



‘Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

RODRIGO CAPALBO DA SILVA

Análise do processo de incorporação óssea do biomaterial sintético a base de β -tricálcio fosfato em bloco instalado em mandíbula de coelhos. Análise histológica

Araçatuba – SP

2017



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

RODRIGO CAPALBO DA SILVA

Análise do processo de incorporação óssea do biomaterial sintético a base de β -tricálcio fosfato em bloco instalado em mandíbula de coelhos. Análise histológica

Trabalho de conclusão de curso apresentado a Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Ass.
Francisley Ávila Souza

Araçatuba – SP

2017

Dedico este trabalho com muito amor e carinho, a minha família, meu alicerce em tudo o que faço. O apoio de todos foi essencial para que eu chegasse até aqui. A vocês, minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Pai amado, que com todo seu amor e cuidado me capacitou e me proporcionou momentos incríveis durante esta trajetória. Me deu força nos momentos mais difíceis, me guiou dando discernimento durante as minhas escolhas, abriu portas e sempre esteve ao meu lado.

Aos meus pais Jorge e Érica, que mais do que eu, batalharam por essa conquista e fizeram de tudo para permitir que eu corresse atrás dos meus sonhos. Vocês são a maior referência e exemplo que tenho como pessoas, tudo o que fiz e faço é por vocês. Obrigado por tudo pai e mãe, hoje o homem que me tornei é resultado de tudo o que fizeram por mim.

Ao meu irmão Rafael, meu companheiro e amigo que cresceu junto comigo e pôde acompanhar de perto todas as fases da minha vida sempre me apoiando.

A minha prima Ana Laura, que com sua inocência e pureza diariamente me faz querer ser uma pessoa melhor. “Nananinha” obrigado por me mostrar um amor incondicional, saiba que sempre estarei ao seu lado protegendo e cuidando de você para que possa ser a pessoa mais feliz desse mundo.

A minha avó materna e madrinha Elza Soares, que sempre torceu por mim com muito amor e carinho. A senhora é para mim um símbolo de mulher guerreira, a levarei sempre comigo por onde for.

A minha tia Carolina que sempre esteve ao meu lado, me apoiando e fazendo parte de tudo o que passei até aqui e me deu de presente minha prima Ana Laura, que chegou para iluminar nossas vidas com toda sua luz.

Aos meus tios Marco e Lúcia Capalbo, que apoiaram a mim e minha família para que isso acontecesse. Por sempre estarem tão presentes, fazendo de tudo para unir a família permitindo bons momentos de confraternização e alegria entre nós.

As minhas primas Letícia e Bruna Capalbo, que cresceram junto comigo e me mostraram o verdadeiro significado de amizade transcendendo tempo, distância, ou momentos. Por me ajudarem durante essa fase da graduação compartilhando experiências e conhecimento. Fico muito feliz por poder me tornar um colega de profissão de vocês.

A minha namorada Lara Cervantes, que me ensinou o quão simples pode ser a complexidade de amar. Você tem sido minha grande companheira, me ajudando a passar por essa fase decisiva na minha vida me trazendo paz, carinho, amor, e me fazendo feliz todos os dias com momentos nossos e únicos. Você me faz querer ser uma pessoa melhor a cada dia, sua vida me inspira. Eu te amo muito!

Ao meu professor e orientador Professor Assistente Doutor Francisley Ávila Souza, que foi fundamental para a minha formação. O senhor é uma referência de profissional e pessoa para mim. Sou muito grato por todo conhecimento compartilhado, por sempre se mostrar disponível e principalmente por toda ajuda que o senhor me deu para que eu me fortalecesse para buscar o meu sonho. Obrigado por me aceitar como seu orientado e ter confiado em meu trabalho.

A professora Assistente Doutora Ana Paula Farnezzzi Bassi por ser um grande exemplo de docente e ao mesmo tempo, ser tão humana. Obrigado pelo amor e dedicação ao ensino e às pessoas que a senhora demonstra, inspirando todos os alunos.

A Professora Assistente Doutora Daniela Ponzoni por contribuir ao meu crescimento profissional, sempre com muita humildade e respeito. A simplicidade com que a senhora transmite conhecimento é admirável.

Ao Professor Assistente Doutor Leonardo Perez Faverani, por toda ajuda que me deu, mostrando o seu amor pela ciência e Cirurgia. O senhor de forma leve e alegre mostra a todos o verdadeiro significado de equipe.

Aos Professores do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, que contribuíram para a minha formação, me inspiram e só fazem o meu amor pela Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial aumentar.

Ao meu amigo Pedro Henrique Gomes Ferreira, que sempre esteve disposto a me ajudar a crescer dentro da área de Cirurgia. Como pós-graduando, passando seu conhecimento com muita paciência e humildade, sempre buscando a excelência. Por consequência da convivência e trabalho juntos, ganhei um grande amigo.

Aos Pós Graduandos de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Implantodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, pelo muito bom convívio durante esses quase quatro anos como estagiário da disciplina, por compartilharem conhecimento e serem exemplo de como quero ser um dia.

