

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**Cerâmica fosfato de cálcio bifásica: Avaliação histomorfométrica após  
implantação em defeitos ósseos cirúrgicos alveolares de ratos.**

**Mariana Faria de Pinho**

**Belo Horizonte**

**2008**

**Mariana Faria de Pinho**

**Cerâmica fosfato de cálcio bifásica: Avaliação histomorfométrica após  
implantação em defeitos ósseos cirúrgicos alveolares de ratos.**

**Dissertação apresentada à Pontifícia  
Universidade Católica de Minas Gerais,  
como parte dos requisitos para a obtenção do  
Título de Mestre em Odontologia, área de  
concentração: Implantodontia.**

**Orientador: Prof. Elton Gonçalves Zenóbio**

**Belo Horizonte – MG**

**2008**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

P654c Pinho, Mariana Faria de  
Cerâmica fosfato de cálcio bifásica: avaliação histomorfométrica após  
implantação em defeitos ósseos cirúrgicos alveolares de ratos / Mariana  
Faria de Pinho. – Belo Horizonte, 2008.  
53 f.: il.

Orientador: Elton Gonçalves Zenóbio  
Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas  
Gerais, Programa de Pós Graduação em Odontologia.  
Bibliografia.

1. Implantes dentários. 2. Materiais biocompatíveis. 3. Materiais  
dentários. I. Zenóbio, Elton Gonçalves. II. Pontifícia Universidade Católica  
de Minas Gerais. Programa de Pós Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU: 616.314-089.843

Bibliotecária: Simone Ângela Faleiro van Geleuken – CRB 6 /1661

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

## **DEDICATÓRIA**

Ao meu pai, à minha mãe, ao Zé e à Maura  
Pelo amor e confiança em todas as fases da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador Prof. Elton Gonçalves Zenóbio, pela dedicação nos trabalhos experimentais e pelos ensinamentos nas clínicas, ao Prof. Paulo Eduardo Alencar de Souza e ao aluno de iniciação científica Aécio Abner Campos Pinto Júnior pela grande contribuição nos trabalhos experimentais.

Agradeço à Ju, minha companheira dos trabalhos experimentais e que se tornou uma amiga.

Agradeço à Profa. Gerluza Aparecida Borges Silva, e ao aluno Renato Mendes que abriram as portas da UFMG e nos acolheram no Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), e ao Prof. Martinho Campolina Rebelo Horta que me auxiliou nas análises estatísticas.

Aos meus professores e aos colegas de classe, que com sua experiência muito me ensinaram e auxiliaram em todo este percurso.

Aos meus familiares e pacientes que a cada dia foram confiando mais em minha capacidade como profissional.

A todos que de alguma forma contribuíram para essa conquista.

## SUMÁRIO

1. RESUMO	6
2. ABSTRACT	7
3. INTRODUÇÃO GERAL	8
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
5. OBJETIVOS DO ESTUDO	15
6. ARTIGO I	16
7. ARTIGO II	35
8. ANEXO	53

## 1. RESUMO

Atualmente há uma grande busca pelo desenvolvimento de novos biomateriais, para uso biomédico, que têm como função a substituição de tecidos vivos perdidos ou danificados. Esses materiais devem possuir características químicas, físicas e biológicas biocompatíveis aos tecidos do receptor. A aplicação das cerâmicas fosfato de cálcio bifásica (CFCB) tem recebido considerável atenção devido à sua biocompatibilidade e bioatividade. Com a composição química semelhante ao osso natural, as cerâmicas cálcio fosfato são não tóxicas, reabsorvíveis e não inflamatórias. Elas não causam reação imunológica ou resposta irritativa e possuem excelente habilidade osteocondutiva. Os fatores mais importantes a serem avaliados para se obter previsibilidade no processo de reparo ósseo são o comportamento osteocondutivo e de reabsorção, a histocompatibilidade, a bioatividade e o tempo de remodelamento. Baseado na análise histomorfométrica, este estudo avaliou o comportamento biológico da cerâmica fosfato de cálcio bifásica em relação ao tecido ósseo, após o preenchimento de defeitos ósseos cirúrgicos alveolares de ratos. Foram utilizados neste estudo 12 ratos machos Wistar e a amostra foi composta de 24 defeitos ósseos cirúrgicos alveolares, sendo 12 para o grupo controle e 12 para o grupo experimental, em um modelo de boca dividida. Os defeitos ósseos cirúrgicos alveolares do grupo experimental foram preenchidos com a cerâmica fosfato de cálcio bifásica e os do grupo controle foram preenchidos naturalmente por coágulo. Após os períodos de 7, 15 e 60 dias foram realizados os sacrifícios dos animais e o protocolo de rotina histológica. Segundo os resultados, o material demonstrou ser biocompatível e osseointegrável, apesar de que no período final experimental foi observada pouca redução em seu volume. De maior importância, este estudo concluiu que a presença da cerâmica fosfato de cálcio bifásica não aumentou a densidade óssea e causou um atraso no tempo de reparo e formação óssea no grupo experimental.

**Palavras Chave:** Implantes dentários. Biomateriais. Cerâmica fosfato de cálcio bifásica

## 2. ABSTRACT

There has been a continuous search for the development of new materials for medical use, aiming to replace damaged or lost living tissues. These materials and their chemical, physical and biological properties must be biocompatible. Nowadays, calcium phosphate ceramics have received especial attention due to their bioactivity and biocompatibility. Their chemical composition has similarities to the natural bone and they are nontoxic, reabsorbable and non inflammatory. They cause no immunological reaction or irritation and have excellent osteoconductive ability. The most important factors to evaluate the predictability of achieving bone repair are the osteoconductivity and absorbability behavior of the biomaterial, its histocompatibility, bioactivity, and remodeling period. In this context and based in the histomorphometric analyses, this study evaluated the biological behavior of a biphasic calcium phosphate ceramics, in relation to the bone tissue after filling the surgical alveolar bone defects created in rats. Twelve male Wistar rats were used and the sample consisted of 24 alveolar defects: control group (n=12) and test group (n=12), in a split mouth design. In the test group, the alveolar defects were filled with biphasic calcium phosphate ceramic and in the control group, they were naturally filled with blood clot. At the 7th, 15th and 60th days, the animals were sacrificed and the protocol for histological routine completed. According to the results, the material proved to be biocompatible and it was osteointegrated, although in the final experimental period little reduction of its volume was observed. Most importantly, this study concluded that the use of biphasic calcium phosphate ceramic caused a delay in the alveolar healing process and failed to promote an increase in bone density.

**Key words:** Dental implants. Biomaterials. Biphasic calcium phosphate ceramics.

### 3. INTRODUÇÃO GERAL

A reposição da perda dental com objetivo da otimização da reabilitação bucal estética e funcional, vem apresentando mudanças no planejamento, nas técnicas e nos biomateriais aplicados. A exodontia sem uma abordagem conservadora ou reparadora pode resultar em danos ao osso alveolar remanescente, como sua redução em altura e largura, dificultando ou até mesmo impossibilitando o procedimento cirúrgico de instalação de implantes osseointegráveis.

A atrofia fisiológica do rebordo após exodontia é, segundo Atwood (1971), crônica, progressiva, lenta, irreversível e de causas multi-fatoriais, e pode ser dividida em três categorias: fatores anatômicos, que incluem tamanho e formato do rebordo, tipo do osso e do periósteo; fatores metabólicos, como idade, sexo, condições hormonais e minerais sistêmicas; e fatores mecânicos, como frequência, direção e quantidade da força aplicada ao rebordo, tipo de oclusão, e formato e tipo dos dentes. Defeitos ou atrofia do rebordo alveolar na maxila e mandíbula, resultantes de uma perda óssea em volume, podem ser causados por vários fatores, dentre eles a grave destruição por doença periodontal, perda dental prematura ou trauma (HOWELL et al., 1997). Em casos de atrofia grave, para se reabilitar o paciente, se faz necessário o aumento ou reconstrução do rebordo alveolar, porém o ideal é que sejam utilizados métodos preventivos em relação à reabsorção do rebordo. O reconhecimento destas potenciais e significativas mudanças clínicas do processo alveolar após a remoção dos dentes têm determinado o uso de vários materiais e técnicas, com o intuito de prevenir ou minimizar o colapso destes tecidos (HOWELL et al., 1997; FUGAZZOTTO, 2005), além de restaurar defeitos ósseos existentes no momento das exodontias (GAUTHIER et al., 1999).

O preenchimento alveolar imediato com osso autógeno ou biomateriais após a exodontia, associado ou não ao uso de membranas, apresenta-se como uma das técnicas mais utilizadas na tentativa de preservação do volume ósseo, podendo também ser utilizada para acelerar ou melhorar o processo de reparo. (FUGAZZOTTO, 1997; PINTO et al., 2000; OKAMOTO e TRENTO, 2002 )

De acordo com Misch (2006), a quantidade de perda óssea que ocorre no primeiro ano após a perda dental é quase dez vezes maior do que a que ocorre nos anos seguintes.

Para Lindhe (1999), Misch (2006) e Okamoto e Trento (2002), a neoformação óssea pode ocorrer através dos mecanismos de osteogênese, osteoindução ou osteocondução. A osteocondução é caracterizada pelo crescimento ósseo por meio de aposição de osso circunjacente, porém é necessária a presença de células ósseas ou mesenquimais diferenciadas locais. Dentre os materiais osteocondutores há os materiais aloplásticos e os xenógenos. A osteoindução é o processo pelo qual células indiferenciadas são induzidas à transformação em osteoblastos, responsáveis pela neoformação óssea, sob a influência de um ou mais agentes indutores. Os materiais osteoindutores mais comuns são os enxertos autógenos. A osteogênese refere-se ao crescimento ósseo derivado das células viáveis, transferidas dentro do enxerto. O osso autógeno é o único material osteogênico e o melhor material para enxerto. Para que estes mecanismos ocorram faz-se necessário o uso de materiais de preenchimento, para auxiliar a união das corticais ósseas vestibular e palatina e para estimular a regeneração.

Há vários materiais que são utilizados no preenchimento de defeitos ósseos, como enxertos ósseos autógenos, alógenos, xenógenos e os biomateriais. (LEONEL et al., 2003)

Segundo Okamoto e Trento (2002) e Santos et al. (2003), do ponto de vista biológico, o enxerto ósseo autógeno (tecido ósseo do próprio receptor, retirado de outra região doadora) é o melhor material de preenchimento, porém sua utilização se torna menos viável, devido à necessidade de uma cirurgia em outra área adicional, para remoção do material, tornando a cirurgia de maior morbidade para o paciente. Outro fator, é que de acordo com Fellah, Gauthier, Weiss, et al (2008), os enxertos ósseos autógenos são altamente reabsorvidos e são frequentemente degradados antes do total período de cicatrização ter finalizado.

Outra técnica que vem sendo utilizada por muitos profissionais é o enxerto alógeno ou homogêneo (obtido de outro indivíduo da mesma espécie do receptor). Há também os enxertos heterógenos ou xenógenos (retirados de uma espécie diferente do receptor, como o osso bovino) que atuam principalmente como uma matriz para neoformação óssea (osteocondutores).

Atualmente há uma grande busca pelo desenvolvimento de novos biomateriais (aloplásticos) que, de acordo com Leonel et al. (2003), são materiais artificiais criados para uso biomédico e têm como função a substituição de tecidos vivos perdidos ou danificados. Esses materiais precisam possuir características químicas, físicas e biológicas compatíveis com os tecidos do receptor, no local onde forem inseridos.

Dentre os diversos biomateriais já citados em artigos, há os metais inertes, as cerâmicas, os polímeros (LEONEL et al., 2003), as matrizes dentinárias (OKAMOTO; TRENTO, 2002) e os cimentos de ionômero de vidro (BALABANIAN et al., 2003).

Segundo Santos et al. (2003) os biomateriais cerâmicos podem ser divididos em cerâmicas fosfato de cálcio, como por exemplo, o cálcio hidroxiapatita (HA), os tricálcio-fosfatos e o fosfato de cálcio bifásico (Boneceramic®), materiais fosfato de cálcio obtidos de estruturas naturais como a HA coralina e a HA bovina (como exemplo o Bio-Oss®), e materiais a base de cerâmicas de vidro, que também são compostos por fosfato de cálcio, mas apresentam a sílica em sua composição (os chamados biovidro).

A cerâmica fosfato de cálcio bifásica (CFCB), é uma associação de hidroxiapatita e beta-fosfato tricálcio em proporções adequadas. Esse biomaterial tem demonstrado alta biocompatibilidade e boas propriedades osteocondutivas. (GAUTHIER et al., 1999).

Diversos autores como Pinto et al. (2000), Okamoto e Trento (2002), Alves-Rezende e Okamoto (1992), Carvalho; Okamoto e Garcia Junior (1998), Howell et al. (1997), Yilmaz; Efeoglu e Kiliç, (1998), Carvalho et al. (2004), Becker; Becker e Caffesse (1994), Kwon (1986) e Misch (2006), têm mostrado estudos onde biomateriais têm sido utilizados no preenchimento de alvéolos pós-exodontia com o objetivo de intensificação da neoformação óssea, manutenção do volume do rebordo alveolar após exodontias e, utilizando alguns tipos de enxertos, a aceleração do processo de reparo.

