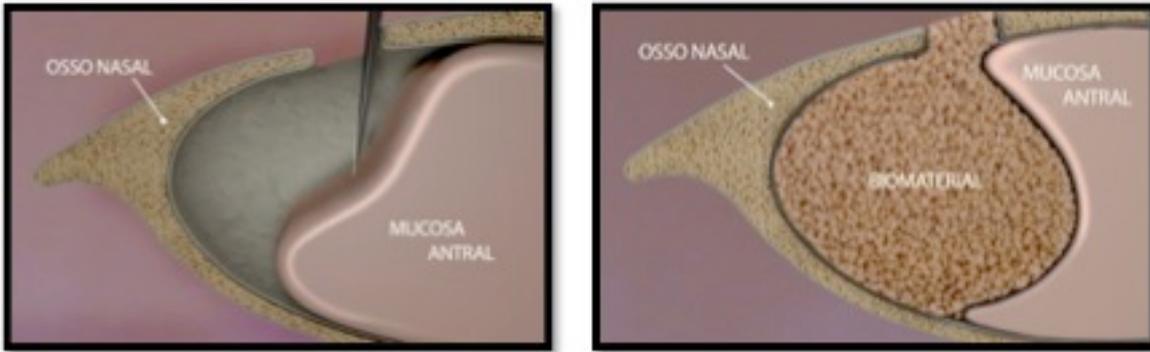


Figura 6 - Desenho esquemático do procedimento cirúrgico. A. deslocamento da membrana sinusal e B. Preenchimento da cavidade com biomaterial. (Fonte: Nunes 2009)

6.8 Medicação pós-operatória

Para a realização da analgesia pós-operatória foram utilizados o antiinflamatório Maxicam® (Ourofino Pet®) na dose de $0,3 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ IV}$ e tramadol na dose $4 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ IV}$. Antes do início de cada cirurgia foi realizada a administração do antibiótico pentabiótico veterinário pequeno porte, em dose única de 1ml por via IM (Pentabiótico Reforçado®- Fort Dodge Saæde Animal Ltda).

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram devolvidos às suas respectivas gaiolas, devidamente identificadas e mantidos em observação constante e diária por todo o período de estudo até o momento da eutanásia.

6.9. Eutanásiados animais e obtenção das amostras

Para a obtenção dos blocos ósseos os animais foram eutanasiados por dose letal de anestésico geral. Após a constatação da morte do animal, através da análise dos sinais vitais, foi realizada uma incisão longitudinal, acompanhando a cicatriz cutânea existente. Com a exposição óssea, as amostras foram removidas, 1cm de distância das bordas da área cirúrgica com utilização de um disco de *carborundum* e peça reta (Kavo®, Kavo do Brasil Ind. e Com. Ltda, Joinville, SC, Brasil) acoplada ao micromotor (Kavo®, Kavo do Brasil Ind. e Com. Ltda, Joinville, SC, Brasil) com irrigação constante de soro fisiológico 0,9% estéril a 10°C . (Labormédica®, LabormédicaIndustrial

Farmacêutica Ltda., São José do Rio Preto, SP, Brasil) e em seguida, dividido longitudinalmente para a sua posterior análise (Figura 5D).

Todas as peças foram avaliadas macroscopicamente e fotografadas com uma câmara fotográfica digital.

Cinco blocos ósseos obtidos de cada período experimental foram colocados em frascos previamente preparados e etiquetados, contendo solução de paraformaldeído 4% tamponado com pH 7,4, sendo fixados por três dias e, em seguida, encaminhados ao Laboratório Histotech Lâminas Didáticas sob a coordenação de Dr^a Margareth T Arroyo, onde foram processados.

Após o período de fixação (três dias), as amostras foram descalcificadas em solução de ácido nítrico 5% por um período cinco dias. Em seguida, as peças foram rotineiramente processadas e incluídas em parafina. Os cortes foram realizados em Micrótomato Rotativo Manual Ek Micro1 (Eikonal do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) com espessura de 5µm, semi-seriados de 1/5, e corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômico de Masson, sendo esta última específica para melhor visualização das fibras colágenas e osteóide (matriz não mineralizada).

6.10 Análise Histomorfométrica

Foram fotografados 8 a 10 campos corridos por varredura em cada corte histológico, correspondente a um biomaterial por animal, sendo assim coletadas imagens dos 20 cortes perfazendo um total de 160 a 200 imagens digitais, sem haver sobreposições das mesmas.

A objetiva escolhida para a captura foi de 10X por propiciar um bom campo de observação e ainda permitir o detalhamento morfológico do tecido.

As imagens capturadas foram submetidas à análise histomorfométrica por meio do programa Image-Pro Plus 6.0 (MediaCybernetics). Cada foto recebeu uma grade de 150 pontos, os quais foram manualmente identificados segundo as classes designadas: osso neoformado, tecido conjuntivo e biomaterial. Os pontos resultantes de cada fotomicrografia foram exportados para planilhas do software Microsoft Excel[®], para posterior tratamento estatístico.

6.11 Tratamento estatístico dos dados

Em todas as análises estatísticas utilizou-se o intervalo de confiança de 95%. Os registros das informações quantitativas foram armazenados em um banco de dados elaborado em planilha do software Microsoft Excel[®]. O software GraphPad Prism versão 5.0 foi utilizado para realizar a análise estatística. A descrição percentual quantitativa de osso neoformado, de biomaterial e de tecido conjuntivo, nos dois períodos experimentais, foi representada através das médias, desvios padrão, medianas, coeficientes de variação e testes de distribuição de normalidade. As medidas de variabilidade foram avaliadas com um nível de significância de 5%. A análise estatística entre os grupos foi realizada através da comparação entre a quantidade percentual de osso neoformado, de tecido conjuntivo e de biomaterial presentes em toda área do defeito ósseo.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterização Físico-Química

7.1.1 Difração de Raio-X

A figura 7 mostra a comparação entre os difratogramas das amostras preparadas com e sem a presença de estrôncio, em temperatura de 9°C. Os picos identificados são correspondentes a ficha padrão da hidroxiapatita, 09-0432 PCPDFWIN.

Com a sobreposição dos gráficos é possível observar que a amostra preparada sem o metal possui regiões mais amorfas do que a amostra preparada com o metal, visto que a largura da base dos picos é maior, quando comparados com a hidroxiapatita carbonatada contendo estrôncio este fator pode ter influência no grau de dissolução desta amostra.

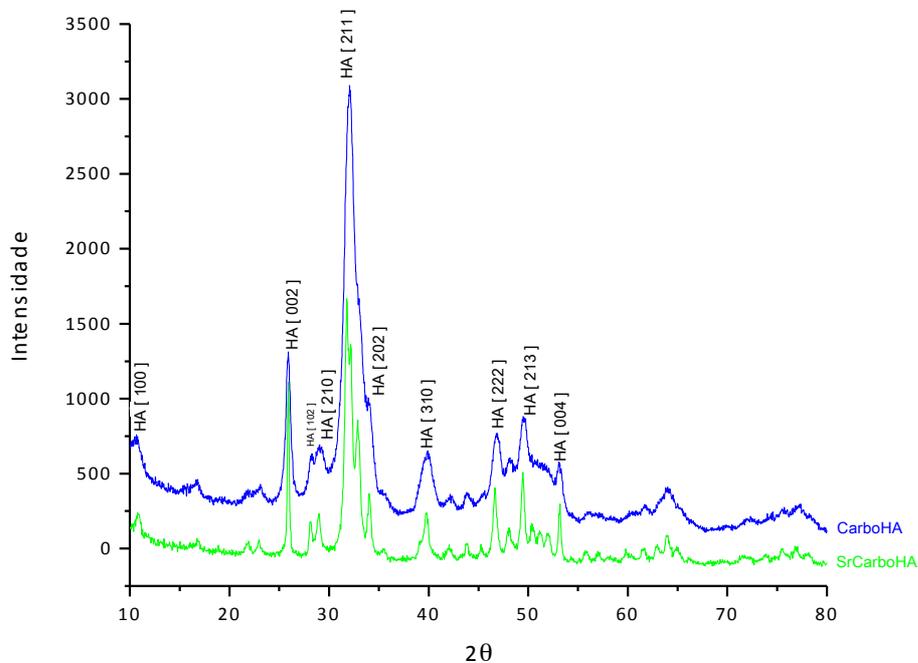


Figura 7: Difratograma de Raios-X dos biomateriais. Observar a largura da base do pico na SrcHa quando comparado com a cHA.