Aos Ass. Suporte Acadêmico I Marco Aurélio de Oliveira Ianner, sempre muito solícito e um grande companheiro nos ambulatórios.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Tit. Wilson Roberto Poi e do vice-diretor Prof. Tit. Joao Eduardo Gomes Filho.

A minha querida e amada amiga Ana Daniela Spinola, um presente que a faculdade me deu. Tudo o que passamos em nossas vidas só serviram para nos fortalecer e nos aproximar. Saiba que independente de onde estiver sempre estarei com você em pensamento. Você é a irmã que nunca tive.

A minha amiga Gabriela Miotto, pela amizade e parceria de clínica. Você tornou minha graduação muito mais fácil e divertida. Que por onde passar sempre leve sua alegria e carisma contagiando todos a sua volta.

A minha amiga Elisa Furquim, que com sua forma singular de ver o mundo me ajudou a enxergar coisas que são perceptíveis apenas quando vistas com o que vem de dentro. Você contribuiu muito com o meu crescimento pessoal e me inspira a ser alguém melhor.

A minha amiga Isadora Victorino, que desde que nos conhecemos sempre esteve ao meu lado, nos momentos de alegria e dificuldade os tornando únicos com seu jeito de ser. Obrigado pela amizade, por compartilhar histórias e risadas que ficarão pra sempre guardados em mim.

Ao meu amigo Caio Faria, pela parceria, conversas e crescimento adquirido juntos. Sua humildade foi de fundamental importância no meu desenvolvimento pessoal durante esses anos de graduação. Obrigado pela confiança durante nossas parcerias em clínica.

A todos meus amigos de graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, que proporcionaram momentos de muita alegria que jamais esquecerei. Levarei cada um em meu coração por toda minha vida.

A todos os professores que passaram pela minha vida, ajudando a construir a minha história e grande parte de quem sou. Obrigado por acreditarem na educação, por cada palavra compartilhada dentro da sala de aula carregada de sentimentos e experiência, por mudarem a vida de um eterno aprendiz.

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

Rubem Alves

CAPALBO-DA-SILVA, R. **Análise do processo de incorporação óssea do biomaterial sintético a base de β -tricálcio fosfato em bloco instalado em mandíbula de coelhos. Análise histológica.** 2017. 32f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

RESUMO

O processo de incorporação dos biomateriais vem sendo amplamente discutido pela literatura científica no intuito de encontrar um substituto ósseo como alternativa ao enxerto ósseo autógeno. O objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de incorporação óssea do enxerto ósseo autógeno e do bloco de β -tricálcio fosfato em mandíbula de coelhos. Para tal, dez coelhos receberam aleatoriamente em seus ângulos mandibulares direito e esquerdo o enxerto ósseo autógeno obtido da tíbia esquerda, constituindo o Grupo Autógeno ou o biomaterial sintético a base de β -tricálcio fosfato, constituindo o Grupo Biomaterial. Ambos os blocos apresentavam formato circular com 8mm de diâmetro. Os blocos foram fixados por parafusos bicorticais. Após períodos de 30 e 60 dias pós-operatórios os animais sofreram eutanásia, e seus ângulos mandibulares direito e esquerdo foram dissecados e fixados em formol 10%. Realizou-se o processamento laboratorial para obtenção de cortes em parafina seriados montados em lâminas, e análise microscópica qualitativa da interface de incorporação de enxerto ao leito receptor. Pela análise qualitativa microscópica no período de 30 dias no Grupo Autógeno pode-se observar processo de incorporação com inúmeras pontes do leito receptor ao enxerto autógeno. Aos 30 dias no Grupo Biomaterial pode-se notar o processo de incorporação com retardo em relação ao Grupo Autógeno. Pode-se observar presença do biomaterial envolto ora por tecido ósseo, ora por tecido conjuntivo em fase de diferenciação. Aos 60 dias no Grupo Autógeno pode observar período de incorporação em fase avançada com a presença de linha de cimentação entre o enxerto e leito receptor. No Grupo Biomaterial aos 60 dias pode-se notar presença de resquícios de biomaterial envolto por tecido ósseo em fase de modelagem anabólica. No entanto observou-se que biomaterial foi quase todo reabsorvido com perda de volume do enxerto, sugerindo que o material apresentou alta solubilidade. Diante dos resultados obtidos conclui-se que ambos os materiais de enxerto

apresentaram biocompatibilidade com incorporação ao leito receptor. No entanto o enxerto ósseo autógeno manteve volume de material enxertado enquanto o biomaterial sintético a base de β -tricálcio fosfato apresentou alta solubilidade levando a perda de volume durante o processo de incorporação.

Palavras Chave: Condução óssea, biomateriais, enxerto ósseo, Hidroxiapatita de Cálcio.