Clinicamente, o uso destes variados materiais ou o uso de membranas oclusivas em alvéolos frescos resultou geralmente em menores perdas teciduais nos sentidos ápico-coronários e \_estíbulo-linguais dos processos alveolares, comparando-se a controles onde não foram realizadas quaisquer das técnicas regenerativas (LEKOVIC et al., 1997; ARTZI et al., 2000; IASELLA et al., 2003; SERINO et al., 2003). No entanto, alguns autores (Camargo et al., 2000; Zubillaga et al., 2003) não obtiveram tais resultados clínicos.

Exames histológicos em alvéolos frescos preenchidos com biomateriais mostraram frequentemente remanescentes residuais não degradados ou reabsorvidos, mesmo após longos períodos transcorridos (NORTON et al., 2003; FROUM et al., 2004; THOMPSON et al., 2006; BECKER et al., 1996; ARTZI et al., 2000; FROUM et al., 2002; CARMAGNOLA et al., 2003).

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARTZI, Z.; TAI, H.; DAYAN, D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part I: Histomorphometric evaluations at 9 months. **Journal of Periodontology**, v.71, p.1015-1023, 2000.
2. ATWOOD D.A. Reduction of residual ridges: a major oral disease entity. **Journal of Prosthetic Dentistry**. V.26, n.3, p.266-278, 1971.
3. BALABANIAN, C.A.C.A.; et al. Glass-ionomer cement and bone repair in prolonged immobilization-induced stress. **RPG – Revista de pós graduação**. v.10, n.01, p.07-12, jan-mar, 2003.
4. BECKER, W.; BECKER, B.; CAFFESSE, R. A comparison of demineralized freeze-dried bone and autologous bone to induce formation in human extraction sockets. **Journal of Periodontology**, Houston, v.65, n12, p. 1128-1133, December, 1994.
5. BECKER, W.; et al. Clinical and histologic observations of sites implanted with intraoral autologous bone grafts or allografts. 15 human case reports. **Journal of Periodontology**, v.67, p.1025-1033, 1996.
6. BOIX, D.; et al. Alveolar bone regeneration for immediate implant placement using an injectable bone substitute: an experimental study in dogs. **Journal of Periodontology**, v.75, p.663-671, 2004.
7. CAMARGO, P.M.; et al. Influence of bioactive glass on changes in alveolar process dimensions after exodontia. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Oral Endodontics**, v.90, p.581-586, 2000.
8. CARMAGNOLA, D.; ADRIENS, P.; BERGLUNDH, T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss®. **Clinical Oral Implants Research**, v.14, p.137-143, 2003.

9. CARVALHO, A.C.P.; OKAMOTO, T.; GARCIA JUNIOR, I.R. Emprego de membrana de teflon para a reparação óssea guiada em exodontia após implante de colágeno com hidroxiapatita: estudo histológico em ratos. **RGO (Porto Alegre)**, v. 46, n.03, p.127-131, jul-set, 1998.
10. CARVALHO, P.S.P.; et al. Manutenção de volume do processo alveolar após exodontia com raspa de osso cortical autógeno. Relato de caso clínico. **Implant News**, v.1, n.1, jan-fev, 2004.
11. FELLAH, B.H.; GAUTHIER, O.; WEISS, P.; et al. Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. **Biomaterials**. v.29, p.1177-1188, 2008.
12. FROUM, S.; et al. Histological comparison of healing extraction sockets implanted with bioactive glass or demineralized freeze-dried bone allograft: A pilot study. **Journal of Periodontology**, v.73, p.94-102, 2002.
13. FROUM, S.; et al. Extraction sockets and implantation of hidroxyapatites with membrane barriers. A histologic study. **Implant Dentistry**, v.13, p.153-163, 2004.
14. FUGAZZOTTO, P.A. Treatment options following single-rooted tooth removal: A literature review and proposed hierarchy of treatment selection. **Journal of Periodontology**, v.76, p.821-831, 2005.
15. GAUTHIER, O.; et al. A new injectable calcium phosphate biomaterial for immediate bone filling of extraction sockets: a preliminary study in dogs. **Journal of Periodontology**, v.70, p. 375-383, 1999.
16. HOWELL, T.H.; et al. A feasibility study evaluating rHBMP-2/ absorbable collagen sponge device for local alveolar ridge preservation or augmentation. **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**. v.17, n.02, 1997.

17. IASELLA, J.M.; et al. Ridge preservation with freeze-dried bone allograft and a collagen membrane compared to extraction alone for implant site development: A clinical and histologic study in humans. **Journal of Periodontology**, v.74, p.990-999, 2003.
18. KWON, H.J.; et al. Alveolar ridge maintenance with hydroxylapatite ceramic cones in humans. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 44, 1986.
19. LEKOVIC, V.; KENNEY, E. B.; WEINLAENDER, M. A bone regenerative approach to alveolar ridge maintenance following tooth extraction. Report of ten cases. **Journal of Periodontology**, v.68, p.563-570, 1997.
20. LEONEL, E.C.F.; et al. Ação de diversos materiais de preenchimento durante a neoformação óssea. **Revista Brasileira de Odontologia**, v.60, n.3, p.154-156, maio-jun, 2003.
21. LINDHE, J. **Tratado de Periodontia clínica e Implantodontia oral**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 628p.
22. MANJUBALA, I.; et al. Bioactivity and osseointegration study of calcium phosphate ceramic of different chemical composition. **Journal of biomedical materials research**, v. 63, p.200-208, 2002.
23. MISCH, C.E. **Implantes Dentários Contemporâneos**. 2º ed. 685p. 2006.
24. NORTON, M.N.; et al. Efficacy of bovine bone mineral for alveolar augmentation: a human histologic study. **Clinical Oral Implants Research**, v.14, p.775-783, 2003.
25. OKAMOTO, T.; TRENTO, C.L. Implante homogêneo de matriz dentinária desmineralizada conservada em glicerina a 98 por cento em alvéolo dental. Estudo microscópico em ratos. **Revista Ciências Odontológicas**, v.5, n.5, p.33-41, jan-dez, 2002.

26. OKAMOTO, T.; et al. Implante de osso anorgânico associado ou não a hidroxiapatita em alvéolo dental após exodontia: estudo histológico em ratos. **BCI**, v.1, n.3, p17-25, jul-set, 1994.
27. PINTO, L.P.; et al. Regeneração óssea guiada de alvéolos de extração dentária. Porquê faze-la? **Revista Brasileira de Implantodontia**. v.6, n.3, p.9-12, 2000.
28. SANTOS, F.A.; et al. Utilização do vidro bioativo na regeneração óssea guiada: revisão de literatura. **RBP – Revista Brasileira de Implantodontia & Prótese sobre Implantes**, v.10, n.40, p.320-326, out-dez, 2003.
29. SERINO, G.; et al. Ridge preservation following tooth extraction using a polylactide and polyglycolide sponge as space filler: a clinical and histological study in humans. **Clinical Oral Implants Research**, v.14, p.651-658, 2003.
30. THOMPSON, D.M.; ROHER, M.D.; PRASAD, H.S. Comparison of bone grafting materials in human extraction sockets: Clinical, histologic, and histomorphometric evaluations. **Implant Dentistry.**, v.15, p.89-94, 2006.
31. YILMAZ, S.; EFEOGLU, E.; KILIÇ, A.R. Alveolar ridge reconstruction and/or preservation using root form bioglass cones. **Journal of Clinical Periodontology**, v.25, p.832-839, 1998.
32. ZUBILLAGA.; et al. Changes in alveolar bone height and width following post-extraction ridge augmentation using a fixed absorbable membrane and demineralized freeze-dried bone osteoinductive graft. **Journal of Periodontology**, v.74, p.965-975, 2.

## **5. OBJETIVOS DO ESTUDO**

### **Gerais**

- Avaliar histomorfometricamente o biomaterial cerâmica fosfato de cálcio bifásica utilizado como substituto ósseo quando implantado em defeitos ósseos cirúrgicos alveolares de ratos.

### **Específicos**

O propósito do presente estudo é avaliar, baseado em análise histomorfométrica, a resposta do biomaterial utilizando-se os seguintes parâmetros:

- comportamento de biodegradação,
- tempo de reabsorção e
- qualidade do osso formado (densidade óssea).

## 6. Artigo I

### **Cerâmica fosfato de cálcio bifásica: conceituação, composição, propriedades e aplicações.**

Mariana Faria de Pinho, Juliana Maia da Silveira, Paulo Eduardo Alencar de Souza, Elton Gonçalves Zenóbio.

#### **RESUMO**

Atualmente há uma grande busca pelo desenvolvimento de novos biomateriais, para uso biomédico, que têm como função a substituição de tecidos vivos perdidos ou danificados. Esses materiais devem possuir características químicas, físicas e biológicas biocompatíveis aos tecidos do receptor. A aplicação das cerâmicas fosfato de cálcio bifásica (CFCB) tem recebido considerável atenção devido à sua biocompatibilidade e bioatividade. Com a composição química semelhante ao osso natural, as cerâmicas cálcio fosfato são não tóxicas, reabsorvíveis e não inflamatórias. Elas não causam reação imunológica ou resposta irritativa e possuem excelente habilidade osteocondutiva. Os fatores mais importantes a serem avaliados para se obter previsibilidade no processo de reparo ósseo são o comportamento osteocondutivo e de reabsorção, a histocompatibilidade, a bioatividade e o tempo de remodelamento. Por meio de uma revisão literária, este estudo avaliou a formação e composição da CFCB, os mecanismos de dissolução, biodegradação e reabsorção e a porosidade e microarquitetura dos poros. Também foi avaliada a influência da temperatura de sinterização e como estes fatores interferem nas propriedades físicas e químicas da CFCB e nas reações celulares geradas por este material.

**Palavras Chave:** Implantes dentários. Biomateriais. Cerâmica fosfato de cálcio bifásica

## INTRODUÇÃO

Devido aos avanços da biotecnologia, maior acessibilidade econômica e conhecimento da técnica por parte dos profissionais, assim como a informação aos pacientes, a implantodontia apresenta-se como uma realidade na Odontologia atual.

A reposição da perda dental, objetivando a otimização da reabilitação bucal estética e funcional, vem apresentando mudanças no planejamento, nas técnicas e nos biomateriais aplicados. Existem vários materiais que são utilizados no preenchimento de defeitos ósseos, como enxertos ósseos autógenos, alógenos e xenógenos, além dos biomateriais <sup>1</sup>.

Do ponto de vista biológico, o enxerto ósseo autógeno é o melhor material de preenchimento, visto seu alto potencial osteogênico <sup>2</sup>. Porém, sua utilização se torna menos viável, devido à necessidade de uma cirurgia em outra área adicional, tornando o procedimento de maior morbidade para o paciente, além da quantidade de osso ser limitada em média a 20cm<sup>3</sup>. Outro fator, é que estes são altamente reabsorvidos e frequentemente degradados antes do total período de cicatrização ter finalizado <sup>3</sup>.

Outra técnica, que vem sendo utilizada por muitos profissionais, são os enxertos alógenos ou homogêneos, porém pode-se avaliar como desvantagem de seu uso o risco de transmissão de infecções, além da sua baixa compatibilidade imunológica <sup>4</sup>.

Podem ser relatados também, os enxertos heterógenos ou xenógenos que atuam principalmente como uma matriz para neoformação óssea (osteocondutores).

Dentre os diversos biomateriais existem ainda os metais inertes, as cerâmicas, os polímeros <sup>1</sup>, as matrizes dentinárias <sup>2</sup> e os cimentos de ionômero de vidro<sup>5</sup>.

Os biomateriais cerâmicos podem ser divididos em cerâmicas fosfato de cálcio, como por exemplo, a hidroxiapatita (HA), o tricálcio-fosfato (TCF) e a cerâmica fosfato de cálcio bifásica (CFCB), materiais fosfato de cálcio obtidos de estruturas naturais como a HA coralina e a HA bovina e materiais à base de cerâmicas de vidro, que também são compostos por fosfato de cálcio, mas apresentam a sílica em sua composição<sup>6</sup>.

A CFCB vem sendo utilizada rotineiramente como substituto ósseo e apresenta perspectivas promissoras no reparo e regeneração óssea em Implantodontia. Ela é composta pela HA e  $\beta$ -tricálcio-fosfato ( $\beta$ -TCF) em diferentes concentrações <sup>4</sup>.

A formação óssea *in vivo* é resultado de um complexo processo que pode ser

influenciado pelo material implantado, por parâmetros hospedeiro-dependente e também pelas células doadoras. Além disso, pode ser influenciada pelo tipo e forma do biomaterial, pelo tamanho dos poros e sua distribuição, pela interconectividade entre os poros e pelo comportamento de biodegradação do material <sup>7</sup>.

### **Histórico e Composição**

Em 1920, Albee relatou a primeira aplicação com sucesso do TCF para reparo de defeitos ósseos em humanos <sup>8</sup>. Mais tarde, após vários estudos envolvendo experimentos cirúrgicos de defeitos ósseos e periodontais com o TCF <sup>9</sup>, e do uso da HA para preenchimento alveolar após exodontias <sup>10, 11</sup>, a HA sintética e o  $\beta$ -TCF se tornaram materiais substitutos ósseos bem aceitos para aplicações dentais e médicas.