7.1.2 Espectroscopia Vibracional no Infra Vermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

A figura 8 mostra a comparação entre os espectros vibracionais de infravermelho das amostras preparadas com e sem a presença de estrôncio, em temperatura de 9°C. Observa-se que as bandas são correspondentes a de uma hidroxiapatita^{9, 10, 11}. Observa-se nas regiões de 3430 e 1646 cm^{-1} bandas de água intensa e larga. Nas regiões de 1462 a 1414 cm^{-1} encontram-se as bandas características dos íons carbonato, mostrando que a substituição ocorreu conforme previsto. As demais bandas observadas em 1038, 961, 602 e 560 cm^{-1} são características dos íons fosfatos. Devido a enorme hidratação das amostras, não foi possível identificar as bandas dos íons hidroxila em 3570 e 635 cm^{-1} .

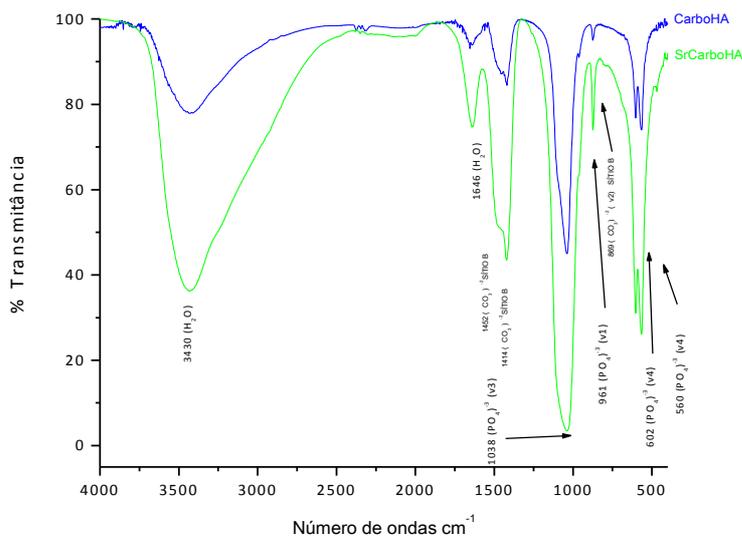


Figura 8: Espectro de Raio-X comparativo dos biomateriais. As setas mostram a presença de íons carbonato confirmando a substituição realizada. Nota-se também a presença de água nas bandas em 3500.

7.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise morfológica obtida através do MEV das esferas de hidroxiapatita carbonatada com 5% de estrôncio e hidroxiapatita carbonatada, demonstra que a presença deste metal, promove uma alteração superficial do composto formado, evidenciado pela presença de poros sem interconectividade, morfologia superficial mais irregular, apresentando desta forma uma estrutura superficial mais amorfa, características essas

observados principalmente nos aumentos de 1000x e 5000x, quando comparado com as esferas de hidroxiapatita carbonatada (B,D,F).

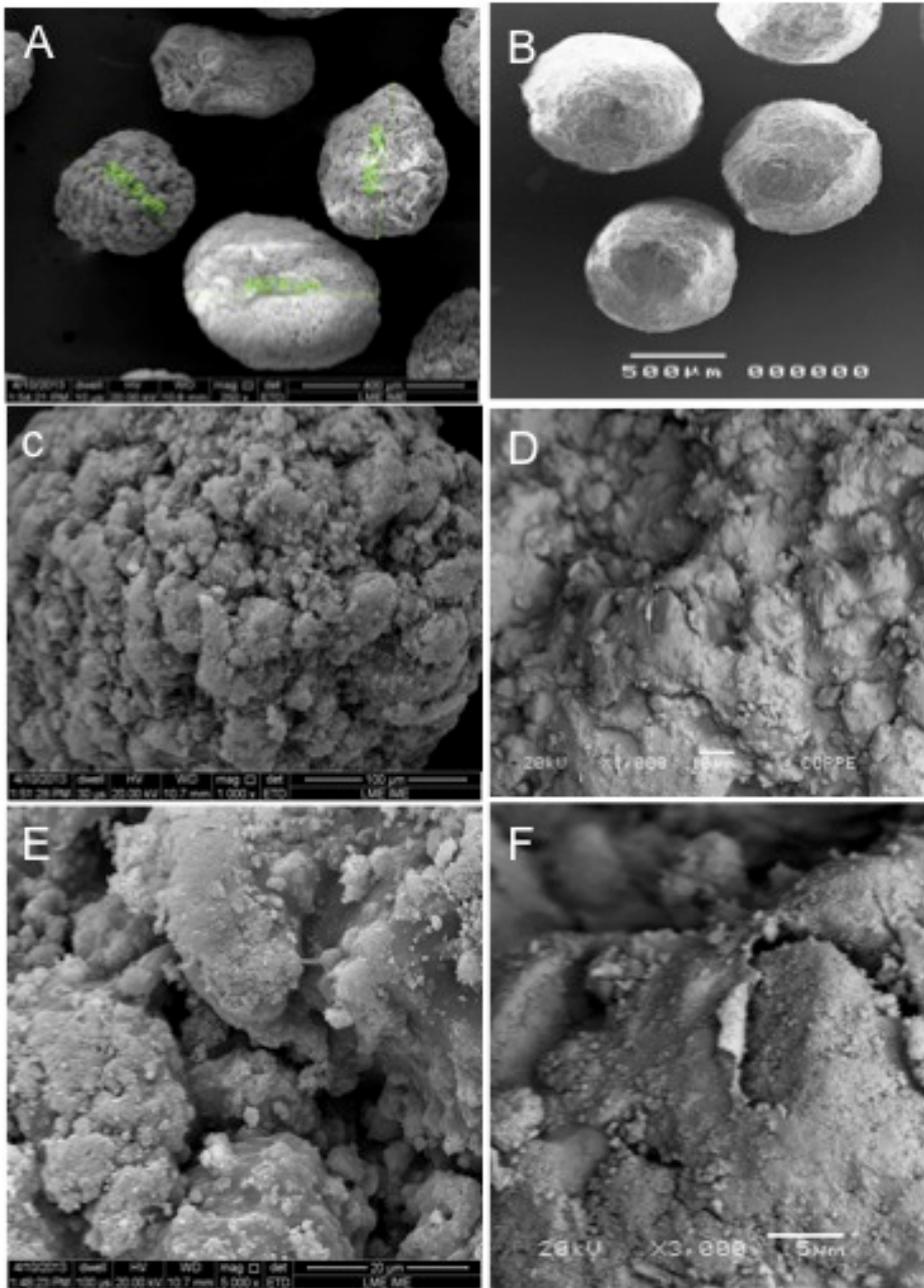


Figura 9: Demonstra a micrografia obtida através do MEV com aumentos de 250x, 1000x, 5000x das esferas de hidroxiapatitacarbonatada com 5% de estrôncio(A,C,E) e Hidroxiapatita carbonatada (B,D,F), sintetizadas a 9^o C de temperatura.

7.2 Resultados histológicos descritivos

7.2.1 Hidroxiapatita carbonatada 4 semanas

Nos cortes histológicos avaliados e corados em HE observamos defeito preenchido por tecido conjuntivo fibrocelular, sede de moderado infiltrado inflamatório mononuclear, permeando ilhas de biomaterial que se encontravam circundadas por células gigantes multinucleadas, bem como matriz osteóide pavimentada por osteoblastos. Pela coloração com Tricrômico de Masson, evidencia-se melhor a presença de macrófagos (Figura 10).

7.2.2 Hidroxiapatita carbonatada 12 semanas

O defeito apresentou-se preenchido por tecido conjuntivo fibroso com escassas células inflamatórias, presença de pouco biomaterial que se encontrava circundado por matriz osteóide e pavimentação osteoblástica. Evidenciamos trabéculas de osso neoformado na periferia do defeito pavimentadas por cordões de osteoblastos e internamente osteócitos (Figura 11).