CAPALBO-DA-SILVA, R. **Analysis of bone incorporation process of synthetic biomaterial of β -tricalcium phosphate block installed on rabbits jaw. Análise histológica.** 2017. 32f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

ABSTRACT

The process of incorporation of biomaterials has been widely discussed in the scientific literature in order to find a bone substitute as an alternative to the autogenous bone graft. The purpose of this study was to evaluate the bone incorporation process of the autogenous bone graft and the β -tricalcium phosphate block in the mandible of rabbits. For this purpose, ten rabbits randomly received the autogenous bone graft obtained from the left tibia of the same animal at their right and left mandibular angles, constituting the Autogenous Group or the synthetic biomaterial based on β -tricalcium phosphate, constituting the Biomaterial Group. Both blocks had a circular shape with 8mm diameter. The blocks were fixed by bicortical screws. After periods of 30 and 60 postoperative days the animals suffered euthanasia, and their right and left mandibular angles were dissected and fixed in 10% formaldehyde. Laboratory work was performed to obtain serial paraffin cuts mounted on slides. The qualitative microscopic analysis of the graft incorporation interface to the recipient bed was performed. In the 30-day period in the Autogenous Group we can observe the incorporation process with innumerable bridges from the receptor bed to the autogenous graft. Osteoplasts were present in the bone graft, suggesting that it was in the replacement phase. At 30 days in the Biomaterial Group one can note the process of incorporation with delay in relation to the Autogenous Group. It is possible to observe the presence of the biomaterial sometimes enveloped by bone tissue, or by connective tissue in phase of differentiation. At 60 days in the Autogenous Group can observe period of incorporation in advanced stage with the presence of cementation line between the graft and recipient bed. In the Biomaterial Group at 60 days can be noticed the presence of remnants of biomaterial enveloped by bone tissue in the anabolic modeling phase. However, it was observed that biomaterial was almost completely reabsorbed with loss of graft volume, suggesting that the material presented high solubility. In view of the obtained results it is concluded that both graft materials presented biocompatibility with incorporation into the receptor bed. However, the autogenous bone graft maintained volume of grafted material while the synthetic biomaterial based on β -tricalcium phosphate showed high solubility leading to loss of volume during the incorporation process.

Key words: Bone conduction, biomaterials, bone graft, Hydroxyapatite of Calcium.

LISTA DE FIGURAS

Figura1- Fase Cirúrgica. A: Bloco ósseo pronto para ser removido B: Instalação do bloco de osso autógeno; C: Instalação do biomaterial Graftys BCP	27
Figura 2- Grupo Autógeno 30 dias – HE 40X. A: Enxerto autógeno; B: Leito receptor; C: Interface; D: Local parafuso de fixação.	27
Figura 3- Grupo Autógeno 30 dias – HE 125X. A: Enxerto autógeno; B: Tecido ósseo neoformado; →Região de remodelação óssea.	28
Figura 4- Grupo Autógeno 60 dias – HE 40X. A: Enxerto autógeno; B: Osso neoformado; →osteoplastos	28
Figura 5- Grupo Autógeno 60 dias – HE 200X. A: Enxerto autógeno; B: Osso neoformado; C: Tecido Conjuntivo; → Íntimo contato entre enxerto e leito (linha de cimentação); →osteoplastos	29
Figura 6- Grupo Biomaterial 30 dias – HE 40X. A: Biomaterial; B: Osso neoformado; C: Leito receptor residual; D: Tecido Muscular; → Osteoblastos dispostos em paliçada.	29
Figura 7- Grupo Biomaterial 30 dias – HE 125X. A: Biomaterial; B: Osso neoformado; → Osteoblastos dispostos em paliçada	30
Figura 8- Grupo Biomaterial 60 dias – HE 40X. A: Biomaterial; B: Osso neoformado; C: Ilhas de tecido ósseo neoformado.	30
Figura 9- Grupo Biomaterial 60 dias – HE 200x. A: Biomaterial; B: Ilha tecido ósseo neoformado; C: Tecido conjuntivo	31

LISTA DE ABREVIATURAS

B-TCP β - Tricálcio fosfato

HA Hidroxiapatita

SUMÁRIO

1. Introdução	14
2. Proposição	15
3. Materiais e Métodos	15
3.1 <i>Animais e grupos experimentais</i>	15
3.2 Cirurgia experimental	16
3.3 Processamento laboratorial	17
3.4 Análise Qualitativa Histológica	18
4. Resultados	18
4.1 Grupo Autógeno	18
4.2 Grupo Biomaterial	19
5. Discussão	20
6. Conclusão	23
Referências	24
Figuras	27
Anexos	32

1. INTRODUÇÃO

O conceito de osseointegração e a ancoragem óssea direta de implantes intraósseos feitos em titânio comercialmente puro causaram uma revolução na reabilitação oral¹. Historicamente, as avaliações do sucesso dos implantes focavam exclusivamente na habilidade do implante integrar ao tecido ósseo, e manter uma prótese funcional. No entanto, com o avanço da tecnologia e o melhor entendimento da biologia a partir da osseointegração, os rumos da implantodontia contemporânea tem mudado. Hoje a esperança da recriação do que a natureza originalmente criou, em termos de função e estética, tem se tornado o objetivo maior.²