O constante desenvolvimento das cerâmicas fosfato de cálcio e outros biomateriais tem por objetivo melhorar o processo de reabsorção desses materiais e a sua substituição por um novo osso.

Os biomateriais sintéticos cerâmicos mais utilizados são as cerâmicas fosfato de cálcio e, dentro desta categoria, estão a HA, os  $\alpha$  e  $\beta$  TCF e a CFCB. Esses materiais diferem entre si na composição, propriedades físicas e químicas, e isso deve ser levado em consideração ao se utilizar esses materiais para um crescimento ósseo mais eficiente <sup>12</sup>.

Le Geros <sup>8</sup> iniciou nos Estados Unidos os primeiros estudos envolvendo as CFCB *in vitro* em 1986, e mais tarde Daculsi e colaboradores <sup>12</sup> induziram um significativo aumento no uso e comercialização desse material. Atualmente o uso da CFCB é autorizado comercialmente na Europa, Estados Unidos, Japão, Brasil e Austrália como um substituto ósseo para enxertos nas áreas de ortopedia e odontologia.

A concepção da CFCB está baseada num ótimo equilíbrio entre a fase mais estável da HA e a fase mais solúvel do TCF, e consiste numa mistura de HA =  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  e  $\beta$ -TCF =  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  <sup>3, 12, 8</sup>.

A proporção inicial da mistura identificada por Le Geros era de 20% de HA e 80% de  $\beta$ -TCF, e seus estudos demonstravam que a bioatividade desta cerâmica estaria ligada às proporções de cada componente na mistura <sup>12, 8</sup>.

A CFCB é obtida quando uma apatita deficiente em cálcio (sintética ou biológica) é sintetizada em temperaturas acima de 700° C. A extensão da deficiência do cálcio depende do método de preparação (por precipitação, hidrólise ou mistura mecânica), e da reação pH e temperatura da preparação da apatita. A deficiência do cálcio determina a proporção de HA e  $\beta$ -TCF na mistura que formará a CFCB <sup>12</sup>. De acordo com o mesmo autor, a proporção de HA e  $\beta$ -TCF na CFCB determina a reatividade da cerâmica. Quanto menor a proporção, maior a reatividade. Além desse fator, o tamanho da partícula e as macro e microporosidades são fatores de reatividade nas CFCB, e a temperatura de síntese e outras condições podem afetar essa propriedade.

Uma das características mais importantes das CFCB é a capacidade de formação de uma interface direta e efetiva com o osso receptor <sup>12</sup>. Essa interface efetiva é creditada a uma seqüência de eventos, como reações celulares e formação de carbonato de hidroxiapatita pelo processo de dissolução e precipitação, que será mais bem detalhado nas propriedades físico-químicas. Essa característica é chamada de bioatividade <sup>8</sup>.

Há no mercado várias marcas comerciais disponíveis das CFCB, como BCP<sup>®</sup>, MBCP<sup>®</sup>, Triosite<sup>®</sup>, Hatric<sup>®</sup>, Biceram<sup>®</sup>, Biosel<sup>®</sup>, Boneceramic<sup>®</sup> e outros. Sua formulação pode ser encontrada em blocos, grânulos e como material injetável com um polímero carreador <sup>12</sup>.

A CFCB da marca comercial Straumann Bone Ceramic<sup>®</sup> (Basiléia, Suíça), consiste em um composto de 60% de HA (100% cristalina) e 40 % de  $\beta$ -TCF; sintetizados a uma temperatura de 1100° a 1500° C. Além disso, o Straumann Bone Ceramic<sup>®</sup> tem 90% de porosidade, com interconexões entre os poros de 100 a 500 microns de diâmetro <sup>13, 14, 15</sup>. Sua formulação é em grânulos. Este material é um substituto ósseo totalmente sintético, com médio grau de pureza e seus grânulos têm entre 400 e 700 $\mu$ m ou 500 a 1000 $\mu$ m <sup>14, 15</sup>.

A aplicação deste material deve ser feita misturando os grânulos a uma solução de cloreto de sódio estéril ou osso autógeno. Deve-se evitar comprimir ou esmagar os grânulos e ao preencher um defeito ósseo, deve-se obter o máximo de contato com o osso vital vascularizado <sup>13</sup>.

### **Propriedades Físico-químicas**

A HA ou apatita óssea mineral contém carbonato não apatítico e grupos fosfato, que são fisicamente e estruturalmente instáveis e muito reativos. Essa alta reatividade gera características importantes na formação e dissolução dos cristais nos tecidos biológicos. As apatitas biológicas contêm traços de vários elementos de origem intrínseca, como o fluoreto, que está presente na apatita dental e confere ao esmalte baixa dissolução, e outros traços de elementos de origem extrínseca, como minerais ingeridos na água que ficam presentes nos fluidos extracelulares e podem interferir na qualidade óssea. Os biomateriais à base de HA têm sido um dos materiais mais usados para substituição óssea <sup>16</sup>.

Os cristais TCF existem sob as fases  $\beta$  e  $\alpha$ , dependendo da temperatura de sinterização e umidade e, apesar da semelhante composição química, e de ambas as formas apresentarem dissolução e reabsorção celular <sup>17</sup>, suas diferentes características cristalográficas conferem diferentes características de reabsorção <sup>16</sup>. Os  $\alpha$ -TCF são mais solúveis do que os  $\beta$ -TCF e são obtidos após o aquecimento do  $\beta$ -TCF acima de 1170° C <sup>16</sup>. Já o  $\beta$ -TCF é mais estável e menos solúvel <sup>17</sup>.

As HA e os TCF são os únicos sais de cálcio fosfato totalmente estáveis acima de 1000° C. A fase mais estável das HA é acima de 1000° C e para o TCF acima de 1125° C <sup>16</sup>.

As CFCB são constituídas da mistura da HA com  $\beta$ -TCF. A combinação dessas duas diferentes fases de sais cálcio fosfato com diferentes solubilidades permite ao material degradação cinética para ser envolvido *in vivo* ou *in vitro* <sup>16</sup>. A extensão da degradação da CFCB está relacionada à quantidade de  $\beta$ -TCF na mistura <sup>17</sup>. Diferenças nas propriedades físico-químicas das cerâmicas cálcio fosfato influenciam no comportamento osteocondutivo e na biodegradação, ambos importantes na regeneração óssea.

### **Dissolução**

As CFCB são solúveis e se dissolvem gradualmente nos tecidos, liberando íons de cálcio e fosfato no meio biológico previamente à formação do novo osso. Essa liberação de íons eleva a saturação dos fluidos intersticiais e precipita a apatita biológica na superfície da cerâmica. Essa camada de apatita serve como substrato para os osteoblastos, promovendo um íntimo contato entre o osso e o material, e promovendo o crescimento do tecido ósseo ao longo da superfície do material.

(osteocondução) <sup>21, 3, 20</sup>. Além disso, a macroporosidade torna a colonização óssea possível no centro da cerâmica, enquanto a microporosidade promove a mineralização, a absorção de proteínas e a adesão celular <sup>21</sup>.

Após a implantação da CFCB, ocorre a formação de micro cristais com concentração de cálcio fosfato similar aos cristais de apatita óssea observados após a implantação. A abundância desses cristais está diretamente relacionada à concentração inicial de HA e  $\beta$ -TCF na mistura. O processo de reabsorção envolve a dissolução dos cristais de cálcio fosfato e a precipitação do carbonato de hidroxiapatita. Subsequentemente, o osso neoformado vai progressivamente substituindo o carbonato de hidroxiapatita formado devido à reabsorção dos grânulos <sup>12,3</sup>.

O processo de colonização celular, adesão, fagocitose, reabsorção osteoclástica, elaboração e mineralização da matriz óssea extracelular, crescimento e remodelação óssea associados à precipitação da apatita biológica durante o processo de dissolução das CFCB são contínuos e progressivos; com isso, a interface é dinâmica e está em constante evolução, sendo influenciada pelo metabolismo ósseo, fatores biomecânicos e maturação óssea <sup>12, 8</sup>.

A maioria dos sais cálcio fosfato são pouco solúveis na água e alguns são insolúveis, mas todos dissolvem em ácidos. A formação, dissolução e transformação dos sais cálcio fosfato dependem de vários fatores, como: natureza do corpo do cálcio fosfato (tamanho da partícula, características dos cristais e densidade) e natureza da solução (composição, pH e temperatura). A solubilidade dos sais cálcio fosfato diminui com o aumento da temperatura e do pH <sup>16</sup>. A dissolução das CFCB depende também da concentração de HA e  $\beta$ -TCF na mistura. Quanto maior a concentração de  $\beta$ -TCF maior a solubilidade <sup>12, 8</sup>.

As CFCB suportam a formação óssea enquanto dissolvem e degradam parcialmente no meio. Essas propriedades estão relacionadas às características físicas e químicas e à microestrutura, e dependem da temperatura de sinterização que é crucial para obter substitutos ósseos com propriedades ósseas reproduzíveis. A temperatura de sinterização modifica a microestrutura, a área de superfície específica e as características de dissolução das CFCB. Grande microporosidade e cristais pequenos são essenciais para adesão, proliferação e diferenciação de células osteogênicas que irão produzir matriz óssea extracelular. Logo, altas temperaturas de sinterização diminuem a área de superfície e a dissolução <sup>3,17</sup>.

Fellah e cols <sup>3</sup> relatam que os grânulos da CFCB sinterizados à 1200° C (temperatura mais alta das três comparadas em seu estudo) apresentavam baixa microporosidade, menor área de superfície, pouca dissolução, pouca absorção de proteínas e baixa colonização celular, fatores que podem explicar bem a ausência de formação óssea neste grupo estudado.

### **Porosidade**

A porosidade ideal da CFCB é a que mais se aproxime da porosidade do osso. Quanto maior a macro e microporosidade, maior a solubilidade. A microporosidade representada por poros menores que 10µm permite que haja uma circulação de fluidos intersticiais; já a macroporosidade representada por poros maiores que 100µm promove um arcabouço para a colonização de células ósseas. O tamanho e o percentual de poros nas CFCB irão interferir nas suas propriedades mecânicas <sup>8</sup>.

A temperatura de sinterização está diretamente relacionada à microestrutura e à área de superfície específica das CFCB. Fellah e cols <sup>3</sup> em seu estudo compararam grânulos de CFCB compostos de 60% HA e 40% β-TCF, sinterizados em diferentes temperaturas (1050° C, 1125° C e 1200° C). Os grânulos sinterizados à 1050° C apresentavam uma superfície grosseira com pequenos cristais de aproximadamente 0,5 µm e numerosos microporos de tamanho máximo de 0,36 µm indicando que a síntese estava incompleta. Aumentando a temperatura de sinterização para 1125° C, os cristais e os microporos aumentaram de tamanho para 0,45 µm, enquanto diminuíram em número. Após a sinterização à 1200° C, os grãos cresceram muito em tamanho, mas a superfície ficou densa e com poucos poros residuais. Nesse estudo todas as cerâmicas eram compostas de HA e β-TCF. A porosidade nos grupos sinterizados à 1050° C e 1125° C era similar, e de aproximadamente 65%. Para os grânulos sinterizados à 1200° C a porosidade diminuiu para 54%. A diminuição da área de superfície específica resultada do decréscimo no número de microporos e no aumento do tamanho dos grãos ocorreu devido ao aumento da temperatura de sinterização. Os grânulos sinterizados à 1050° C são os mais microporosos e reabsorvíveis, os sinterizados à 1125° C são pouco reabsorvíveis e os sinterizados à 1200° C por quase não serem porosos, são praticamente não reabsorvíveis. Logo, altas temperaturas de sinterização diminuem a área de superfície e conseqüentemente a dissolução <sup>3</sup>.

A temperatura de sinterização pode influenciar também as propriedades osteoindutivas das cerâmicas <sup>22</sup>. Em seu estudo, Yuan e cols. <sup>22</sup> constataram que uma alta temperatura de sinterização reduz o potencial osteoindutivo da CFCB. A análise com animais (cães, coelhos, camundongos e ratos) comparou a formação ectópica induzida pelos materiais HA e CFCB sinterizadas em diferentes temperaturas e implantados em bolsas intramusculares e subcutâneas. A HA utilizada foi sinterizada à temperatura de 1150° C por 3 horas, e tinha macroporosidade de 52% e microporos em maior tamanho e menor número comparado ao outro material, já a CFCB sinterizada à temperatura de 1100° C por 8 horas, possuía macroporosidade de 40% e os microporos apresentavam alta densidade e menor tamanho, comparado à HA. Neste estudo, os implantes de HA induziram a formação óssea ectópica apenas nos cães, já a CFCB induziu a formação óssea ectópica nos cães, coelhos e camundongos. Pôde-se concluir, segundo o autor, que a CFCB sinterizada a uma temperatura relativamente baixa é mais osteoindutiva que a HA sinterizada a uma alta temperatura. Essa diferença da temperatura interfere diretamente na microporosidade e na taxa de dissolução do material; uma menor temperatura de sinterização resulta em mais microporos, aumentando a área de superfície e concentrando mais proteínas, como proteínas ósseas morfogenéticas (POM) no interior da cerâmica, que induzem a uma maior formação óssea. Outro fator é a alta dissolução do cálcio e do fósforo presentes na CFCB que podem promover a mineralização da matriz óssea em concentrações específicas <sup>23, 22</sup>.