7.2.3 Hidroxiapatita carbonatada contendo estrôncio 4 semanas

Evidenciamos nos cortes histológicos avaliados e corados em HE que o defeito apresentava-se preenchido por tecido conjuntivo fibroso contendo de moderado a intenso infiltrado inflamatório mononuclear, sendo evidenciado pela coloração de tricrômico de Masson abundantes macrófagos. Permeado pelo tecido conjuntivo observou-se ilhas de biomaterial circundadas por células gigantes multinucleadas. A região da periferia do defeito apresentou osso neoformado com cordões de osteoblastos pavimentando (Figura 12).

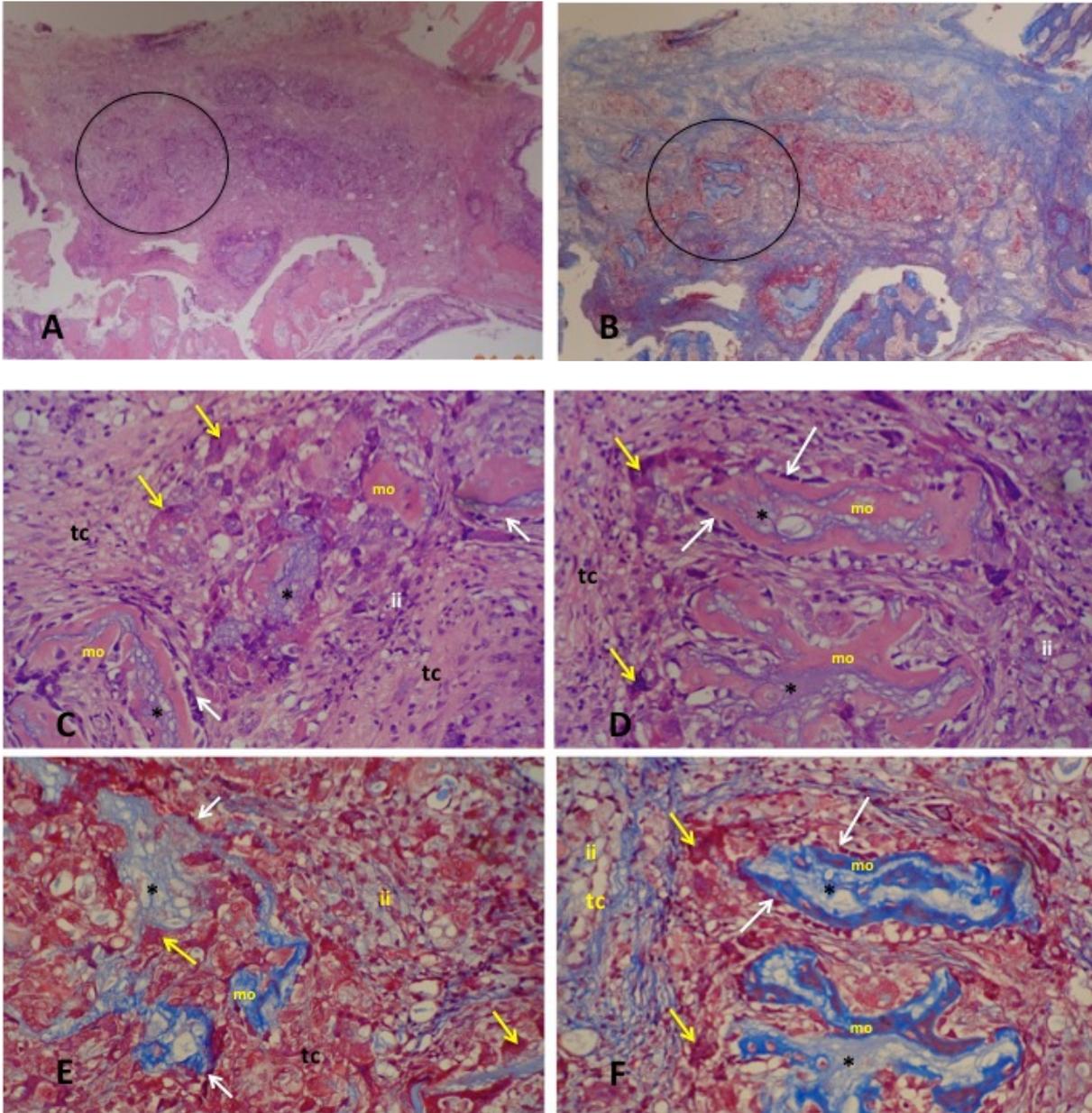


Figura 10: Fotomicrografias do grupo nCHA após 4 semanas de implantação. A,B,C,D,E e F: Tecido conjuntivo (tc) com moderado infiltrado inflamatório mononuclear(ii) com algumas células gigantes multinucleadas circundando fragmentos do biomaterial (seta amarela) ; presença de resíduo de biomaterial (*) circundado por matriz osteogênica (mo) pavimentada por osteoblastos (seta branca). A e B Apresenta aumento de inicial: 4(x10) com visão panorâmica do corte histológico e região delimitada descrita. C e D. Coloração Hematoxilina e Eosina; E e F. Coloração: Tricrômico de Masson. Aumento inicial: 40 (x10).

7.2.4 Hidroxiapatita carbonatada contendo estrôncio 12 semanas

Após 12 semanas, o defeito foi preenchido por tecido conjuntivo fibroso com focos esparsos de infiltrado inflamatório mononuclear, presença de raras e pequenas ilhas de biomaterial tendo na

periferia osso neoformado e pavimentação osteoblástica, bem como na periferia do defeito observou-se trabéculas de osso neoformado. Observamos em todos os cortes em menor aumento, a presença de epitélio respiratório compatível com revestimento da mucosa do seio maxilar (Figura 13).