A reabsorção óssea após a perda dentária ainda é um grande obstáculo nas reabilitações estéticas e funcionais dos pacientes. Para a correção da reabsorção óssea fisiológica após perda dentária e defeitos ósseos de diferentes causas o enxerto ósseo autógeno ainda é a melhor opção, constituindo assim o padrão ouro³. As principais propriedades biológicas atribuídas aos enxertos ósseos autógenos são a osteoindução e a osteogênese e osteocondução⁴. A osteoindução é o processo em que as células tronco mesenquimais que estão presentes ao redor do enxerto são induzidas a diferenciação em células osteoblásticas⁵. Esse mecanismo está relacionado à atividade da proteína osteomorfogenética presente na matriz óssea. A osteogênese requer osteoblastos vivos e precursores para repovoar o enxerto e formar novo osso, e a osteocondução envolve a substituição do enxerto por células osteoprogenitoras do hospedeiro. A reabsorção óssea se dá ao mesmo tempo em que a aposição óssea⁶.

Segundo estudo anterior⁷ o enxerto ósseo autógeno constitui o padrão ouro, pois além de servir como um arcabouço osteocondutivo ele possui propriedades osteoindutivas e osteogênicas. Porém para a obtenção do enxerto autógeno há o risco de injúrias vasculares ou neurológicas no sítio doador, assim como a morbidade pós-operatória do paciente, necessidade de acesso a dois sítios cirúrgicos, maior tempo operatório, maior tempo de recuperação pós-operatória e muitas vezes a necessidade de internação hospitalar. Estas desvantagens têm direcionado as pesquisas na busca de biomateriais para cirurgias reconstrutivas alternativos ao enxerto autógeno.

Atualmente existe no mercado uma grande variedade de biomateriais, sintéticos ou biológicos. Eles podem ser classificados de acordo com suas propriedades biológicas e modo de ação⁸. Dentre estes biomateriais destacam-se as cerâmicas de tricálcio fosfato. Estas induzem a formação óssea por osteocondução, servindo de arca-bouço. A cerâmica a base de fosfato β -tricálcio é produzida em temperaturas abaixo de 1125°C⁹⁻¹⁰. É um biomaterial de origem sintética que vem sendo amplamente aceito e estudado pela comunidade científica devido a sua biocompatibilidade, bioatividade, absorção favorável e boa propriedade biológica de osteocondução¹¹⁻¹².

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi analisar e comparar o processo de incorporação óssea do enxerto ósseo autógeno e do bloco de β -tricálcio fosfato fixados por meio de parafusos bicorticais no ângulo mandibular de coelhos empregando-se a análise histológica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e grupos experimentais

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética de Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, campus da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e recebeu parecer favorável a sua realização de acordo com processo 00999/2011. Foram utilizados 10 coelhos *albinus* (Nova Zelândia) machos, adultos, pesando aproximadamente entre 3 a 4 Kg. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com dieta padrão, ração sólida (Procoelho - Primor, São Paulo, SP, Brasil) e água *ad libitum*, em condições climatizadas no biotério do Campus da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais. Foram eles:

Grupo autógeno: Os animais receberam aleatoriamente em seus ângulos mandibulares direito e esquerdo o enxerto ósseo autógeno obtido da porção medial da metafise da tibia esquerda.

Grupo Biomaterial: Os animais receberam aleatoriamente em seus ângulos mandibulares direito e esquerdo o bloco de Cerâmica bifásica de fosfato de cálcio (Grafts® BCP, Smart Bone Substitute, Aix-En-Provence, França).

Cirurgia experimental

Os coelhos foram mantidos em jejum, pesados e sedados via intramuscular, pela associação de 50mg/Kg de Cloridrato de Quetamina (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) associado a 5mg/Kg de Xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda, Osasco, São Paulo, Brasil). Em seguida realizou-se a tricotomia e anti-sepsia nas regiões dos ângulos mandibulares direito, esquerdo e tibia esquerda com PVPI degermante e tópico (PVPI 10%, Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto, Brasil). Como complementação anestésica os animais receberam infiltração local de cloridrato de mepivacaína (0.3 ml/Kg, Scandicaine 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França) nas mesmas regiões. Foi realizada uma incisão na derme de aproximadamente 2 cm de comprimento por meio de lâmina de bisturi número 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão), montada em cabo de bisturi número 3 nos ângulos mandibulares direito e esquerdo. Em seguida o tecido mole foi divulsionado em planos até o perióstio que foi incisado a fim de expor o tecido ósseo da área receptora. Neste momento foi realizada uma delicada decorticalização da tábua óssea lateral do ângulo mandibular por meio de broca 701 (Maillefer Instruments, Ballaigues, Suíça), montada em peça reta multiplicadora (Kavo do Brasil, Joinville, Brasil) em motor elétrico (Kavo do Brasil, Joinville, Brasil), sob irrigação constante de solução fisiológica a 0.9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil). Após exposição das áreas receptoras procedeu-se a coleta do enxerto ósseo autógeno obtido da tibia. Para tal foi realizado uma incisão de aproximadamente 2 cm na metáfise tibial esquerda como descrito anteriormente. O tecido mole foi divulsionado a fim de expor o tecido ósseo. A osteotomia foi realizada por meio de broca trefina de 8mm (Neodent®, Curitiba, Paraná, Brasil) montada em um contra ângulo redutor de 20:1 (Kavo® do Brasil, Joinville, Brasil) adaptado ao motor elétrico a uma velocidade de 1500 rpm. Após osteotomia realizou-se cuidadosamente a remoção do mesmo, seguido do seu armazenamento em solução fisiológica (Figura 1a). Conforme descrito anteriormente foi obtido o material de enxerto do bloco de Cerâmica bifásica de fosfato de cálcio + HA (Grafts® BTCP, Smart Bone Substitute, Aix-En-Provence,