Uma das principais características das cerâmicas é a microarquitetura dos poros <sup>24</sup>. Quando interconectados, para formar uma rede, os canais que interligam os poros favorecem a penetração vascular e celular, assim assegurando o crescimento ósseo dentro dos poros. Ao se avaliar as propriedades das cerâmicas, deve ser analisado o crescimento ósseo dentro dos poros, mas igualmente importante são as interconexões entre os poros, que podem alterar significativamente as características das cerâmicas. O diâmetro, o tamanho e a tortuosidade desses canais de interconexão podem alterar a capacidade de penetração de fluidos e células, limitando a osteocondução até mais do que o tamanho dos poros, além de influenciar na degradação dos íons cálcio fósforo. Em seu estudo, Lecomte e cols <sup>24</sup> testaram um método para quantificar o grau das interconexões dos poros na CFCB. Foram feitas análises para determinar a permeabilidade, a sinuosidade, o diâmetro dos poros, a porcentagem de porosidade total e o diâmetro das interconexões. Nesse estudo foram utilizadas CFCB divididas em grupos A e B, que se diferenciavam apenas nas partículas utilizadas para provocar a

porosidade na cerâmica; sendo que no A foi utilizado o pó de sacarose calibrado e no B foi utilizado o pó de naftalina calibrado. Ambas as cerâmicas apresentavam a proporção de 50% HA e 50%  $\beta$ -TCF e foram sinterizadas a 1050° C por 4 horas. Os resultados mostraram que a permeabilidade foi 12 vezes maior na cerâmica B do que na A. Foi constatado que a cerâmica com maior permeabilidade, a B, demonstrou um menor fator de sinuosidade. Com relação à porosidade total, esta foi de 54% para o grupo A, e 60% para o grupo B. A mesio e microporosidade dos grânulos e o maior diâmetro dos canais de interconexão do grupo B promoveram maior penetração de fluidos para o interior do material. Com os resultados desse estudo, pode-se concluir quão importantes são os parâmetros que devem ser levados em conta para se aumentar a permeabilidade e a capacidade de difusão de fluidos e células em uma cerâmica. É importante se avaliar a sinuosidade e o diâmetro dos canais de interconexão entre os poros, além disso, o diâmetro dos poros. Todos esses fatores interferem na dissolução da matriz e no crescimento ósseo.

Apesar do mecanismo biológico da osteoindução pelas cerâmicas ser ainda desconhecido, alguns autores demonstram que a presença de microporos na superfície das cerâmicas seja um pré-requisito para a formação ectópica. A microporosidade pode influenciar na coesão do material e na dissolução dos grãos das margens. A dissolução desses grãos nos fluidos biológicos poderia guiar a liberação de micropartículas nas proximidades das cerâmicas; essas partículas iriam então ativar macrófagos, células gigantes e linfócitos, liberando citocinas específicas que iriam ativar células indiferenciadas circulantes a diferenciarem-se em osteoblastos produzindo tecido ósseo

25

Guehenec e cols <sup>21</sup> em seu estudo compararam a formação óssea da CFCB macroporosa em diferentes sítios (fêmur, tibia e calvária) em ratos e coelhos. A CFCB utilizada era composta de 60% HA e 40%  $\beta$ -TCF, com 50% de macroporosidade e poros de 300 a 600  $\mu$ m; e 30% de microporosidade e poros de 1 a 10  $\mu$ m. Foi utilizado o modelo de defeito crítico com implantação do material por 21 dias e defeitos sem preenchimento nos grupos controle; e posterior sacrifício dos animais e avaliação histológica dos defeitos. Foram realizadas marcações ósseas com injeções de Tetraciclina nos animais. Essa técnica torna possível a determinação da taxa de crescimento ósseo sob microscopia de fluorescência. Segundo os resultados, a taxa de crescimento ósseo nos ratos foi maior do que nos coelhos, e o autor atribui esta diferença ao metabolismo mais rápido dos ratos. No grupo dos ratos e coelhos o

crescimento ósseo foi mais rápido e em maior quantidade no fêmur e tibia do que na calvária. Os autores concluíram que nas regiões em que o osso é mais córtico-esponjoso a formação foi maior do que nas regiões de osso medular, pois nas áreas medulares há menor estimulação mecânica, que favorece a formação óssea devido à uma maior atividade muscular, elevando a vascularização, proliferação e atividade de osteoblastos locais <sup>21</sup>. Além disso, nas regiões com abundância de medula óssea há menor quantidade de células osteogênicas.

### **Reações Celulares**

As CFCB geram respostas das células ósseas *in vivo* e *in vitro* que são similares às geradas pelo osso. Essas cerâmicas permitem a ligação celular, proliferação e expressão de proteínas <sup>12</sup>. Isso se deve porque a sua semelhança de composição com o osso mineral induz uma resposta biológica similar à gerada durante a remodelação óssea. Essa renovação consiste na reabsorção de todo material e a formação de novo osso e durante este evento, os produtos de degradação das cerâmicas fosfato de cálcio (íons cálcio e fosfato) são naturalmente metabolizados e não induzem níveis anormais de cálcio e fosfato na urina, órgãos ou sangue <sup>16</sup>.

O primeiro evento biológico após a implantação da CFCB é a difusão de fluidos biológicos, seguida pela colonização por células como macrófagos, depois por células mesenquimais, osteoblastos e osteoclastos para o interior dos macroporos dos grânulos <sup>12, 16</sup>. Após alguns meses ocorre a remodelação óssea, com reabsorção do biomaterial por osteoclastos e substituição por novo osso <sup>12</sup>.

A velocidade de reabsorção da CFCB está entre a da HA pura, que é pouco solúvel, e do  $\beta$ -TCF puro, que é bem reabsorvido; além disso, está ligada à microporosidade dos grânulos, quanto mais microporos, mais reabsorvíveis. Pode-se concluir que o método de preparação das biocerâmicas é um aspecto crítico que influencia até nas propriedades osteogênicas do material. Esta diferença de osteogenicidade pode estar relacionada à propriedade de dissolução nos fluidos corporais. A CFCB é osteocondutiva e suporta aposição óssea e crescimento, mas é lentamente degradada pelo corpo <sup>3</sup>.

As cerâmicas cálcio fosfato podem ser degradadas por mecanismos como desintegração física do material, dissolução química e reabsorção por atividade celular.

Idealmente, as cerâmicas se degradam devido à dissolução controlada com intervenção celular, com os produtos da degradação exercendo um efeito osteopromotor. O princípio da reabsorção celular é baseado na fragmentação do material ou dissolução. Pequenos fragmentos da cerâmica podem ser fagocitados, enquanto células gigantes multinucleadas atacam fragmentos maiores para iniciar uma dissolução extracelular em um microambiente altamente ácido gerado por produtos de secreção. As células envolvidas são macrófagos e osteoclastos<sup>17</sup>.

Kauschke e cols<sup>14</sup> relatam em seu estudo uma análise *in vitro* onde foi avaliada a reação de fibroblastos aos materiais NanoBone® e Boneceramic®. O NanoBone®, segundo o fabricante ARTOSS GmbH, é um substituto ósseo, osteoindutivo e biodegradável, totalmente sintético, granular, altamente poroso composto de nanocristais de HA não sinterizada (76%) e gel de sílica (SiO<sub>2</sub>) (24%). O outro material, Straumann Boneceramic® é uma CFCB utilizada como substituto ósseo, totalmente sintético, composto de 60% de HA e 40 % de β-TCF. Neste estudo foram utilizados meios de cultura com fibroblastos humanos (HFIB; oligene) incubados com e sem o material NanoBone® por 24 dias, e fibroblastos de tecido conjuntivo de ratos (L – 929; DSMZ GmbH Germany) incubados com e sem o material Boneceramic® por 28 dias. Foi avaliada a cada três dias a viabilidade e a proliferação celular. Nos quatro grupos estudados os resultados demonstraram que apesar dos fibroblastos de ratos e humanos se diferenciarem na morfologia, ambos proliferaram e cresceram na superfície dos materiais adicionados às culturas e não afetaram a viabilidade das células fibroblásticas. No entanto, a atividade metabólica das células cultivadas com os biomateriais foi reduzida quando comparada ao grupo controle, do 1º ao 4º dia. Porém, segundo o autor, não se pode dizer que os materiais não causaram um efeito tóxico sobre os fibroblastos, pois após a 1ª semana de cultura, a viabilidade das células foi tão alta nos quatro grupos, sendo maior do que 90% até o final do experimento. De acordo com a metodologia utilizada neste estudo, existe uma dificuldade em comparar os grupos testados, visto que foram utilizados fibroblastos de origem diferente, mesmo que os processos de interconexão celular formados tenham sido semelhantes em ambos os grupos. Em estudos futuros, o ideal é que sejam usados fibroblastos humanos de origem do processo alveolar em ambos os grupos, para um melhor entendimento das reações entre as células humanas e os materiais sintéticos substitutos ósseos e para ser possível comparar melhor os grupos.

## Propriedades Osteocondutoras X Osteoindutoras

Diversos tipos de materiais são utilizados para enxerto, porém como os sintéticos têm baixa capacidade osteogênica, sua aplicação clínica é limitada. Algumas modificações físico-químicas nos materiais poderiam tornar esses materiais osteoindutivos e induzir a formação óssea em tecidos não ósseos<sup>23, 22</sup>. Os mesmos autores, em dois trabalhos<sup>23, 22</sup>, relatam estudos onde amostras da CFCB foram implantadas em sítios ectópicos, como na região subcutânea e em bolsas intramusculares, e foi observada a formação óssea.

A formação de um tecido osteóide em sítios não ósseos sugere que os grânulos da CFCB são capazes de apreender células mesenquimais e induzir a sua diferenciação em células de linhagem óssea<sup>12</sup>; porém, apesar dessa capacidade ser bem reconhecida do osso autógeno, ela é motivo de controvérsia com relação aos biomateriais<sup>3</sup>. Em seu estudo, Fellah e cols<sup>3</sup> não observaram a formação óssea ectópica após a implantação intramuscular de cilindros de CFDB. Da mesma forma, Fellah e cols<sup>25</sup> avaliaram em seu estudo a resposta inflamatória à CFCB na proporção de 50% HA e 50%  $\beta$ -TCF, sinterizada a 1200° C por 5 horas, divididas em três grupos com tamanho de partículas <20  $\mu$ m, entre 40-80  $\mu$ m e entre 80-200  $\mu$ m implantadas em bolsas intramusculares de ratos. Foi observada nos três grupos a formação de uma cápsula de tecido fibroso envolvendo as partículas, com indução de resposta inflamatória superior no grupo <20  $\mu$ m e moderada nos grupos entre 40-80  $\mu$ m e 80-200  $\mu$ m. Também não foi observada formação óssea ectópica.

No entanto, Yuan e cols<sup>23</sup> em seu estudo relatam que as CFCB implantadas em sítios ectópicos poderiam absorver proteínas dos fluidos teciduais circundantes, como fatores de crescimento, POM, que induziriam células indiferenciadas a se diferenciarem em células de linhagem osteogênica. A adição de micro e macroporos na superfície das cerâmicas poderia torná-la osteoindutiva<sup>23</sup>. Além disso, o cálcio e o fósforo presentes nas cerâmicas fosfato de cálcio poderiam promover a mineralização da matriz óssea em determinadas concentrações<sup>23, 22</sup>.

Alguns autores<sup>8</sup> são enfáticos ao dizer que as cerâmicas fosfato de cálcio são osteocondutoras, mas não são osteoindutoras. A osteoindução, que alguns autores atribuem à cerâmica implantada em sítios não ósseos, se deve a uma consequência da geometria porosa dos grânulos, que permite a concentração de POM endógenas, que

possuem capacidade osteoindutiva em quantidade suficiente para induzir a diferenciação celular, e não a uma propriedade osteoindutiva da cerâmica<sup>8</sup>.

A formação óssea em locais ectópicos não ocorre com a mesma frequência em todas as espécies animais<sup>22</sup>, em animais de maior tamanho ela ocorre mais do que em animais de menor porte. Segundo o mesmo autor, mais que a espécie do animal, o que mais influencia na formação óssea induzida por materiais em tecidos moles é o tipo do material utilizado. Em estudo realizado por Yuan e colaboradores<sup>22</sup> foi comparada a formação óssea ectópica induzida pelos materiais HA e CFCB sinterizadas em diferentes temperaturas e foi constatado que uma alta temperatura de sinterização reduz o potencial osteoindutivo da CFCB, pois há uma redução no número de microporos e na área de superfície, concentrando menos proteínas no interior da cerâmica, induzindo a uma menor formação óssea. Segundo os mesmos autores, não está clara a razão pela qual a espécie do animal interfere na osteoindução com um mesmo material. Pode estar relacionada aos níveis de proteínas ósseas e células indiferenciadas presentes nos fluidos corporais, variáveis entre espécies ou por fatores sistêmicos. Porém não há estudos aprofundados sobre essas diferenças entre espécies.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A cada dia são desenvolvidos e aprovados novos tipos de biomateriais, nos permitindo selecionar o melhor material para ser utilizado. No entanto, a utilização de substitutos ósseos deve-se adequar às limitações do local receptor e ao tipo de procedimento que será realizado, respeitando as propriedades específicas e riscos de cada material.