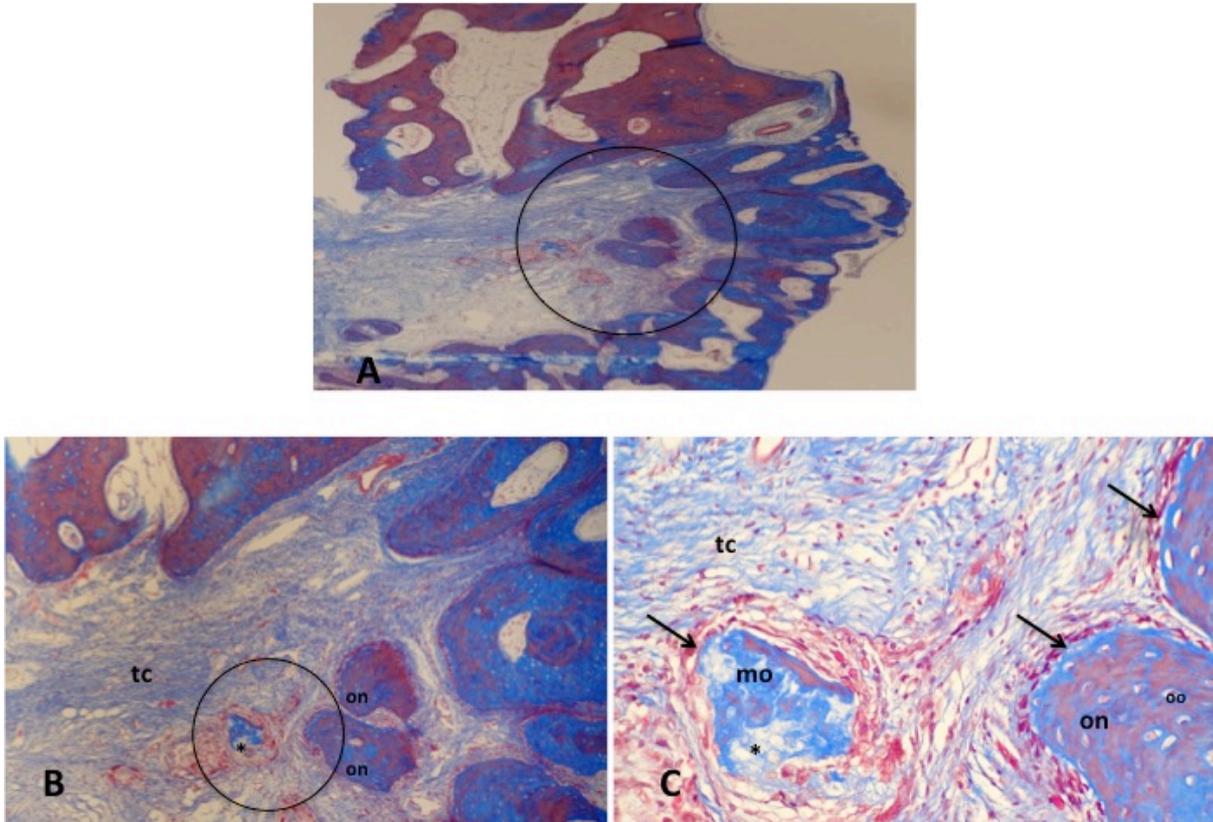


Figura 11: Fotomicrografias do grupo nCHA após 12 semanas de implantação. A. Apresenta aumento de inicial: 4(x10) com visão panorâmica do corte histológico e região delimitada descrita, B. Tecido conjuntivo fibroso com escasso infiltrado inflamatório (tc), resíduo de biomaterial (*), osso neoformado(on) ; C. Tecido conjuntivo fibroso com escasso infiltrado inflamatório (tc), resíduo de biomaterial (*), osso neoformado(on), contendo pavimentação osteoblástica (seta preta)e osteócitos aprisionados (oo); matriz osteogênica (mo) circundada por osteoblastos (seta preta). Coloração: Tricrômico de Masson e B. Aumento inicial de 10 (x10) e C. Aumento inicial de 40 (x10).

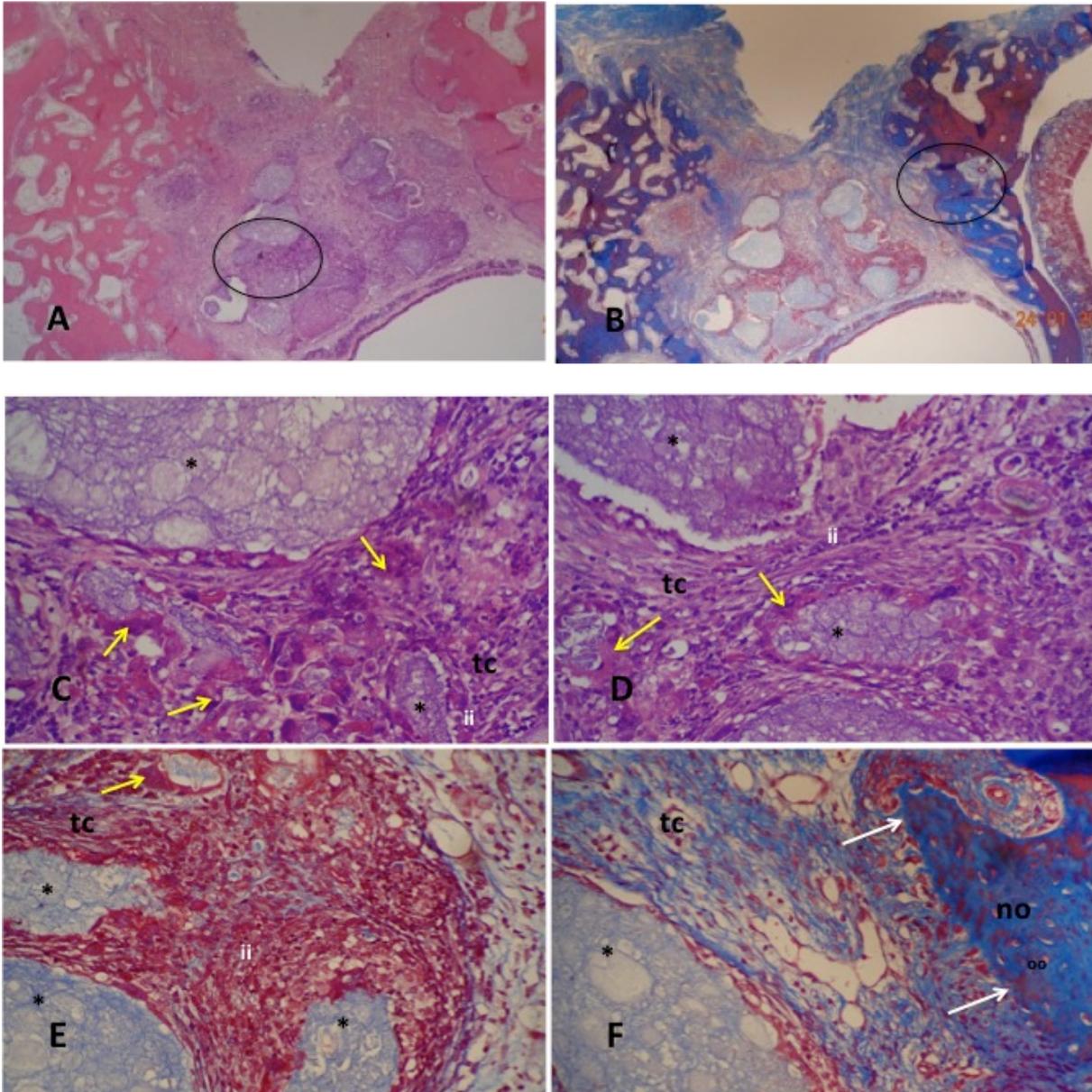


Figura 12: Fotomicrografias do grupo nSrcHA após 4 semanas de implantação. A, B, C, D, E e F: Tecido conjuntivo (tc) com infiltrado inflamatório de moderado a intenso (ii), células gigantes multinucleadas (seta amarela); biomaterial (*). Em D: Osso periférico neoformado (no) com pavimentação osteoblástica (seta branca) e osteócitos aprisionados (oo). A e B Apresenta aumento de inicial: 4(x10) com visão panorâmica do corte histológico e região delimitada descrita C e D: Coloração Hematoxilina e Eosina; E e F. Coloração: Tricrômico de Masson. Aumento inicial de 40 (x10).

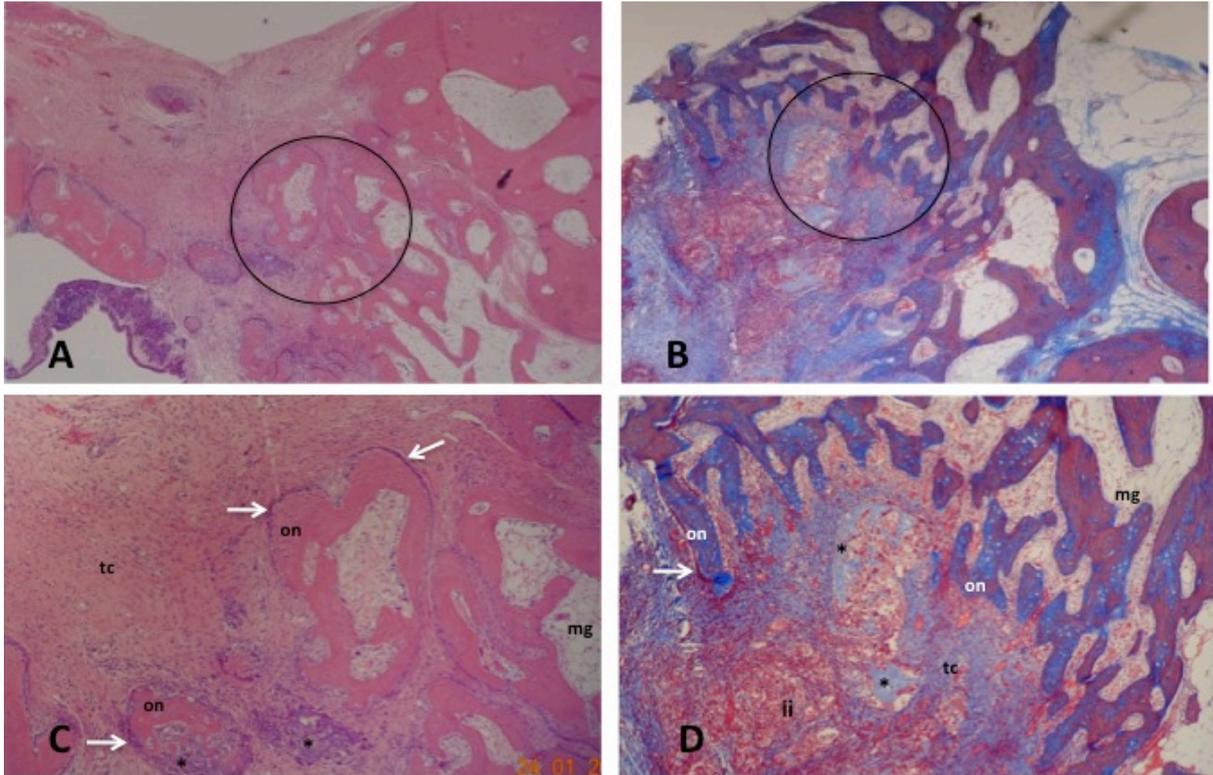


Figura 13: Fotomicrografias do grupo nSrcHA após 12 semanas de implantação. A e B Apresenta aumento de inicial: 4(x10) com visão panorâmica do corte histológico e região delimitada descrita, C e D. Tecido conjuntivo fibroso(tc) permeando trabéculas neoformadas (on) pavimentadas por cordões de osteoblastos (seta branca); resíduo de biomaterial (*); porção medular gordurosa (mg); Em D foco de infiltrado inflamatório mononuclear (ii). Aumento inicial de 10(x10), coloração C: Hematoxilina e Eosina e D: Tricrômico de Masson.