França) empregando a mesma broca trefina no intuito dos 2 materiais de enxerto apresentarem o mesmo diâmetro. Após esta etapa procedeu-se a perfuração dos blocos, seguido da fixação dos enxertos autógeno (Figura 1b) e biomaterial (Figura 1c) nos ângulos mandibulares direito e esquerdo, distribuídos aleatoriamente. Foram empregados parafusos corticais de 1,6 x 8mm (SIN, Sistema de Implante Nacional, São Paulo, Brasil) para a fixação dos blocos. Após esta etapa a sutura foi realizada em planos, empregando-se fio absorvível (Poligalactina 910 – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos contínuos no plano muscular e fio não-absorvível (Nylon 4.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano da derme. No pós-operatório os animais receberam administração IM de Pentabiótico (0,1ml/Kg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, São Paulo, Brasil) e de Dipirona Sódica (1mg/Kg/dia, Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda, São Paulo, Brasil) em dose única. Após os períodos de 30 e 60 dias cinco animais de cada grupo foram anestesiados conforme descrito anteriormente, e foi realizada a eutanásia por injeção excessiva de anestésico.

Processamento laboratorial

As mandíbulas foram dissecadas, seguido da osteotomia para obtenção de peças com margem de 3 cm ao redor do material de enxerto. As peças foram fixadas em formol neutro 10% tamponado (Reagentes Analíticos®, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) posteriormente lavadas e sofreram descalcificação em EDTA 20% (Ácido Etileno Diamino Tetracético, Merck) dissolvido em água MiliQ, com trocas semanais por um período de 6 semanas, à temperatura ambiente. Após a descalcificação os parafusos de fixação do material de enxerto foram removidos cuidadosamente. Em seguida o material foi desidratado utilizando uma sequência crescente e gradativa de alcoóis 70, 90, 95 e 100, com troca de solução a cada 1 hora, em agitador orbital (KLine CT – 150®, Cientec – Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil). Após estas etapas, foi realizada a diafanização com xilol e posterior, inclusão em parafina para obtenção de corte com 6 µm de espessura montados em lâminas de vidro para a coloração em hematoxilina e eosina (HE Merck & Co., Inc., NJ, EUA).

Análise Qualitativa Histológica

Para a análise qualitativa dos cortes histológicos foi utilizado um microscópio óptico binocular JENAMED 2 (Carl-Zeiss), com objetivas de aumento 40X, 125X, 200X, considerando o interior do enxerto ósseo, a interface leito receptor-enxerto ósseo e o tecido neoformado.

4. RESULTADOS

Análise qualitativa histológica

Grupo Autógeno

No grupo autógeno aos 30 dias pós-operatórios (Figura 2) pode-se observar o enxerto autógeno (A) posicionado sobre o leito receptor (B). Entre o enxerto ósseo autógeno e o leito receptor pode-se observar tecido ósseo com presença grande número de trabéculas ósseas em fase de maturação com alta viabilidade celular e bem vascularizada (C).

Numa vista isolada do material de enxerto autógeno aos 30 dias pós-operatórios (Figura 3) pode-se notar presença do enxerto ósseo autógeno (A), tecido ósseo neoformado (B). No interior do enxerto ósseo autógeno foi possível observar pequenas áreas de reabsorção (setas pretas), sugerindo que o tecido ósseo está em fase de remodelação.

Aos 60 dias pós-operatórios no grupo autógeno (Figura 4) pode-se observar o enxerto ósseo autógeno (A) em contato com tecido ósseo neoformado (B). No interior do enxerto ósseo autógeno podem-se observar áreas de tecido conjuntivo, sugerindo que este tecido está em fase de remodelação óssea. Pode-se visualizar também células sem núcleo, sugerindo a presença de osteoplastos (seta vermelha).

Na análise microscópica do grupo autógeno aos 60 dias pós-operatórios (Figura 5) em uma vista mais próxima pode-se notar presença do enxerto ósseo autógeno (A), tecido ósseo neoformado (B) separada por uma linha de cimentação (seta preta). No interior do enxerto ósseo autógeno notou-se a presença de áreas de

tecido conjuntivo (C), sugerindo fase de remodelação. Pode-se observar com maior nitidez a presença dos osteoplastos (setas vermelhas).