Após avaliação dos estudos pertinentes na literatura, concluiu-se que vários fatores podem auxiliar na definição de um substituto ósseo adequado, como a integridade mecânica e o tempo de degradação do material, conjugado com a simultânea velocidade de substituição pelo osso neoformado. As características de formação, dissolução e reabsorção dos sais cálcio fosfato são influenciadas por fatores como tamanho dos grânulos, porosidade, características dos cristais, pH, temperatura de sinterização e sítio de implantação do material, devendo estes serem conhecidos e compreendidos pelos profissionais para sua utilização. Apesar dos diversos estudos e

desenvolvimento de modernos biomateriais, ainda não há um substituto ideal para o osso autógeno.

## **ABSTRACT**

There has been a continuous search for the development of new materials for medical use, aiming to replace damaged or lost living tissues. These materials and their chemical, physical and biological properties must be biocompatible. Nowadays, calcium phosphate ceramics have received especial attention due to their bioactivity and biocompatibility. Their chemical composition has similarities to the natural bone and they are nontoxic, reabsorbable and non inflammatory. They cause no immunological reaction or irritation and have excellent osteoconductive ability. The most important factors to evaluate the predictability of achieving bone repair are the osteoconductivity and absorbability behavior of the biomaterial, its histocompatibility, bioactivity, and remodeling period. Through a literary revision, this study evaluated the formation and composition of the biphasic calcium phosphate ceramics, the mechanisms of dissolvability, biodegradation and reabsorbability, the porosity and micro architecture of the poros. The influence of the sintering temperature and how these factors interfere in the physical and chemical properties of the biphasic calcium phosphate ceramic and in the cellular reactions caused by this material were also evaluated.

**Key words:** Dental implants, Biomaterials, Biphasic calcium phosphate ceramics.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 1) Leonel ECF, Porciúncula HF, Sobrinho JÁ, Ramalho LTO, Mangilli PD. Ação de diversos materiais de preenchimento durante a neoformação óssea. *Rev Bras Odontol* 2003; 60(3):154-56.
- 2) Okamoto T, Trento CL. Implante homogêneo de matriz dentinária desmineralizada conservada em glicerina a 98% em alvéolo dental. Estudo microscópico em ratos. *Revista Ciências Odontológicas* 2002; 5(5):33-41.
- 3) Fellah BH, Gauthier O, Weiss P, Chappard D, Layrolle P. Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. *Biomaterials* 2008; 29:1177-88.
- 4) Manjubala I, Sivakumar M, Sureshkumar RV, Sastry TP. Bioactivity and osseointegration study of calcium phosphate ceramic of different chemical composition. *J Biomed Mater Res* 2002; 63:200-08.
- 5) Balabanian, C.A.C.A et al. Glass-ionomer cement and bone repair in prolonged immobilization-induced stress. *RPG – Revista de pós graduação* 2003; 10(01):07-12.
- 6) Santos, F.A., et al. Utilização do vidro bioativo na regeneração óssea guiada: revisão de literatura. *RBP – Revista Brasileira de Implantodontia & Prótese sobre Implantes* 2003; 10(40):320-26.
- 7) Jafarian M, Eslaminejad MB, Khojasteh A, Abbas FM, Dehghan MM, Hassanizadeh R, et al. Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: a comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 105:e14-e24.
- 8) Legeros RZ, Lin S, Rohanizadeh R, Mijares D, Legeros JP. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *J Mater Sci Mater Méd* 2003; 14:201-09.
- 9) Wiltfang J, Merten HA, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Kloss FR, Rupprecht S, et al. Degradation characteristics of  $\alpha$  and  $\beta$  Tri-calcium-phosphate (TCP) in pigs. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 2002; 63:115-21.
- 10) Zenóbio EG, Marcantonio RAC, Marcantonio Junior E, Ferreira BA, Okamoto T. Avaliação do comportamento biológico de dois materiais sintéticos, à base de fosfato de cálcio (Bioapatita® e Osteogen®) após a

implantação em alvéolos de cães. Rev Odontol UNESP 1998; 27(1):73-85.

- 11) Kwon HJ, DEEB ME, Morstad T, Waite D. Alveolar ridge maintenance with hydroxiapatite ceramic cones in humans. J Oral Maxillofac Surg 1986; 44:503-08.
- 12) Daculsi G, Laboux O, Malard O, Weiss P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. J Mater Sci Mater Méd 2003; 14:195-200.
- 13) Dietze S, Bayerlein T, Proff P, Hoffmann A, Gedrange T. The ultrastructure and processing properties of Straumann Bone Ceramic® and NanoBone®. Folia Morphol (Warsz) 2006; 65(1):63-65.
- 14) Kauschke E, Rumpel E, Fanghanel J, Bayerlein T, Gedrange T, Proff P. The in vitro viability and growth of fibroblasts cultured in the presence of different bone grafting materials (NanoBone® and Straumann Bone Ceramic®). Folia Morphol (Warsz) 2006; 65(1):37-42.
- 15) Straumann Bone Ceramic®: cerâmica fosfato de cálcio Bifásica [(60% de HA e 40 % de (β-TCP)]: grânulos. Basileia, Suíça: Straumann.2008. Especificações do fabricante.
- 16) Barrère F, Blitterswijk CA, Groot K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. Int J Nanomedicine 2006; 1(3):317-332.
- 17) Bodde EWH, Wolke JGC, Kowalski RSZ, Jansen JÁ. Bone regeneration of porous β-tricalcium phosphate (Conduit™ TCP) and of biphasic calcium phosphate ceramic (Biosel®) in trabecular defects in sheep. J Biomed Mater Res A 2007; 82A:711-22.
- 18) Fariña NM, Guzón FM, Pena ML, Cantalapiedra AG. In vivo behavior of two different biphasic ceramic implanted in mandibular bone of dogs. J Mater Sci Mater Méd 2008; 19:1565-73.
- 19) Develioglu H, Saraydin SU, Bolayir G, Dupoirieux L. Assessment of the effect of a biphasic ceramic on bone response in a rat calvarial defect model. J Biomed Mater Res A 2006; 77A:627-31.
- 20) Develioglu H, Saraydin SU, Dupoirieux L, Sahin ZD. Histological findings of long-term healin of the experimental defects by application of a synthetic biphasic ceramic in rats. J Biomed Mater Res A 2007; 80A:505-08.

- 21) Guehennecc LL, Goyenvalle E, Aguado E, Houchmand-Cuny M, Enkel B, Pilet P, et al. Small-animal models for testing macroporous ceramic bone substitutes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005; 72B: 69-78.
- 22) Yuan H, Blitterswijk CAV, Groot K, Bruijn JD. Cross-species comparison of ectopic bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hidroxiapatita HA scaffolds. *Tissue Eng* 2006; 12(6):1607-1615.
- 23) Yuan H, Blitterswijk CA, Groot K, Bruijn JD. A comparison of bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxiapatite HA implanted in muscle and bone of dogs at different time periods. *J Biomed Mater Res A* 2006; 78A:139-147.
- 24) Lecomte A, Gautier H, Bouler JM, Gouyette A, Pegon Y, Daculsi G, et al. Biphasic valcium phosphate: a comparative study of interconnected porosity in two ceramics. *J Biomed Mater Res B* 2008; 84B:1-6.
- 25) Fellah BH, Josselin N, Chappard D, Weiss P, Layrolle P. Inflammatory reaction in rats muscle after implantation of biphasic calcium phosphate micro particles. *J Mater Sci Mater Méd* 2007; 18:287-294.

## 7. Artigo II

### **Cerâmica fosfato de cálcio bifásica: avaliação histomorfométrica após implantação em defeitos ósseos cirúrgicos alveolares de ratos.**

Mariana Faria de Pinho, Elton Gonçalves Zenóbio, Juliana Maia da Silveira, Paulo Eduardo Alencar de Souza, Aécio Abner Campos Pinto Júnior.

#### **RESUMO**

Este estudo avaliou, baseado na análise histomorfométrica, a cerâmica fosfato de cálcio bifásica em relação ao tecido ósseo, após o preenchimento de defeitos ósseos cirúrgicos alveolares de ratos. Foram utilizados neste estudo 12 ratos machos Wistar e a amostra foi composta de 24 defeitos ósseos cirúrgicos alveolares, sendo 12 para o grupo controle e 12 para o grupo experimental, em um modelo de boca dividida. Os defeitos ósseos cirúrgicos alveolares do grupo experimental foram preenchidos com a cerâmica fosfato de cálcio bifásica e os do grupo controle foram preenchidos naturalmente por coágulo. Após os períodos de 7, 15 e 60 dias foram realizados os sacrifícios dos animais e o protocolo de rotina histológica. Segundo os resultados, o material demonstrou ser biocompatível e osseointegrável, apesar de que no período final experimental foi observada pouca redução em seu volume. De maior importância, este estudo concluiu que a presença da cerâmica fosfato de cálcio bifásica não aumentou a densidade óssea e causou um atraso no tempo de reparo e formação óssea no grupo experimental.

**Palavras Chave:** Implantes dentários. Biomateriais. Cerâmica fosfato de cálcio bifásica

## INTRODUÇÃO

A reposição da perda dental objetiva a otimização da reabilitação bucal estética e funcional. Mudanças no planejamento, nas técnicas e nos biomateriais aplicados são uma constante na odontologia atual.

A cada dia são desenvolvidos e aprovados diversos novos tipos de biomateriais. No entanto, a utilização de substitutos ósseos deve-se adequar às limitações do local receptor, tipo de procedimento que será realizado, respeitando as propriedades específicas e riscos de cada material. Apesar dos estudos e do desenvolvimento atual dos biomateriais, ainda não há um substituto ideal para o osso autógeno.

O enxerto ósseo autógeno é o melhor material de preenchimento, visto seu alto potencial osteogênico <sup>1</sup>. Porém, sua utilização se torna menos viável, devido à necessidade de uma cirurgia em outra área adicional, tornando o procedimento de maior morbidade para o paciente, além da quantidade de osso ser limitada em média a 20cm<sup>3</sup> e destes serem altamente reabsorvidos e frequentemente degradados antes do total período de cicatrização ter finalizado <sup>2</sup>.

Existem inúmeras técnicas utilizadas no preenchimento de defeitos ósseos, como enxertos ósseos autógenos, alógenos e xenógenos, além dos biomateriais <sup>3</sup>.

Os biomateriais cerâmicos podem ser divididos em cerâmicas fosfato de cálcio, como por exemplo, a hidroxiapatita (HA), o tricálcio-fosfato (TCF) e a cerâmica fosfato de cálcio bifásica (CFCB), materiais fosfato de cálcio obtidos de estruturas naturais como a HA coralina e a HA bovina e materiais a base de cerâmicas de vidro <sup>4</sup>.

A aplicação das CFCB como substituto ósseo tem recebido recentemente considerável atenção, devido à sua biocompatibilidade e bioatividade <sup>5</sup>, e apresenta perspectivas promissoras no reparo e regeneração óssea em Implantodontia.

A CFCB é composta pela HA e  $\beta$ -TCF em diferentes concentrações <sup>6</sup>. Com a composição química semelhante ao osso natural <sup>7</sup>, as cerâmicas cálcio fosfato são ótimos materiais para substituição óssea, por serem não tóxicos, reabsorvíveis, não inflamatórios, não causarem reação de corpo estranho ou resposta irritativa, por terem excelente habilidade osteocondutiva, e por formarem uma interface direta e efetiva com o osso receptor. Essa interface efetiva é creditada a uma seqüência de eventos como

reações celulares e formação de carbonato de hidroxiapatita pelo processo de dissolução e precipitação <sup>8</sup>.

Após avaliação dos estudos pertinentes na literatura <sup>8, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 2, 14, 15, 16 e 17</sup>, concluiu-se que fatores específicos devem ser avaliados para se obter previsibilidade no processo de reparo ósseo e podem auxiliar no momento de definir um substituto ósseo ideal, como a integridade mecânica e o tempo de degradação do material, conjugado com a simultânea velocidade de substituição pelo osso neoformado, o comportamento osteocondutivo, a histocompatibilidade e bioatividade do material. Além disso, a formação, dissolução e reabsorção dos sais cálcio fosfato são influenciados por vários fatores como: tamanho dos grânulos, porosidade, características dos cristais, pH, temperatura de sinterização e sítio de implantação do material.

Estudos experimentais têm sido realizados em alvéolos dentais de ratos para avaliação da biocompatibilidade, reações celulares e formação óssea com diferentes biomateriais, previamente à realização em humanos <sup>18, 19, 20, 21 e 22</sup>. Isto se deve, pois este leito receptor é uma área onde se conhece bem a sucessão dos fenômenos biológicos que compreendem o processo de reparo ósseo <sup>23 e 18</sup>.