7.3 Resultados histomorfométricos

A análise histomorfométrica da densidade de volume de acordo com o osso neoformado, tecido conjuntivo e biomaterial residual foi realizada de acordo com os períodos experimentais e de forma comparativa entre os grupos. Foi considerada uma diferença estatisticamente significativa se $p < 0,05$.

7.3.1 Densidade de volume de biomaterial

A figura 14 compara a densidade de volume de biomaterial residual entre os grupos e períodos experimentais. Não houve diferença estatística entre a densidade de volume dos materiais ($p=0,6648$) e também não houve diferença estatística entre os materiais ao longo dos períodos experimentais ($p=0,4746$).

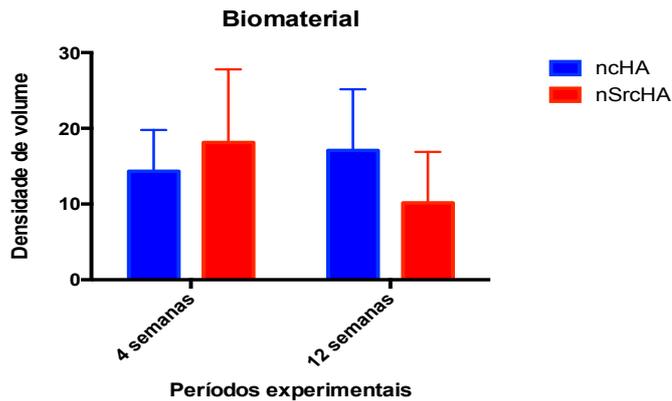


Figura 14: Densidade de volume do biomaterial residual após os dois períodos experimentais.

7.3.2 Densidade de volume de osso neoformado

A figura 15 compara a densidade de volume de osso neoformado entre os grupos e períodos experimentais. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,7409$), porém houve diferença estatística entre os materiais ao longo dos períodos experimentais ($p=0,0039$).

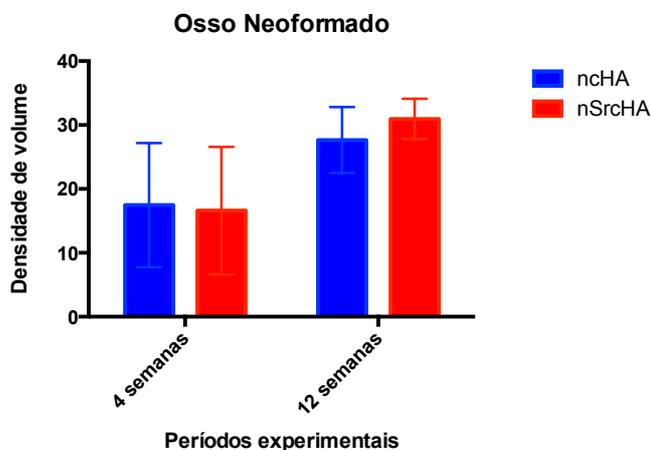


Figura 15: Densidade de volume de osso neoformado dos dois materiais após os períodos experimentais.

7.3.3 Densidade de volume de tecido conjuntivo

A figura 16 compara a densidade de volume de tecido conjuntivo entre os grupos e períodos experimentais. Não houve diferença estatística entre a densidade de volume e tecido conjuntivo formado ($p=0,2040$) e também não houve diferença estatística entre os materiais ao longo dos períodos experimentais ($p=0,1539$).

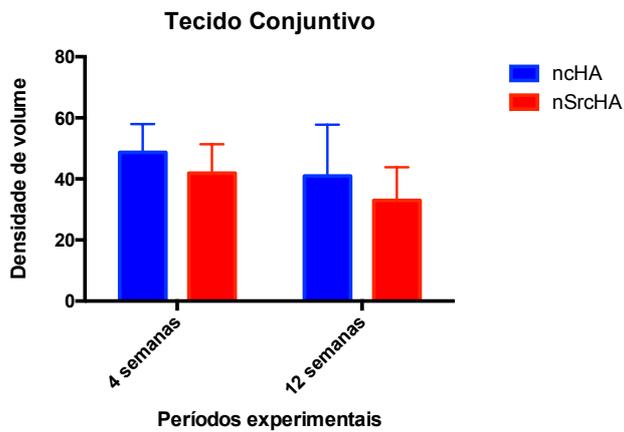


Figura 16: Densidade de tecido conjuntivo dos dois materiais apos os dois períodos experimentais.

8. DISCUSSÃO

O aspecto mais importante durante o desenvolvimento de novos biomateriais são os testes *in vitro*, *in vivo* para posterior avaliação com ensaios clínicos para confirmar a sua biocompatibilidade¹². O uso de coelhos na experimentação animal se deve ao fato de que é um animal de porte médio, permite padronização do ambiente, baixo custo, apresenta similaridade com os humanos em relação à composição, densidade mineral óssea e a resistência à fratura, visto que quanto maior a aproximação fisiológica, anatômica e orgânica, mais aplicáveis são as conclusões do estudo¹³.

A localização anatômica relevante, a anatomia única e sua fisiologia fazem dos seios maxilares uma região singular para a investigação clínica de biomateriais¹⁴. A escolha da região do seio maxilar para este estudo está vinculada a sua simetria bilateral¹⁵, apresentando áreas que servem como testes avaliativos confiáveis produzindo bilateralmente resultados de tratamentos em relação à cicatrização óssea¹⁶. Segundo Lekholm e Zarb¹⁷, a região de seio maxilar apresenta, segundo sua escala, características de osso tipo IV, ou seja, formado por trabéculas ósseas esparsas, caracterizadas por osso esponjoso de densidade baixa, podendo contribuir para a avaliação da resposta biológica aos biomateriais.

A técnica de elevação da membrana do seio maxilar utilizando a parede lateral já é bastante consagrada na literatura como alternativa reconstrutiva da maxila posterior atrofica^{18,19}. Esta técnica apresenta altas taxas de sobrevivência tanto de implantes como também de próteses como pode ser observado através de revisões sistemáticas produzidas nos últimos 10 anos^{20,21,22,23,24,25}. Contudo, o material a ser preenchido quer seja osso autógeno, biomaterial sintético, ou a associação deles^{26,27} ou mesmo a ausência^{28,29,30,31} na cavidade formada é fonte de questionamento e intensa investigação científica.

Moreno *et al*²⁶ em seus estudos avaliaram o padrão de remodelação óssea em grupos com proporções diferentes entre osso autógeno e osso bovino inorgânico, afirmando que quanto maior a proporção de osso autógeno maior será o índice celular, apresentando o dobro de tecido osteóide. Enquanto Jensen³², em sua revisão sistemática, afirma que a estabilidade volumétrica do enxerto após a elevação da membrana sinusal melhora significativamente com o aumento da proporção do osso bovino inorgânico (Bio-oss). Corroborando, Lambert *et al*²⁷ avaliaram a neoformação óssea entre o coágulo, osso autógeno particulado e enxerto ósseo de origem bovina, este apresentando

uma maior manutenção volumétrica nos períodos estudados de 1 semana, 5 semanas e 6 meses, bem como uma maior neoformação óssea, porém a densidade óssea foi maior nos grupos coágulo e osso particulado nos períodos iniciais de 1 e 5 semanas, não apresentando porém diferenças significativas após 6 meses com o grupo dos biomateriais. O presente estudo avaliou os biomateriais após 4 e 12 semanas da implantação, que foram períodos experimentais suficientes para a avaliação da resposta biológica inicial e mais tardia já com a presença de remodelação óssea.