Grupo Biomaterial

No período de 30 dias pós-operatório (Figura 6) pode-se observar o biomaterial (A) em íntimo contato com o tecido ósseo neoformado (B), e ao leito receptor residual (C). Na periferia do tecido ósseo neoformado (D) foi possível observar um grande número de células compatíveis com osteoblastos dispostos em paliçada (setas azuis) sugerindo que os mesmos estão em fase de síntese de matriz. Na região abaixo do tecido ósseo do leito receptor observou-se também um tecido em íntima aposição ao leito, compatível com tecido muscular (E).

No mesmo período de 30 dias pós-operatório em uma vista mais aproximada (Figura 7) pode-se observar o íntimo contato do biomaterial (A) com o tecido ósseo neoformado (B). Observou-se também que na periferia do tecido ósseo neoformado presença de osteoblastos dispostos em paliçada (C setas azuis).

No período de 60 dias pós-operatório (Figura 8), o biomaterial (A) apresentou-se envolto por tecido ósseo neoformado (B). No interior do biomaterial pode-se observar ilhas de tecido ósseo neoformado (C), sugerindo que o biomaterial apresenta capacidade de osteocondução. Em uma vista panorâmica do corte foi possível observar que o biomaterial foi reabsorvido com perda de volume do enxerto, sugerindo que o biomaterial apresenta alta solubilidade.

No mesmo período de 60 dias pós-operatório (Figura 9), em uma vista mais aproximada pode-se observar o tecido ósseo neoformado (A) no interior do biomaterial(B). Na região mais próxima ao biomaterial notou-se a presença de células multinucleadas (C) compatíveis com osteoclastos, sugerindo que o biomaterial está sendo reabsorvido na medida em que ocorre neoformação óssea aposicional.

6. DISCUSSÃO

A reparação tecidual é um dos fenômenos mais interessantes que ocorrem nos seres vivos. Sabe-se que este não é um processo isolado, mas faz parte de uma série complexa e dinâmica de eventos biológicos. A reparação dos tecidos biológicos é considerada uma fase de reação inflamatória, uma vez que não pode ser separada dos fenômenos vasculares e celulares que ocorrem em resposta a uma agressão¹³. Devido a este fato, é de grande importância o conhecimento do funcionamento do organismo na incorporação dos biomateriais, a fim de que possam auxiliar e favorecer a região acometida de maneira adequada e eficiente durante o processo de reparação.

O enxerto ósseo autógeno apresenta um grande número de vantagens em relação aos demais materiais de enxerto, principalmente quando se compara a biocompatibilidade e o potencial regenerador¹⁴. Considerado o padrão ouro (*gold standart*) pelo seu potencial osteogênico¹⁵, apresenta também as propriedades biológicas de osteocondução e osteoindução¹⁶, promovendo estímulo e aposição de tecido ósseo a partir do osso já existente, como modelo para nova formação óssea¹⁷⁻¹⁸. Neste trabalho estas propriedades puderam ser comprovadas quando se analisou as imagens microscópicas do bloco de osso autógeno aos 60 dias pós-operatórios em que se pode observar um íntimo contato entre leito receptor e bloco enxertado com presença da linha de cimentação, presença de neoformação óssea com grande número de trabéculas ósseas, e regiões do enxerto ocupadas por novos osteócitos viáveis. Estes eventos ocorreram devido a matriz óssea induzir a diferenciação de células osteoprogenitoras na área receptora em osteoblastos para uma nova formação óssea⁴.

No presente estudo foi utilizada a tíbia do coelho como região doadora para a obtenção do enxerto autógeno devido à facilidade da técnica e por causar menor morbidade em comparação a outras áreas doadoras no coelho, como a calvária que leva a exposição da dura-máter por impossibilidade de separar a cortical externa da interna, no caso específico da técnica de cirurgia experimental em coelhos. A tíbia tem característica de ser um osso essencialmente cortical, com presença do canal medular contendo em seu interior a medula óssea. Esta área doadora pode ser utilizada para obtenção de tecido ósseo empregado principalmente na forma de

bloco, quando se deseja um ganho em espessura nas grandes reconstruções em humanos¹⁹.

No entanto, na busca da diminuição da morbidade relacionada aos procedimentos reconstrutores com o emprego do enxerto ósseo autógeno as pesquisas tem se direcionado para encontrar um biomaterial que possa substituí-lo. Dentre os vários biomateriais, as biocerâmicas sintéticas vêm ganhando espaço, e constituem uma alternativa atual para as cirurgias maxilo-mandibulares reconstrutoras²⁰⁻²².