Neste contexto avaliou-se por meio de uma análise histomorfométrica a formação óssea após implantação de grânulos da CFCB em defeitos ósseos cirúrgicos alveolares de ratos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Animais

Neste estudo foram utilizados 12 Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, de quatro meses de idade, pesando entre 250 e 400 gramas. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado com controle de ciclo de luz, com água filtrada e ração para roedores (Labina – Purina) à vontade, até o dia da realização do experimento cirúrgico, no Biotério do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG sob o protocolo número 233/08.

### 2. Procedimentos cirúrgicos

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento do ICB – UFMG. Os animais foram submetidos à anestesia geral, com injeção intramuscular de uma combinação de Cetamina e Xilazina. (1:1, 0,1 ml/100g de peso corporal, IM). Primeiramente foi aplicado Cloridrato de Xilazina 2,3% (Xilazin - Syntec), na proporção de 0,1ml/100g de peso corporal, cujos efeitos são analgésico, miorelaxante e sedativo. Imediatamente após foi injetado Cloridrato de Cetamina 10% (Cetamin - Syntec), na proporção de 0,1ml/100g de peso corporal, cujo efeito é anestésico.

Os animais foram colocados em uma mesa cirúrgica desenvolvida especialmente para cirurgias em ratos. A técnica cirúrgica consistiu do levantamento de um retalho mucoperióstico nos lados vestibular e palatino do rebordo alveolar, adjacentes aos primeiros molares superiores, com os objetivos de melhorar a visibilidade do campo operatório e garantir o fechamento total da ferida cirúrgica, proporcionando assim uma cicatrização por primeira intenção. (Fig. 1A)

As exodontias dos primeiros molares superiores foram realizadas por via alveolar, com técnica atraumática, evitando-se a fratura da tábua óssea vestibular. Os alvéolos correspondentes às raízes foram unidos (usando-se uma broca esférica número

1, sob irrigação com soro fisiológico), a fim de criar uma loja cirúrgica que pudesse acomodar o biomaterial. Os defeitos ósseos cirúrgicos alveolares dos primeiros molares superiores direitos foram os grupos controles, e os esquerdos, os testes. (Fig. 1B - 1F)

Os defeitos ósseos cirúrgicos alveolares do grupo teste foram preenchidos com Straumann Bone Ceramic<sup>®</sup> (Basiléia, Suíça), que consiste em um composto de 60% de HA (100% cristalina) e 40 % de  $\beta$ -TCF sintetizados à uma temperatura de 1100° a 1500° C. Este material é um substituto ósseo totalmente sintético, com médio grau de pureza e seus grânulos têm entre 500 a 1000  $\mu$ m. Além disso, tem 90% de porosidade, com interconexões entre os poros de 100 a 500 microns de diâmetro e sua formulação é em grânulos<sup>24 e 25</sup>. Os defeitos ósseos foram preenchidos até a margem da crista óssea e a ferida cuidadosamente suturada com fio de nylon 5-0 BioSut (Belo Horizonte, Brasil) por meio de sutura com pontos isolados. Os defeitos ósseos do grupo controle foram preenchidos naturalmente por coágulo sanguíneo e suturados de forma semelhante ao lado teste. (Fig. 1G e 1H)

Após serem operados, os animais receberam dieta pastosa constituída de Mucilon<sup>®</sup> (Nestlé, Brasil), que vem a ser uma farinha de milho pré-cozida, e ração moída, diluídos em água, até a data do sacrifício.

### **3. Análise histomorfométrica**

Os animais foram sacrificados através de decapitação, sob anestesia, como descrito anteriormente, nos dias 7, 15 e 60 após as extrações, para a análise histomorfométrica.

As maxilas dos animais foram dissecadas e fixadas em formaldeído a 10% tamponado por 48 horas à temperatura ambiente. Após fixação, as peças foram desmineralizadas em solução aquosa de EDTA a 10%, pH 7,3. As peças foram avaliadas semanalmente até apresentarem consistência macia, indicando correta desmineralização óssea. Em seguida, as maxilas foram desidratadas gradativamente em soluções de concentração crescente de etanol, diafanizadas em xilol e embebidas em parafina (Histosec<sup>®</sup> pastilhas, Merck). Foram obtidos cortes seriados de 4  $\mu$ m de espessura, em micrótomo, e estes estendidos sobre lâminas de vidro pré-tratadas com

silano 2% em acetona (3-aminopropyltriethoxy-silane, Sigma). Os cortes foram realizados com orientação no plano sagital e corados com Hematoxilina-eosina para análise histológica.

Foram realizadas capturas de imagens dos defeitos ósseos cirúrgicos alveolares utilizando câmera digital acoplada a microscópio óptico Olympus BX41 com objetiva de 4x. As imagens obtidas foram avaliadas morfometricamente utilizando-se software Image Tool 3.0. A análise da região, definida como campo de interesse para avaliação, refere-se à área de formação óssea compreendida entre quatro pontos: 1- cortical basal, referente ao seio maxilar, 2- parede distal referente à cortical adjacente a raiz do segundo molar (como direção para o centro do alvéolo cirúrgico, 3- parede mesial e 4 - limite de formação óssea máxima em altura). A área de interesse de estudo foi demarcada, utilizando-se ferramenta contida no software, mensurada e sobreposta a todas as áreas de mensuração, para que não ocorressem discrepâncias quanto à área de avaliação. (Fig. 3) A mensuração foi realizada por um único examinador treinado e calibrado.

Foram avaliados em 04 campos, referente a cada área de interesse, a mensuração em porcentagem da presença de tecido ósseo neoformado, matriz de tecido não mineralizado, e no grupo teste a área correspondente aos cristais de Boneceramic remanescentes. (Fig. 4)

#### **4. Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando-se o software BioEstat 5.0, com testes paramétricos. As variáveis avaliadas foram o índice de densidade de matriz óssea e o índice de cristais Boneceramic. Foram utilizados os testes T de student com amostras pareadas e Teste de correlação Linear de Pearson.

## RESULTADOS

A análise histomorfométrica dos defeitos ósseos cirúrgicos alveolares do grupo de 7 dias, tanto no grupo experimental quanto no controle, demonstrou não haver formação de matriz óssea mineralizada neste período, portanto este grupo foi descartado das análises estatísticas. (Fig. 2)

Os percentuais de tecido ósseo mineralizado, tecido não mineralizado e cristais residuais de Bonceramic foram mensurados e comparados nos grupos experimentais e controle nos períodos 15 e 60 dias.

Comparando-se o índice de densidade de matriz óssea nos grupos 15 dias controle, 55,42% ( $\pm 14,88$ ), e 15 dias experimental, 22,09% ( $\pm 4,81$ ), os resultados demonstraram que há diferença entre os grupos estatisticamente significativa. Comparando-se o índice de densidade de matriz óssea nos grupos 60 dias controle, 68,69% ( $\pm 11,00$ ), e 60 dias experimental, 39,50% ( $\pm 9,52$ ), os resultados demonstraram haver uma diferença entre os grupos estatisticamente significativa. (Tabela 1)

Em ambos os períodos o grupo controle demonstrou maior densidade óssea, podemos concluir que a presença do biomaterial retarda o tempo de formação óssea.

Tabela 1. Relação da densidade óssea nos grupos controle e experimental nos tempos 15 e 60 dias.

<b>Tempo-dias</b>	<b>Densidade Óssea Controle</b>	<b>Densidade Óssea Experimental</b>	
<b>15</b>	55,42% ( $\pm 14,88$ )	22,09% ( $\pm 4,81$ )	p < 0,05*
<b>60</b>	68,69% ( $\pm 11,00$ )	39,50% ( $\pm 9,52$ )	p < 0,05*

Comparando-se o índice de densidade de matriz óssea nos grupos 15 dias controle, 55,42% ( $\pm 14,88$ ), e 60 dias controle 68,69%, ( $\pm 11,00$ ), os resultados demonstraram não haver diferença entre os grupos estatisticamente significativa. E comparando-se o índice de densidade de matriz óssea nos grupos 15 dias experimental,

22,09% ( $\pm 4.81$ ), e 60 dias experimental, 39,50% ( $\pm 9,52$ ), os resultados demonstraram haver uma diferença entre os grupos estatisticamente significativa. (Tabela 2)

Podemos observar que do período de 15 dias para 60 dias no grupo controle não houve alteração da densidade de matriz óssea mineralizada estatisticamente significativa, isso significa que no período de 15 dias o processo de reparo já atingiu um nível de reparação e formação óssea, já no grupo experimental somente após 60 dias houve uma maior quantidade de osso mineralizado.

Tabela 2. Evolução da densidade óssea nos tempos 15 e 60 dias nos grupos controle e experimental.

Densidade Óssea	15 dias	60 dias	
<b>Controle</b>	55,42% ( $\pm 14,88$ )	68,69% ( $\pm 11,00$ )	p > 0,05
<b>Experimental</b>	22,09% ( $\pm 4.81$ )	39,50% ( $\pm 9,52$ )	p < 0,05 *

Comparando-se o índice de Boneceramic nos grupos 15 dias experimental, 43,33% ( $\pm 15,06$ ), e 60 dias experimental, 45,89% ( $\pm 11,32$ ), os resultados demonstraram não haver diferença entre os grupos estatisticamente significativa. (Tabela 3)

Logo nos grupos de 15 e 60 dias o material manteve-se praticamente estável, com pouca reabsorção e substituição por matriz óssea mineralizada.

Tabela 3. Quantidade de cristais de Boneceramic nos tempos 15 e 60 dias.

Tempo	15 dias	60 dias	
<b>Cristais boneceramic</b>	43,33% ( $\pm 15,06$ )	45,89% ( $\pm 11,32$ )	p > 0,05

No Teste de correlação Linear de Pearson, comparando-se o índice de densidade de matriz óssea e o índice de Boneceramic no grupo 15 dias experimental, podemos concluir que há uma correlação inversa entre o índice de densidade de matriz óssea e o índice de Boneceramic no grupo 15 dias experimental, sendo que  $r$  (Pearson) = - 0,9559 e  $p = 0,04$ . Portanto, quanto maior a quantidade de Boneceramic ocupando a área, menor a quantidade matriz óssea formada.

Utilizando-se também o Teste de correlação Linear de Pearson e comparando-se o índice de densidade de matriz óssea e o índice de Boneceramic no grupo 60 dias experimental, sendo que  $r$  (Pearson) = - 0,9101 e  $p$  = 0,089 pôde-se concluir que a correlação entre o índice de densidade de matriz óssea e o índice de Boneceramic no grupo 60 dias experimental não é significativa.

## DISCUSSÃO

A capacidade de um biomaterial em acelerar e intensificar a regeneração e o reparo ósseo, quando implantados em alvéolos dentais, deve sempre ser testada e avaliada em estudos animais, como nos trabalhos de <sup>2, 12, 11, 26, 13, 17, 10, 9, 18, 19, 20, 21 e 22</sup>, previamente a sua utilização em alvéolos dentais humanos como no estudo de Ajdukovic e cols <sup>27</sup>.

As análises histomorfométricas deste estudo demonstraram em ambos os períodos de 15 e 60 dias íntimo contato entre os cristais residuais de Boneceramic® e o osso neoformado comprovando a osseointegração do material.

Em ambos os períodos, o grupo controle demonstrou maior densidade óssea, logo a presença do biomaterial dificultou e atrasou o tempo de formação óssea. Este resultado está de acordo com os obtidos por Develioglu e cols <sup>11 e 12</sup>. Estes autores em seu estudo avaliaram o efeito da CFCB composta de 65% HA e 35%  $\beta$ -TCF com grânulos de 900 a 1200 $\mu$ m, implantada em defeitos ósseos na calvária de ratos por 180, 360 e 540 dias. Em todos os períodos não houve formação óssea, segundo o autor, provavelmente pelo grande tamanho dos grânulos da CFCB utilizada no estudo, que dificultou e atrasou sua dissolução e reabsorção.

Pode-se observar que, do período de 15 dias para 60 dias, no grupo controle não houve alteração da densidade de matriz óssea mineralizada. Isso significa que no período de 15 dias o processo de reparo já atingiu um alto nível de reparação e formação óssea. Já no grupo experimental somente após 60 dias houve uma maior quantidade de osso mineralizado. Esses dados divergem dos resultados obtidos por Ajdukovic e cols <sup>27</sup>. Em seu estudo, um composto de CFCB e do polímero (poli-DL-lactide-co-glicolide)

foi implantado em alvéolos dentais humanos osteoporóticos pós exodontia e foram comparados aos alvéolos sem preenchimento. Foi avaliada a altura e densidade óssea radiograficamente. Os resultados mostraram que após 42 dias houve uma diminuição da densidade óssea e leve reabsorção óssea no grupo experimental. No entanto, após 168 dias houve um significativo aumento na densidade óssea no grupo experimental, comparando-se ao grupo controle. De acordo com o autor, o composto facilita a osteogênese e melhora a densidade óssea nos alvéolos osteoporóticos.