A alta cristalinidade e baixa taxa de absorção são limitações conhecidas da hidroxiapatita sintética. Modificações na composição química da HA pela substituição do grupo fosfato (PO_4) por carbonato (CO_3) leva à síntese de uma hidroxiapatita carbonatada (cHA) com novas características que superam as limitações citadas e ampliam a capacidade terapêutica das hidroxiapatitas³³.

A incorporação na hidroxiapatita de grupos carbonatos é defendida por diversos autores^{3,5,34,35}. O tipo de substituição, quer seja no sítioA ou no sítioB, influencia no desempenho deste substrato formado como defendido por Habibovic *et al*³⁴ onde hidroxiapatitas carbonatadas do tipoA apresentaram uma maior neoformação óssea *in vivo* quando comparados com a do tipoB. Os autores concluíram que os eventos de dissolução/reprecipitação que resulta na formação de apatitas biológicas são mais acentuados nas cerâmicas teoricamente menos solúvel em aplicações *in vivo*.

Corroborando Landia *et al*³⁵ afirmam em seu trabalho que a hidroxiapatita carbonatada porosa apresentou duas vezes mais formação óssea do que a hidroxiapatita estequiométrica, além disso apresentou as propriedades de biocompatibilidade e osseointegração, maior ação osteoindutora e de bioreabsorção quando comparada com a HA. Esses autores também concluíram que as substituições do tipo A/B estão relacionadas com o tipo de osso. Uma relação entre a carbonatação do tipo A foi observada em tecidos mais antigos³⁵. Outra vantagem também é que essas substituições dos radicais fosfato e hidroxila por carbonatos não resultam em nenhuma alteração na razão estequiométrica de Ca/P³⁷. Contudo, os biomateriais utilizados em nosso experimento apresentam como características apatitas carbonatadas com a incorporação do estrôncio, tornando esse material uma estrutura deficiente de cálcio, e que pode permitir teoricamente um maior ganho de tecido ósseo neoformado.

Não há até o momento na literatura científica um substituto ósseo ideal, fato esse que estimula a comunidade acadêmica na busca de um substituto ósseo que possa agregar diversas características como desempenho e capacidade reparadora como alternativa ao osso autógeno. Até o momento, o

material que mais se aproxima do componente biológico dos ossos são os fosfatos de cálcio, por essa razão existe uma série significativa de investigação sobre esse composto³⁸.

Com o surgimento de alternativas de síntese de material sem a utilização de temperaturas elevadas, pode-se chegar a materiais produzidos com estruturas manométricas. Uma superfície nanoestruturada caracteriza-se por uma superfície mais ativa, alterando a natureza superficial da biocerâmica melhorando assim a bioreabsorção e biointegração³⁷. Há uma vantajosa interação das proteínas que controlam a função celular com materiais que apresentam propriedades nanométricas, estas superfícies em nanoescalas promovem adesão de osteoblastos e proliferação celular (ref). Corroborando, Sohn *et al*³⁰, afirmaram que os materiais sintéticos nanoestruturados podem imitar as propriedades da matriz extracelular natural e, portanto, apresentam um grande potencial para a sua aplicação. O osso é um nano compósito, desta forma a medicina regenerativa se torna mais promissora utilizando a nanotecnologia³⁹.

Especificamente, 70% da matriz do osso é constituído de nanocristais de HA que apresentam 20-80 nm de comprimento e 2-5nm de espessura. Além da semelhança dimensional com o osso os biomateriais nanoestruturados apresentam como propriedades de superfície a topografia, a química, a molhabilidade e energia de superfície apresentando aumento significativo em comparação com as rugosidades convencionais dos materiais microestruturados⁵. Os materiais nanoestruturados podem promover uma maior quantidade de interações específicas de proteínas, de forma mais eficiente para estimular o crescimento do novo osso em comparação com os materiais convencionais.

A produção de materiais em escala nanométricas pode ocorrer através da reação ácido-base, método seco, hidrotermal ou mesmo através da produção tendo a hidroxiapatita- quitosana como modelo, como defendido por, Ramlil *et al*³⁹. Este processo se dá através da calcificação do modelo, tendo como resultado uma biocerâmica nanoestruturada, com grande área de superfície e macroporosa. Neste estudo foram sintetizados materiais nanoestruturados através da técnica de calcificação.

A quantidade de substituições isomórficas que a hidroxiapatita pode sofrer incorporando à sua estrutura diversos íons, pode otimizar seu desempenho clínico, tornando-a mais solúvel, modificando espacialmente a estrutura do seu cristal, favorecendo desse modo, a sua bioreabsorção^{4, 5, 38, 40}. Alguns autores sugeriram a substituição parcial do cálcio pelo zinco^{41, 42, 43}, enquanto outros

sugerem essa substituição pelo estrôncio^{44, 45, 46, 47, 48, 49}. Ambos os elementos pertencem a família dos alcalinos terrosos, apresentando assim valência de +2, portanto igual valor do cálcio.

Ambos elementos são importantes na fase inicial da formação óssea, sendo que o estrôncio está presente, especialmente nas regiões de intensa atividade metabólica. O tamanho e a morfologia das partículas individuais, bem como o tipo e a extensão das substituições isomorfométricas, afetam diretamente as propriedades físico-químicas das apatitas.

Li *et al*⁴⁹ sugeriram a incorporação de estrôncio na superfície de implantes, foi verificado após 12 semanas uma melhor osseointegração nos implantes recobertos com hidroxapatita contendo estrôncio quando comparados com implantes revestidos apenas de hidroxapatita.

O presente estudo demonstrou que a ncHA contendo 5% de estrôncio é biocompatível e osseointegradora, apresentou osso neoformado em íntimo contato com o biomaterial, contudo sem diferenças a nível estatístico que a nSrcHA. Além disso, as doses de Sr²⁺ incorporadas na estrutura do cristal da HA pode modular a resposta celular *in vitro* e a resposta biológica *in vivo*. Estudos prévios observaram que o cimento de HA contendo 5% de estrôncio foi mais biocompatível, seguido do cimento de HA contendo 10% de estrôncio e por último o cimento de HA livre de Sr⁵⁰.

Em outro estudo, desses mesmos autores, observou-se que o cimento de HA contendo 5% de Sr atingiu maior resistência a compressão do que as amostras contendo 10% de Sr⁵¹. Esses dados indicam que existe uma dose ideal de Sr a incorporar no cristal da HA a fim de obter melhores propriedades físico-químicas e de biocompatibilidade⁵².

No entanto, os resultados do implante intramuscular e das experiências de implantação no fêmur de coelhos mostram que a taxa de dissolução média do cimento de HA contendo Sr aumenta com a elevação da quantidade de Sr⁵⁰. Isso pode ser explicado pelo fato de que uma HA contendo substituições é considerada uma HA deficiente em cálcio e, conseqüentemente, mais solúvel e quanto maior for a incorporação do metal, mais deficiente em cálcio ela se torna, por isso a concentração do metal incorporado é um importante parâmetro de controle para ajustar as propriedades da HA.

Um estudo *in vitro* avaliou a bioatividade da HA contendo Sr em fluido corporal simulado, e seu efeito sobre a proliferação, morfologia celular, fosfatase alcalina e atividade de osteopontina na cultura de células osteoprecursoras *in vitro*. A cerâmica de HA contendo Sr exibiu alta bioatividade em líquido corporal simulado, que foi clara pela formação rápida de apatita em sua superfície. O teste de cultura celular indicou que a HA contendo Sr tem boa biocompatibilidade com os osteoblastos humanos. Comparado com HA, a SrHA promoveu adesão de células osteoprecursoras e proliferação celular, não apresentando nenhum efeito deletério sobre a formação da matriz extracelular e mineralização. Também foi demonstrado que a presença do Sr estimula a diferenciação de células osteoprecursoras e aumenta a fosfatase alcalina e expressão da osteopontina.⁵³ Esse estudo concluiu que o Sr promove a ação osteoblástica e neoformação óssea subsequente. No entanto, mais pesquisas são necessárias para a compreensão detalhada dos mecanismos celulares e moleculares dos efeitos do estrôncio em células ósseas, assim como estudos quantitativos histomorfométricos.