O biomaterial empregado nesta pesquisa foi um biomaterial sintético a base de β -TCP (Grafts® BTCP, Smart Bone Substitute, Aix-En-Provence, França) que é um material sintético utilizado em diversas áreas para tratamentos cirúrgicos, sendo bem difundido e empregado na especialidade médica de ortopedia. Sua composição é de 60/40m por cento entre um componente estável HA (hidroxiapatita) e outro mais bioativo e muito absorvível, β -TCP (Beta Trifosfato de Cálcio). A composição bifásica constituída de hidroxiapatita e fosfato tricálcio (β -TCP) apresenta melhores características de osteocondução quando comparadas as cerâmicas de fase única²³.

Estudo publicado²⁴ analisou in vivo a biocompatibilidade e a biofuncionalidade das biocerâmicas de fosfato de cálcio bifásica nas substituições do tecido ósseo. Os autores puderam concluir que a hidroxiapatita e o fosfato tricálcio são progressivamente reabsorvidos e substituídos por osso novo, e também são capazes de atuar como um favorável meio para colonização de células osteogênicas. Outro estudo²⁵ comparou o β -TCP à cerâmica de fosfato de cálcio bifásica contendo HA/ β -TCP na proporção de 75/25 no processo de reparo do osso trabecular de ovelhas. A análise histomorfométrica demonstrou que 36% do β -TCP utilizado isoladamente foi reabsorvido em 26 semanas, enquanto a HA/ β -TCP se manteve intacta. A neoformação para ambos os materiais ocorreu, mas quantidades maiores de volume ósseo periférico foram observadas na cerâmica bifásica. Assim foi concluído que os dois substitutos ósseos utilizados são biocompatíveis e tem boa capacidade osteocondutora, mas a degradação do β -TCP é mais rápida à custa da dissolução e alguma atividade reabsortiva celular. Este estudo avaliou e comparou qualitativamente o biomaterial sintético a base de β -TCP em associação a hidroxiapatita na proporção de 60/40 com o enxerto ósseo autógeno. Foi possível

observar pela análise qualitativa histológica que o material foi reabsorvido com formação óssea por aposição. No entanto mesmo aos 60 dias pós-operatórios foi possível observar uma quantidade considerável do biomaterial em contato com o tecido ósseo neoformado e residual do leito receptor.

A capacidade das biocerâmicas em carrear células osteoblásticas ocorre principalmente devido as suas características estruturais. A porosidade que apresenta o biomaterial sintético a base de β -TCP é em torno de 70%. Isso permite uma grande área superficial com a presença de vários sítios de ligações proteicas viáveis na superfície gerando assim a possibilidade de um maior número de células osteoblásticas pré-inseridas no biomaterial, permitindo que esta adesão ocorra de forma mais estável²⁶. Outro fator a ser considerado é o diâmetro dos poros. Estudos têm demonstrado que arcações construídos com poros amplos e de volume acessível (>200 μm) exibem aumentada proliferação e diferenciação osteoblásticas através do material, como resultado na capacidade de transporte de oxigênio e nutrientes, bem como a revascularização²⁷⁻²⁸. Deve-se ressaltar que os poros nos materiais a base de fosfato de cálcio são necessários para formação óssea, pois eles permitem a migração e proliferação dos osteoblastos e células mesenquimais, bem como da vascularização. Em adição, uma superfície porosa melhora a interligação entre o biomaterial implantando e o ambiente ósseo circunjacente, promovendo grande estabilidade mecânica nesta crítica interface entre o biomaterial e o leito receptor²⁹.

A macroporosidade acima de 100 μm do biomaterial sintético a base de β -TCP empregado neste estudo (Grafts® BTCP, Smart Bone Substitute, Aix-En-Provence, França), é de 45% de sua composição, facilitando assim o processo de trocas biológicas necessárias para o processo de osteogênese. Entretanto, durante a cirurgia experimental realizada neste trabalho, esta porosidade levou a dificuldades de técnica durante a fixação do material de enxerto ao leito receptor por meio do parafuso cortical. Esta dificuldade acarretou num leve travamento do material de enxerto ao leito receptor, pois caso fosse exercida uma força maior de parafusamento, o bloco poderia sofrer trincos e fraturas. No entanto, devido ao cuidado durante o parafusamento do material de enxerto nenhum bloco sofreu desintegração no ato transoperatório do procedimento cirúrgico.

Estudo anterior³⁰ avaliou o beta tricálcio fosfato, em humanos como substituto ósseo para manter as dimensões alveolares para posterior tratamento com implantes. As dimensões alveolares foram mensuradas antes da enxertia e após 6 meses, bem como a amostra tecidual foi coletada antes da instalação dos implantes. O resultado observado pelos autores foi de que houve uma diminuição de apenas 9,0% quando comparado ao pré-operatório e histologicamente todo material foi reabsorvido e substituído por osso vital de boa qualidade o que permitiu um bom travamento dos implantes. Isso indica que o material apresenta ser osteocondutor, mas com alto grau de solubilidade. Embora este fato tenha sido observado também nos achados histológicos deste trabalho, ressalta-se que neste estudo o biomaterial foi empregado para ganho em espessura, ou seja, enxerto aposicional fixado por meio de parafuso cortical, e não em para preenchimento de defeitos de cavidades como alvéolo dental fresco, relatado pelo estudo anterior citado acima. Este estudo experimental proporcionou um desafio muito maior ao biomaterial comparado aos procedimentos de preenchimento no interior de cavidades.