Avaliando-se a quantidade de cristais de Boneceramic® nos grupos 15 dias experimental, 43,33% ( $\pm 15,06$ ), e 60 dias experimental, 45,89% ( $\pm 11,32$ ), os resultados demonstraram não haver diferença entre os grupos estatisticamente significante. Com isso pode-se concluir que nos grupos de 15 e 60 dias o material manteve-se estável. Este resultado diverge dos encontrados por Manjubala e cols<sup>28</sup>. Neste estudo foi utilizada a CFCB para preenchimento de defeitos ósseos em cães, e após 84 dias foi observada total remodelação óssea e substituição do material implantado. Porém, os nossos resultados estão de acordo com os obtidos por Cordaro e cols<sup>29</sup>, onde os autores compararam a CFCB (Boneceramic®) e osso bovino inorgânico (Bio-Oss®) utilizados para preenchimento de seio maxilar em humanos. Após 180 a 240 dias foram retiradas amostras das áreas e os resultados demonstraram haver 21,6% de tecido ósseo mineralizado, 46,4 % de tecido não mineralizado e 26,6% de cristais residuais de Boneceramic.

Após avaliação dos estudos pertinentes na literatura, concluiu-se que diferenças nas propriedades físico-químicas das cerâmicas cálcio fosfato influenciam no seu comportamento e nas reações de reparo ósseo, alterando as propriedades osteocondutivas, integridade mecânica e o tempo de biodegradação do material, conjugado com a simultânea velocidade de substituição pelo osso neoformado. As características de formação, dissolução e reabsorção dos sais cálcio fosfato são influenciadas por fatores como natureza do corpo do cálcio fosfato (tamanho da partícula, características dos cristais, porosidade e densidade) e natureza da solução (composição, pH e temperatura)<sup>8,9,13,7,5,2</sup>.

A solubilidade dos sais cálcio fosfato diminui com o aumento da temperatura de sinterização.<sup>7</sup>, devido à redução da porosidade e da área de superfície específica<sup>2,9</sup>. A microporosidade permite que haja uma circulação de fluidos intersticiais; já a macroporosidade promove um arcabouço para a colonização de células ósseas<sup>5</sup>.

A alteração da proporção dos componentes (HA e  $\beta$ -TCF) na mistura de CFCB

pode alterar a sua resposta biológica (Bioatividade) <sup>9</sup> e dissolução. Quanto maior a concentração de  $\beta$ -TCF maior a solubilidade <sup>5,8</sup>. A resposta histológica do osso à CFCB foi avaliada por Fariña <sup>10</sup> em seu estudo, utilizando-se dois grupos, variando apenas a proporção dos seus componentes. Foram implantados na mandíbula de cães Beagle cilindros compostos de: grupo um, 85% HA e 15%  $\beta$ -TCF e grupo dois, 15% HA e 85%  $\beta$ -TCF. Ambas as cerâmicas foram sinterizadas a 1000° C por 1 hora. Os resultados histológicos indicaram que ambos os materiais foram biocompatíveis, porém uma maior quantidade de osso e em menor tempo foi formado no grupo dois, sugerindo que o material com maior concentração de  $\beta$ -TCF teve maior potencial osteogênico.

Bodde e cols. <sup>9</sup> compararam a cerâmica  $\beta$ -TCF e a CFCB implantadas no osso trabecular femoral de nove carneiras, por 3, 12, e 26 semanas. A cerâmica  $\beta$ -TCF utilizada era pura, e a CFCB era composta de 75% HA e 25%  $\beta$ -TCF. Os resultados demonstraram que no período de 12 semanas houve formação e presença de tecido ósseo apenas nas áreas onde o  $\beta$ -TCF e CFCB estavam presentes, ficando evidente a osteocondução na superfície de ambos os materiais, porém a cerâmica  $\beta$ -TCF teve uma degradação bem maior do que a CFCB. Os autores concluíram que a cerâmica  $\beta$ -TCF é mais vantajosa como substituto ósseo do que a CFCB, pois tem uma degradação maior e uma formação e distribuição óssea mais homogênea.

O tamanho dos grânulos também pode interferir na velocidade de reabsorção da CFCB. Em estudo de Develioglu e cols. <sup>11</sup>, foi avaliado o efeito da CFCB na osteogênese em defeitos ósseos criados bilateralmente na calvária de ratos, sacrificados após 180 dias e 360 dias. Os defeitos do grupo teste foram preenchidos com a CFCB, composta de 65% HA e 35%  $\beta$ -TCF, com grânulos de 900 a 1200  $\mu$ m e os do grupo controle deixados vazios. Os resultados mostraram que em ambos os grupos e períodos a CFCB não exibiu propriedades osteocondutivas. Segundo o autor, esse resultado ocorreu provavelmente pelo grande tamanho dos grânulos da CFCB utilizada no estudo que dificultou e atrasou sua dissolução e reabsorção. Os mesmos autores <sup>12</sup> realizaram outro estudo, com a mesma metodologia, porém o período de cicatrização foi de 540 dias. Os resultados histológicos demonstraram, em ambos os grupos que não houve evidências de formação óssea, e para eles há indícios de reação cicatricial contra o material.

Além disso, o sítio de implantação do material pode interferir diretamente nos resultados clínicos. Guehenec e cols <sup>13</sup> em seu estudo com ratos e coelhos utilizando diferentes sítios, concluíram que nas regiões em que o osso é mais córtico-esponjoso a

formação óssea é maior do que nas regiões de osso medular, pois há um maior estimulação mecânica, que favorece a formação óssea devido à uma maior atividade muscular, elevando a vascularização, proliferação e atividade de osteoblastos locais<sup>13</sup>.

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que a cerâmica fosfato de cálcio bifásica implantada em defeitos ósseos cirúrgicos alveolares de ratos gerou um decréscimo na densidade óssea, ocasionando um retardo no tempo de reparo e menor formação óssea no grupo experimental. Além disso, entre os períodos de 15 e 60 dias ocorreu a estabilidade dos cristais presentes na matriz óssea do modelo experimental proposto.

De acordo com as propriedades físico-químicas das cerâmicas fosfato de cálcio bifásica presentes em diversos estudos da literatura<sup>8, 9, 13, 7, 5, 11, 2</sup>, os fatores que podem ter influenciado no comportamento do biomaterial avaliado e nas reações de reparo ósseo apresentadas neste estudo são o tamanho dos grânulos utilizados, entre 500 a 1000  $\mu\text{m}$  (considerados grandes, de dissolução mais lenta), a temperatura de sinterização 1100° a 1500° C (considerada alta, onde há um decréscimo da área de superfície específica dos grânulos, com conseqüente lenta dissolução) e a proporção dos componentes no material de 60% de HA e 40 % de  $\beta$ -TCF (com grande concentração de HA na mistura, o que reduz a solubilidade do composto).

São necessários novos estudos para avaliação do tempo total de degradação e substituição do material estudado.

## ABSTRACT

Based in the histomorphometric analyses, this study evaluated the biological behavior of a biphasic calcium phosphate ceramics, in relation to the bone tissue after filling the surgical alveolar bone defects created in rats. Twelve male Wistar rats were used and the sample consisted of 24 alveolar defects: control group (n=12) and test group (n=12), in a split mouth design. In the test group, the alveolar defects were filled with biphasic calcium phosphate ceramic and in the control group, they were naturally filled with blood clot. At the 7th, 15th and 60th days, the animals were sacrificed and the protocol for histological routine completed. According to the results, the material proved to be biocompatible and it was osteointegrated, although in the final experimental period little reduction of its volume was observed. Most importantly, this study concluded that the use of biphasic calcium phosphate ceramic caused a delay in the alveolar healing process and failed to promote an increase in bone density.

**Key words:** Dental implants, Biomaterials, Biphasic calcium phosphate ceramics.

Figura 1. Fotografias dos procedimentos cirúrgicos. (A) Mesa cirúrgica. (B) Exodontia do primeiro molar superior. (C) Primeiro molar extraído. (D) Alvéolos pós-exodontia. (E) Criação do defeito alveolar. (F) Defeito alveolar. (G) Defeito alveolar preenchido com partículas de Straumann Boneceramic®. (H) Sutura.



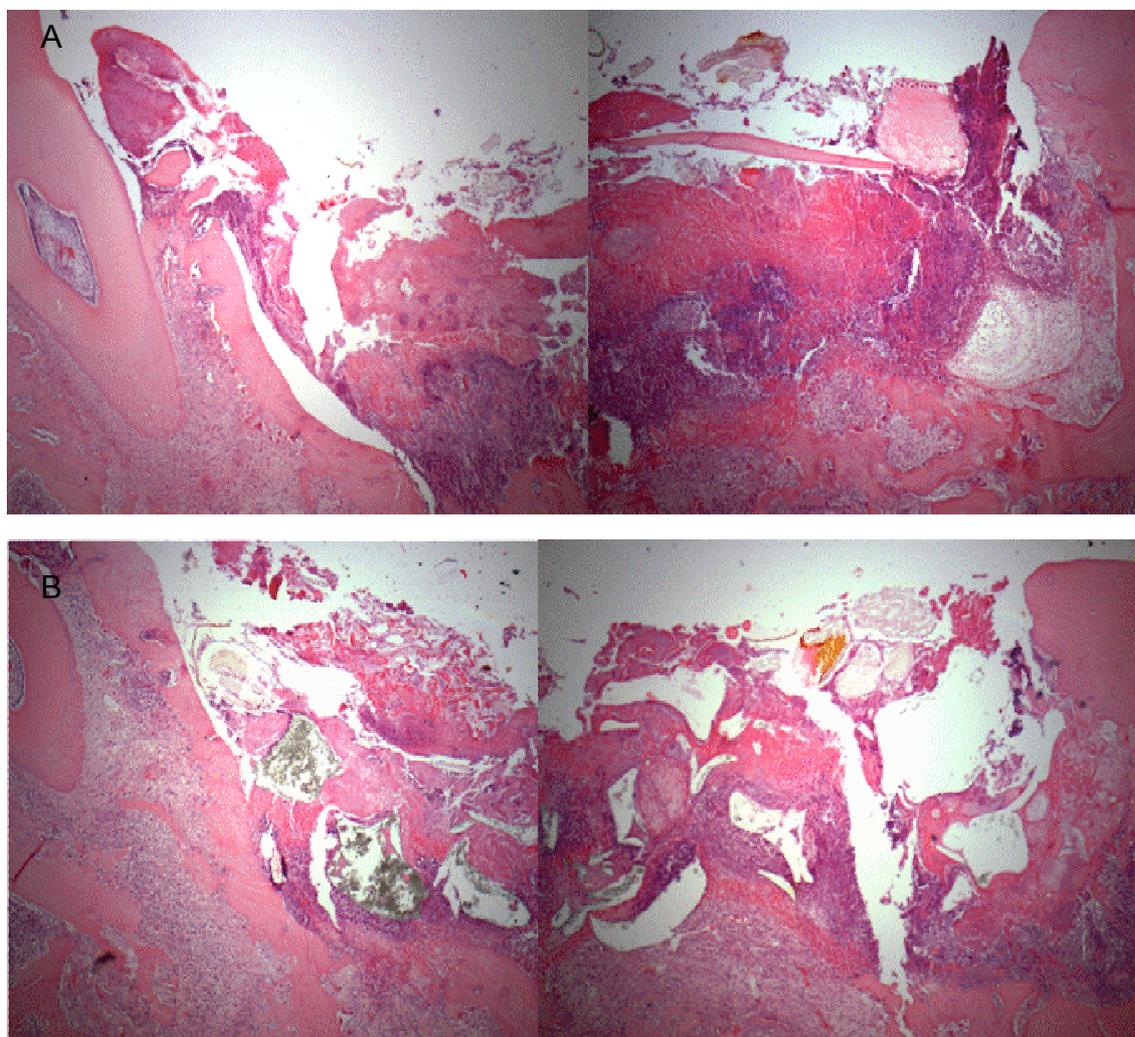
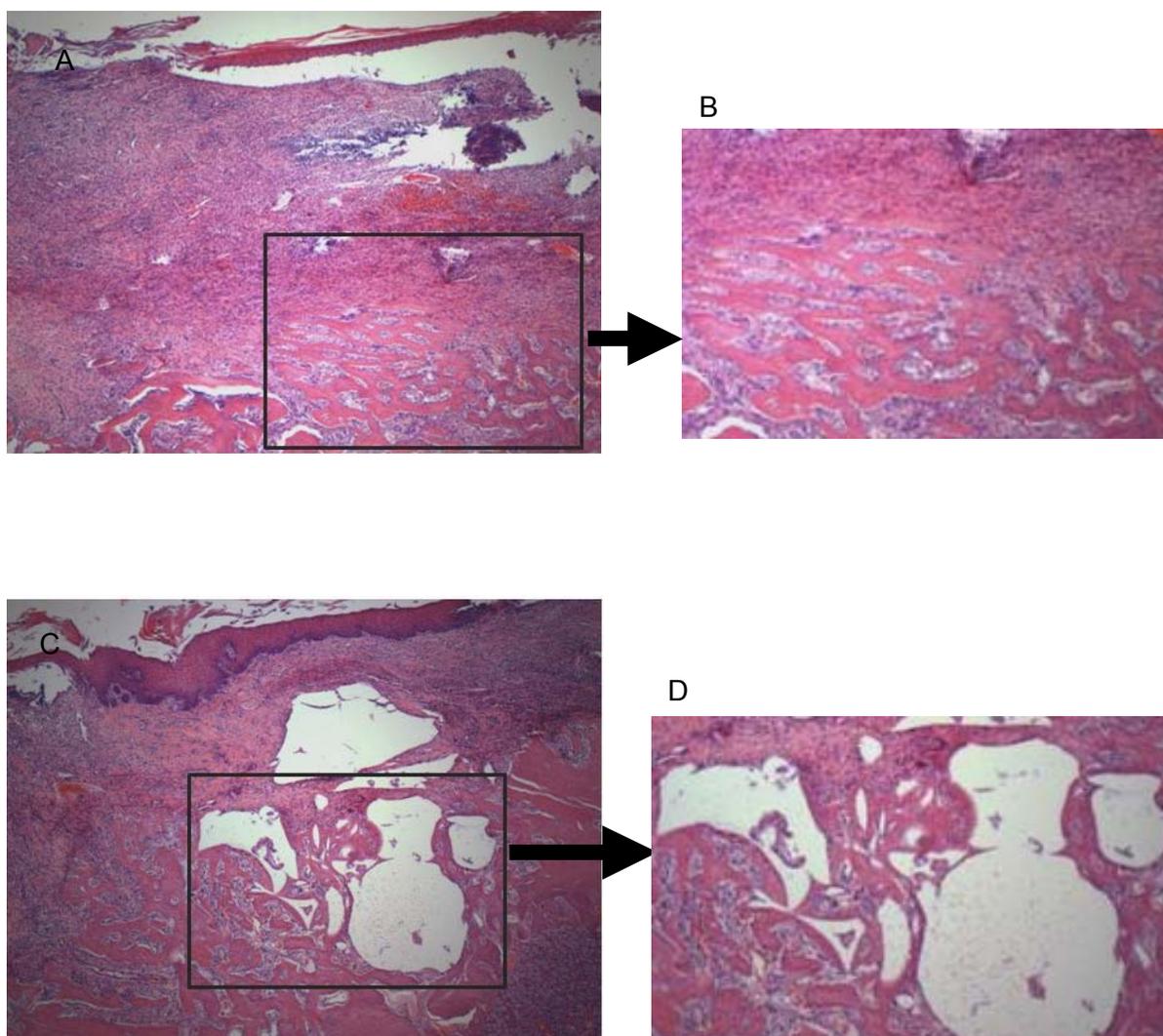