Um estudo *in vivo* investigou a resposta biológica de um cimento ósseo de HA contendo Sr injetado em osso esponjoso de crista ilíaca de coelhos por 1, 3 e 6 meses. A afinidade óssea ao cimento de HA contendo Sr aumentou de 73,55% \pm 3,50% após 3 meses para 85,15% \pm 2,74% após 6 meses ($p=0.01$).⁵⁴ Esses resultados evidenciam que o cimento de HA contendo Sr é biocompatível e osteocondutor confirmando os dados obtidos neste estudo apesar do nosso período experimental ter sido de apenas de 1 e 3 meses. Em outro estudo *in vivo*, foi alcançada a osseointegração em osso esponjoso com o uso de cimento de HA contendo Sr em coelhos, que estimulou a formação e união óssea, a fusão do osso com cimento de HA contendo Sr indicou sua biocompatibilidade *in vivo*. A marcação com tetraciclina mostrou que a área de mineralização foi na ordem: 3 meses - 1 mês - 6 meses. No 1º mês, o aumento da mineralização foi devido ao processo de reparação do osso. Um aumento adicional na área de mineralização em 3 meses indicou que a HA contendo Sr tem um efeito estimulante na formação óssea. A área de mineralização diminuiu em 6 meses porque o processo de reparação foi concluído apresentando apenas remodelação óssea.⁵⁵ Dentre todos os estudos analisados foi observado que a HA contendo Sr é biocompatível em dependência da concentração de Sr.

Como demonstrado pelos estudos anteriormente citados a adição de estrôncio na estrutura da hidroxiapatita mostrou-se bastante eficiente tanto *in vitro* como *in vivo*; porém, a sua incorporação

num percentual de 5% na estrutura da hidroxiapatita carbonatada não apresentou vantagens estatisticamente significantes.

9. CONCLUSÃO

No presente trabalho, pôde-se verificar que:

A hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada contendo 5% de estrôncio sob a forma de esferas é biocompatível e osseocondutora.

A adição de estrôncio não promoveu mais osteogênese quando comparado ao grupo sem estrôncio.

Estudos devem ser direcionados na busca de um possível percentual ideal de estrôncio a fim de otimizar as propriedades das hidroxiapatitas carbonatadas.

Novos estudos envolvendo duas substituições estruturais desse composto fazem-se necessários, tornando-o ainda mais interessante para a comunidade científica.

ABSTRACT

For bone defect treatment and recuperation that can have different etiologies such as traumas, infections and malformations, a series of scientific studies have been done over the years in order to produce material with biological features. Several types of biomaterials have been successfully used. Biological apatites present low crystallinity and contains cationic and anionic substitutions in the crystal lattice. This feature differs biological apatites from stoichiometric hydroxyapatite. Changes in the hidroxyapatite composition are reasons of study in order to improve the bone tissue response after the implantation. Strontium contributes due to its dual capacity that consists in reduce bone resorption and osteoblastic activity induction, and carbonates promotes even more osteoconductivity, stimulating bone formation. Thus, adds important features to the hidroxyapatite morphological restructuring. The present study aims to characterize physicochemically and analyze in a comparative way and histomorphometric, carbonated hidroxyapatite containing 5% Sr and the physical-chemical characterization, before and after the implantation. Were used 12 New Zealand white rabbits, divided according to the experimental group: Group I- Nanocarbonateapatite with 5% Sr - (ncSrHA-Experimental) and Group II – Nanocarbonateapatite (ncHA- control) subdivided according to experimental periods from 4 and 12 weeks. After surgical site preparation, were implanted in the maxillary sinus cavities ncSrHA and ncHA, group I(experimental) spheres on the left and right sides respectively, group 2 (control): right side. After experimental periods, the animals were euthanized through lethal dose of general anesthetic and after the bone blocks were removed and the specimens sent to histological and histomorphometric analysis. After that, 6 bone blocks were obtained, in which 5 specimes from each experimental period were processed for paraffin embedding, cut with 5µm and stained with hematoxylin and eosin for histomorphometric analysis and a specimen was processed for resin embedding in order to perform physical-chemical characterizations ((FTIR, MEV). In the period of 4 weeks, the ncHA group showed the presence of new formed bone and osteoblastic surface next to the wall defect. In the nSrcHA group the biomaterial was in a diffuse way, a higher osteogenic matrix deposition around the biomaterial, new formed bone tissue, both near the wall defect and in the interior. In the period of 12 weeks, the ncHA group showed biomaterial in the interior of the defect and new formed bone, while the nSrcHA group 12 weeks an intense bone formation in the interior of the defect with osteocytes presence, characterizing mature bone tissue. However, the histomorphometric analysis showed no significant statistically difference for the volume density between the materials, new formed bone tissue from connective tissue between the groups and experimental periods. Thus, both materials showed features of biocompatibility, as well as bio osteoconductive.

Key-words: *Maxillary sinus, rabbits, carbonated hidroxyapatite, nanotechnology, strontium.*

REFERÊNCIAS

1. Granjeiro, JM, Soares GDA. “Materiais cerâmicos”. In Biomateriais em odontologia: Princípios, métodos investigativos e aplicações. São Paulo. p. 57-68. Cap 4.
2. Ripamonti U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. *Biomaterials* 1996;17(1):31-35.
3. Carretero C et al. Evaluación de labiocompatibilidade de apatitecarbonatada de síntese seca por meio del cultivo de células osteoprogenitoras de porcino. *Rev.F ac. Med. Bogotá*. 2009 July/Dec; 17(2):2.
4. Costa ACFM et al. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos* 2009; 4(3):29-38.
5. Narasaraju TSB, Phebe DE. Some physico-chemical aspects of hydroxylapatite. *Journal Of Materials Science*.1996; 31:1-21.
6. Jong WF, *Rec. Tray. Chem. Pays-Bas* 45 (1926) 445.
7. Souza e Ferrão, 2006.
8. Kestenbach H, Botta WJ, Botta WJ. *Microscopia Eletrônica: Transmissão e Varredura*. São Paulo: Associação Brasileira de Metais, 1989. 104 p.
9. Stoch A, Jastrzebski W, Brozk A, StochJ, Szaraniec J, Trybalska B, Kmita G. FTIR absorption–reflection study of biomimetic growth of phosphates on titanium implants. *Journal of Molecular Structure*.2000;555: 375–382
10. Markovic M, Fowler BO, Tung MS. Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite reference material. *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol*.2004;109(6): 553-568.
11. ‘Slósarczyk A, Paszkiewicz Z, Paluszkiwicz C. FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods. *Journal of Molecular Structure*.2005;744–747:657–661.
12. Ratner B. New ideas in biomaterials science- a path to engineered biomaterials. *J Biomed Mat Res* 1993; 27(7):837-50.

13. Calasans-Maia MD, Monteiro M, Áscoli FO, Granjeiro JM. The rabbit as an animal model for experimental surgery. *Acta Cirúrgica Brasileira* 2009; 24: 325-8.
14. Ho SKC, Peel SAF, Hu ZM, Sándor GKB, Clokie CML. Augmentation of the Maxillary Sinus: Comparison of Bioimplants Containing Bone Morphogenetic Protein and Autogenous Bone in a Rabbit Model. *J Can Dent Assoc* 2010: 76-108.
15. Lundgren AK, Sennerby L, Lundgren D. An experimental rabbit model for jaw-bone healing. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 1997; 26:461-4.
16. Riecke B, Heiland M, Hothan A, Morlock M, Amling M, Blake FAS. Primary implant stability after maxillary sinus augmentation with autogenous mesenchymal stem cells biomechanical evaluation in rabbits. *Clin. Oral Impl. Res.* 2011; 22:1242-6.
17. Lekholm U, Zarb GA. Patient selection and preparation. In: Branemark PI, Zarb GA, Albrektsson T. *Tissue-integrated prostheses, osseointegration in clinical dentistry*. Berlin: Quintessenz; 1985.
18. Chiapasco M, Casentini P, Zaniboni M. Bone augmentation procedures in implant dentistry. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009; 24(Suppl.):237-59.
19. Del Fabbro M, Testori T, Francetti L, Weinstein R. Systematic review of survival rates for implants placed in the grafted maxillary sinus. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2004; 24:565-77.
20. Browaeys H, Bouvry P, Bruyn HD. A literature review on biomaterials in sinus augmentation procedures. *Clin Implant Dent Relat Res* 2007; 9:166-77.
21. Wallace SS, Froum JJ. Effect of maxillary sinus floor augmentation on the survival of endosseous dental implants. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003; 8:328-43.
22. Jensen SS, Terheyden H. Bone augmentation procedures in localized defects in the alveolar ridge: clinical results with different bone grafts and bone-substitutes materials. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009; 24(Suppl.):218-36.
23. Esposito M, Grusovin MG, Coulthard P, Worthington HV. The efficacy of various bone augmentation procedures for dental implants: a Cochrane systematic review of randomized controlled clinical trials. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006; 21: 696-710.

24. Nkenke E, Stelzle F. Clinical outcomes of sinus floor augmentation for implant placement using autogenous bone or bone substitutes: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 2009; 20:124-33.
25. Pjetursson BE, Tan WC, Zwahlen M, Lang NP. A systematic review of the success of sinus floor elevation and survival of implants inserted in combination with sinus floor elevation. *J Clin Periodontol* 2008;35:216.
26. Moreno PG et al. Effect of anorganic bovine bone to autogenous cortical bone ratio upon bone remodeling patterns following maxillary sinus augmentation. *Clin. Oral Impl. Res.* 2011; 22:857-864.
27. Lambert F et al. Influence of space-filling materials in subantral bone augmentation: blood clot vs. autogenous bone chips vs. bovine hydroxyapatite. *Clin. Oral Impl. Res.* 2011; 22:538-545.
28. Lin I-Ching, Gonzalez AM, Chang H, Kao S, Chen T. A 5-Year Follow-up of 80 Implants in 44 Patients Placed Immediately After the Lateral Trap-Door Window Procedure to Accomplish Maxillary Sinus Elevation Without Bone Grafting. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2011; 26: 1079-1086.
29. Gabbert O, Koob A, Schmitter M, Rammelsberg P. Implants placed in combination with internal sinus lift without graft material: an analysis of short-term failure. *J Clin Periodontol* 2009; 36:177-183.
30. Sohn D, Kim W, An K, Song K, Lee J, Mun Y. Comparative Histomorphometric Analysis of Maxillary Sinus Augmentation With and Without Bone Grafting in Rabbit. *Implant Dentistry* 2010;19:259-270.
31. Ahn J, Cho S, Byrne G, Kim J. New Bone Formation Following Sinus Membrane Elevation Without Bone Grafting: Histologic Findings in Humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2011; 26:83-90.
32. Jensen T, S Schou, A Stavropoulos, H Terheyden, P Holmstrup: 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.* 2012; 41: 114-120.
33. Keiichi K, Mitsunobu K, Masafumi S, Yutaka D, Toshiaki S. Induction of new bone by bFGF-loaded porous carbonate apatite implants in femur defects in rats. *Clin. Oral Impl. Res.* 2009; 20:560-5.

34. Habibovic P et al. Comparison of two carbonated apatite ceramics in vivo. *Acta Biomaterialia* 2010; 6:2219-26.
35. Landia E, G. Celottia, G. Logroscinob, A. Tampieria. Carbonated hydroxyapatite as bone substitute. *Journal of the European Ceramic Society* 2003; 23:2931-7.
36. Xu JL, Khor KA, Sui JJ, Zhang JH, Chen WN. Protein expression profiles in osteoblasts in response to differentially shaped hydroxyapatite nanoparticles. *Biomaterials* 2009; 30(29):5385-91.
37. Wopenka B, Pasteris JD. A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Materials Science and Engineering C*. 2005;25:131-143.
38. Ramli1 RA, Adnan R, Bakar MA. Masudi SM. Synthesis and Characterisation of Pure Nanoporous Hydroxyapatite. *Journal of Physical Science*.2011; 22:25-37.
39. Kawamura H et al. Long term implantation of zinc-releasing calcium phosphate ceramics in rabbit femora. *J Biomed Mater Res Part A*. 2003; 65: 468-474.
40. DOURADO ER. Preparação e caracterização de hidroxiapatita nano estruturada dopada com estrôncio. Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas. Rio de Janeiro- Dezembro – 2006
41. Nascimento L et al. Osseointegration evaluation of hydroxyapatite and zinc containing hydroxyapatite granules in rabbits. *Key Engineering Materials*.2012; 493-4:252-257.
42. Calasans-Maia MD et al. Effect of Hydroxyapatite and Zinc-containing Hydroxyapatite on Osseous Repair of Critical Size Defect in the Rat Calvaria. *Key Eng Mater*2008; 361-3:1273-6.
43. Machado CPG, Pintor AVB, Gress M AKA, Rossi AM, Granjeiro JM, Calasans-Maia M. *Innov Implant J, BiomaterEsthet*, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 9-14, jan./abr. 2010.
44. Li B et al. Preparation and cellular response of porous A-type carbonated hydroxyapatite nanoceramics. *Materials Science and Engineering C*. 2012; 32: 929-936.
45. Bigi A, Boanini E, Capuccini C, Gazzano M. Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals. *Inorganica Chimica Acta* 360, 2007: 1009-16.

46. Marie PJ, Ammann P, Boivin G, Rey C. Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. *Calcif Tissue Int.* 2001;69(3):121-9.
47. O'Donnell MD, Fredholm Y, Rouffignac A, Hill RG. Structural analysis of a series of strontium-substituted apatites. *Acta Biomaterialia* 4, 2008: 1455-64.
48. Handley-Sidhu S, Renshaw JC, Yong P, Kerley R, Macaskie LE. Nano-crystalline hydroxyapatite bio-mineral for the treatment of strontium from aqueous solutions. *Biotechnol Lett.* 2011; 33:79-87.
49. Li Y et al., The effect of strontium-substituted hydroxyapatite coating on implant fixation in ovariectomized rats, *Biomaterials* 2010.
50. Guo DG, Xu KW, Han Y. The influence of Sr doses on the in vitro biocompatibility and in vivo degradability of single-phase Sr-incorporated HAP cement. *J Biomed Mater Res A.* 2008;86(4):947-58.
51. Guo DG, Xu KW, Zhao XY, Han Y. Development of a strontium-containing hydroxyapatite bone cement. *Biomaterials* 2005; 26(19):4073-83.
52. Christoffersen J, Christoffersen MR, Kolthoff N. Effects of strontium ions on growth and dissolution of hydroxyapatite and on bone mineral detection. *Bone* 1997; 20(1):47-52.
53. Xue W, Moore JL, Hosick HL, Bose S, Bandyopadhyay A, Lu WW, Cheung KMC, Luk KDK. Osteoprecursor cell response to strontium-containing hydroxyapatite ceramics. *J Biomed Mater Res A* 2006; 79(4):804-14.
54. Wong CT et al. In vivo cancellous bone remodeling on a Strontium containing hydroxyapatite (Sr-HA) bioactive cement. *J. Biomed Mater Res A* 2004;68(3):513-9.
55. Wong CT, Chen QZ, Lu WW, Leong JCY, Chan WK, Cheung KMC, Luk KDK. Ultrastructure study of mineralization of a strontium-containing hydroxyapatite (Sr-HA) cement in vivo. *J Biomed Mater Res A.* 2004; 70(3):428-35.

Anexo 01:



Serviço Público Federal
Universidade Federal Fluminense
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Comitê de Ética no Uso de Animais

Certificamos que o projeto nº 190, intitulado “AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO DA CARBONATOAPATITA NANOESTRUTURADA COM 5 % de ESTRÔNCIO EM LEVANTAMENTO DE SEIO MAXILAR DE COELHOS” sob a orientação do Profª. Dra. Mônica Diuana Calasans Maia da Faculdade de Odontologia, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal da SBCAL e obteve a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais em 12 de abril de 2012.

Niterói, 12 de abril de 2012.

Presidente da C.E.U.A.