FIGURA 2. Aspecto histológico dos defeitos ósseos 7 dias após as exodontias. Grupo controle (A) e experimental (B).



Ferramenta de demarcação das áreas de interesse do estudo.

FIGURA 3. Aspecto histológico dos defeitos ósseos 15 dias após as exodontias. Grupo controle (A e B) e experimental (C e D).

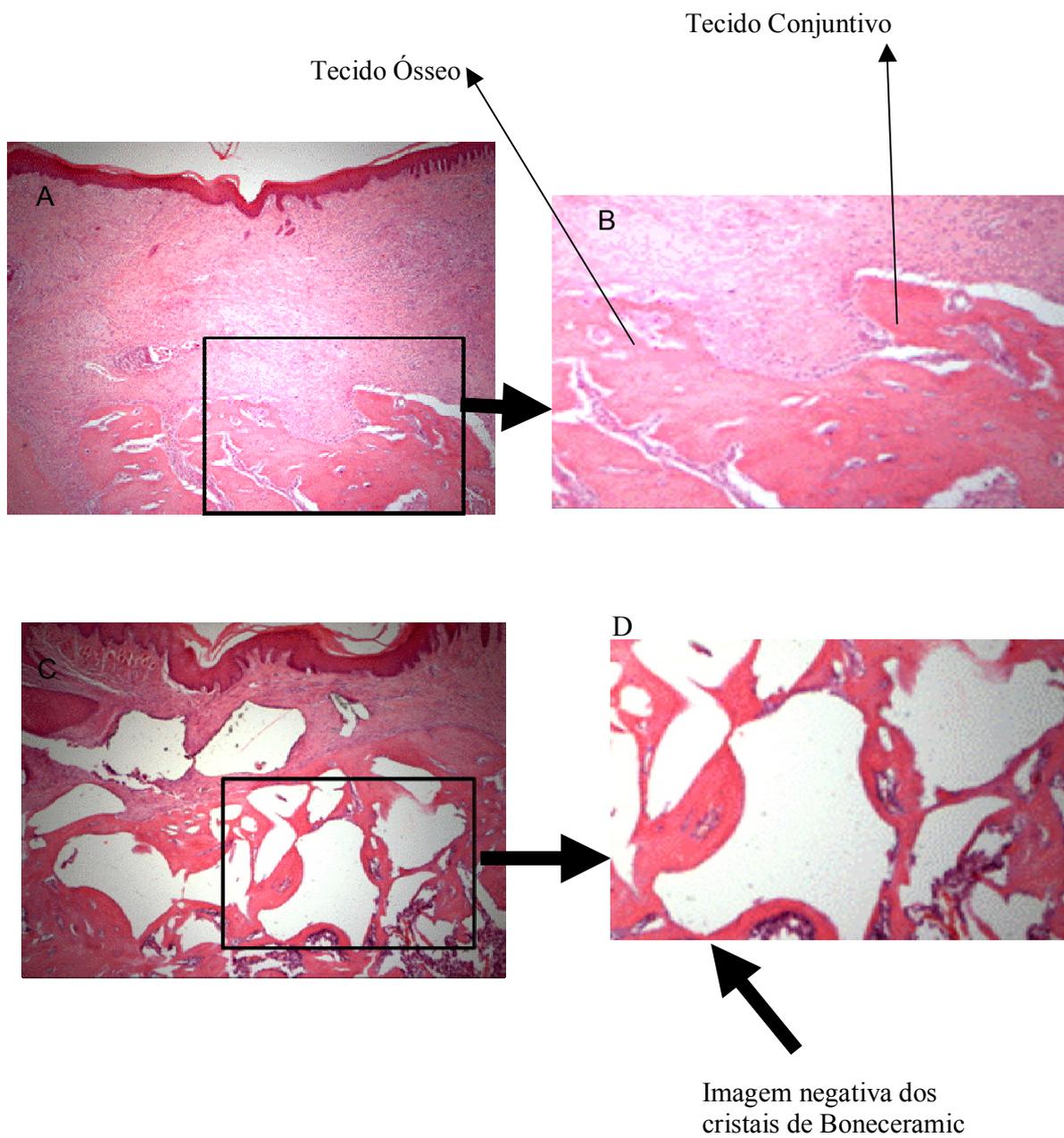


FIGURA 4. Aspecto histológico dos defeitos ósseos 60 dias após as exodontias. Grupo controle (A e B) e experimental (C e D).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Okamoto T, Trento CL. Implante homogêneo de matriz dentinária desmineralizada conservada em glicerina a 98% em alvéolo dental. Estudo microscópico em ratos. *Revista Ciências Odontológicas* 2002; 5(5):33-41.
- 2) Fellah BH, Gauthier O, Weiss P, Chappard D, Layrolle P. Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. *Biomaterials* 2008; 29:1177-88.
- 3) Leonel ECF, Porciúncula HF, Sobrinho JÁ, Ramalho LTO, Mangilli PD. Ação de diversos materiais de preenchimento durante a neoformação óssea. *Rev Bras Odontol* 2003; 60(3):154-56.
- 4) Santos, F.A., et al. Utilização do vidro bioativo na regeneração óssea guiada: revisão de literatura. *RBP – Revista Brasileira de Implantodontia & Prótese sobre Implantes* 2003; 10(40):320-26.
- 5) Legeros RZ, Lin S, Rohanizadeh R, Mijares D, Legeros JP. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *J Mater Sci Mater Méd* 2003; 14:201-09.
- 6) Manjubala I, Sivakumar M, Sureshkumar RV, Sastry TP. Bioactivity and osseointegration study of calcium phosphate ceramic of different chemical composition. *J Biomed Mater Res* 2002; 63:200-08.
- 7) Barrère F, Blitterswijk CA, Groot K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *Int J Nanomedicine* 2006; 1(3):317-332.
- 8) Daculsi G, Laboux O, Malard O, Weiss P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J Mater Sci Mater Méd* 2003; 14:195-200.
- 9) Bodde EWH, Wolke JGC, Kowalski RSZ, Jansen JÁ. Bone regeneration of porous  $\beta$ -tricalcium phosphate (Conduit™ TCP) and of biphasic calcium phosphate ceramic (Biosel®) in trabecular defects in sheep. *J Biomed Mater Res A* 2007; 82A:711-22.
- 10) Fariña NM, Guzón FM, Pena ML, Cantalapiedra AG. In vivo behavior of two different biphasic ceramic implanted in mandibular bone of dogs. *J Mater Sci Mater Méd* 2008; 19:1565-73.

- 11) Develioglu H, Saraydin SU, Bolayir G, Dupoirieux L. Assessment of the effect of a biphasic ceramic on bone response in a rat calvarial defect model. *J Biomed Mater Res A* 2006; 77A:627-31.
- 12) Develioglu H, Saraydin SU, Dupoirieux L, Sahin ZD. Histological findings of long-term healing of the experimental defects by application of a synthetic biphasic ceramic in rats. *J Biomed Mater Res A* 2007; 80A:505-08.
- 13) Guehenec LL, Goyenvalle E, Aguado E, Houchmand-Cuny M, Enkel B, Pilet P, et al. Small-animal models for testing macroporous ceramic bone substitutes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005; 72B: 69-78.
- 14) Yuan H, Blitterswijk CAV, Groot K, Bruijn JD. Cross-species comparison of ectopic bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxiapatita HA scaffolds. *Tissue Eng* 2006; 12(6):1607-1615.
- 15) Yuan H, Blitterswijk CA, Groot K, Bruijn JD. A comparison of bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxiapatite HA implanted in muscle and bone of dogs at different time periods. *J Biomed Mater Res A* 2006; 78A:139-147.
- 16) Lecomte A, Gautier H, Bouler JM, Gouyette A, Pegon Y, Daculsi G, et al. Biphasic calcium phosphate: a comparative study of interconnected porosity in two ceramics. *J Biomed Mater Res B* 2008; 84B:1-6.
- 17) Fellah BH, Josselin N, Chappard D, Weiss P, Layrolle P. Inflammatory reaction in rats muscle after implantation of biphasic calcium phosphate micr particles. *J Mater Sci Mater Méd* 2007; 18:287-294.
- 18) Okamoto T, Trento CL. Implante homogéneo de matriz dentinária desmineralizada conservada em glicerina a 98 por cento em alvéolo dental. Estudo microscópico em ratos. *Revista Ciências Odontológicas* 2002; 5(5):33-41.
- 19) Boeck EM, Pansani CA, Okamoto T, Goissis G, Boeck Neto RJ, Marcantonio Júnior E. Implante de hidroxiapatita em alvéolos dentais. Estudo histopatológico em ratos. *Rev Odontol UNESP* 1999; 28(1):83-96.
- 20) Rosa AL, Brentegani LG, Grandini AS. Hidroxylapatite and tricalcium phosphate implants in the dental alveolus of rats. A histometric study. *Braz Dent J* 1995; 6(2):103-09.

- 21) Xavier SP, Carvalho TLL, Brentegani LG. Histometric analysis of rat alveolar wound healing following immediate implantation of a biocompatible osteoconductive polymer (BOP). *RPG Rev Pós Grad* 2000; 7(2):103-07.
- 22) Mendes RM, Silva GAB, Lima MF, Calliari MV, Almeida AP, Alves JB et al. Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats. *Archives of Oral Biology* 2008:1-8, doi: 10.1016/j.archoralbio.2008.07.001
- 23) Alves-Rezende MCR, Okamoto T. Implante de “Tissucol” em feridas de extração dental. Estudo histológico em ratos. *Rev Odontol UNESP* 1992; 21:161-70.
- 24) Kauschke E, Rumpel E, Fanghanel J, Bayerlein T, Gedrange T, Proff P. The in vitro viability and growth of fibroblasts cultured in the presence of different bone grafting materials (NanoBone® and Straumann Bone Ceramic®). *Folia Morphol (Warsz)* 2006; 65(1):37-42.
- 25) Straumann Bone Ceramic®: cerâmica fosfato de cálcio Bifásica [(60% de HA e 40 % de (β-TCF)]: grânulos. Basileia, Suíça: Straumann.2008. Especificações do fabricante.
- 26) Jafarian M, Eslaminejad MB, Khojasteh A, Abbas FM, Dehghan MM, Hassanizadeh R, et al. Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: a comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 105:e14-e24.
- 27) Ajdukovic, Z, Ignjatovic, N, Petrovic, D, Uskokovic, D. Substitution of osteoporotic alveolar bone by biphasic calcium phosphate / poli-DL-lactide-co-glicolide biomaterials. *Journal of Biomaterials Applications* 2007; 21:317-26.
- 28) Manjubala I, Sivakumar M, Sureshkumar RV, Sastry TP. Bioactivity and osseointegration study of calcium phosphate ceramic of different chemical composition. *J Biomed Mater Res* 2002; 63:200-08.
- 29) Cordaro, L, Bosshardt, DD, Palattella, P, Rao, W, Serino, G, Chiapasco, M. Maxillary sinus grafting with Bio-Oss® or Straumann Bone Ceramic®: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. *Clin. Oral Impl. Res* 2008; 19:796-803.