Quando se avaliou os cortes histológicos de 30 e 60 dias pós-operatórios dos animais que receberam o biomaterial sintético a base de β -TCP pode se observar que o mesmo aparenta ser osteocondutor, no entanto, com perda de volume significativa, sugerindo um alto grau de solubilidade. Esta perda de volume é observada principalmente aos 60 dias pós-operatórios. Entretanto, ressalta-se que o biomaterial apresentou uma boa biocompatibilidade, uma vez que foi incorporado ao leito receptor sem a interposição de tecido conjuntivo fibroso frouxo, e pela neoformação óssea ao redor e no interior do biomaterial. Diante dos resultados observados o enxerto autógeno ainda é a primeira opção, e a mais recomendada para reconstruções maxilo-mandibulares devido a sua alta capacidade osteogênica.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados observados a partir das condições metodológicas experimentais deste trabalho, foi possível concluir que:

O Biomaterial sintético a base de β -TCP (Grafts® BTCP, Smart Bone Substitute, Aix-En-Provence, França) apresentou boa biocompatibilidade, e serviu de arcabouço para nova formação óssea na região enxertada. No entanto apresentou um alto grau de solubilidade devido à perda de volume por reabsorção.

REFERÊNCIAS

1. Carinci F, Guidi R, Franco M, Viscioni A, Rigo L, De Santis B, Tropina E. Implants inserted in fresh-frozen bone: a retrospective analysis of 88 implants loaded 4 months after insertion. *Quintessence Int.* 2009 May; 40(5):413-9
2. Lupovici J. Revisiting the hopeless ridge: part I--challenging the gold standard. *CompendContinEduc Dent.* 2009 Apr;30(3):130-2, 134-9; quiz 140, 154.
3. Lye KW, Deatherage JR, Waite PD. The use of desmineralized bone matrix for grafting during Le Fort I and chin osteotomies: techniques and complications. *J Oral MaxillofacSurg.* 2008, 66(8):1580-5.
4. Carvalho PSP, França MT, Bassi APF, Ponzoni D, Shibli JÁ, Bechara K. Cirurgias Reconstitutivas – Cap 8. In Carvalho & Pelizer. *Fundamentos em Implantodontia: uma visão contemporânea.* 2 Ed. Quintessence. 2016; 111-126.
5. Alexander, J.W. Bone grafting. *Veterinary clinics of north america small animal practice*, v. 17, n. 4, p.811 - 819, 1987.
6. Carvalho PSP, Violin LA, Bassi APF. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais. *Implant News.* 2004, v.1, p.255 – 260
7. Lyford RH, Mills MP, Knapp CI, et al. Clinical evaluation of freeze-dried blockallografts for alveolar ridge augmentation: a case series. *Int J Periodontics RestorativeDent.* 2003 Oct;23(5):417-25.
8. Adell R., Eriksson B., Lekholm U. et al.: Along-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 1990, 5:347-59.
9. N. Kotobuki, M. Tadokoro, K. Kawate, H. Yajima, Y. Takakura, H. Ohgushi, In vivo osteogenic capability of human mesenchymal cells cultured on hydroxyapatite and on beta-tricalcium phosphate, *Artif. Organs* 33 (2009) 474–481.
10. Aulakh, T.S., Jayasekera, N., Kuiper, J.H., and Richardson, J.B. Long-term clinical outcomes following the use of synthetic hydroxyapatite and bone graft in impaction in revision hip arthroplasty. *Biomaterials* 30, 1732, 2009.
11. Best SM, Porter AE, Thian ES, Huang JJ. Bioceramics: past, present and for the future. *EurCeram Soc* 2008;28(7):1319-27.
12. Boyne PJ, Current developments with growth factors and bone proteins. *Dent Implantol Update.* 1999 Apr; 10(4): 25-7.

13. Kumar V, Abbas A, Fausto N. Tecido de renovação e reparações: Regeneração, cicatrização e fibrose. In: Kumar V, Abbas A, Fausto N, editors. *Patologia-Bases patológicas das doenças*. Rio de Janeiro; Elsevier; 2005. p. 91-124.
14. Boyne PJ, Current developments with growth factors and bone proteins. *Dent Implantol Update*. 1999 Apr; 10(4): 25-7.
15. Sananda JT, Canova GC, Cestari TM, Taga EM, Taga R. et. al. Análise histológica, radiográfica e do perfil de imunoglobinas após implantação de enxerto de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco em músculo de rato. *J Appl Oral Sci*. 2003; 11(3):209-15.
16. Ellies LG. Altered sensation following mandibular implant surgery. A retrospective study. *J Prosthet Dent*. 1992 Oct;68(4):664-71.
17. Manso MC, Lang RD. Enxerto ósseo retro-molar "onlay" para restauração ideal do contorno do rebordo alveolar. *Rev. Bras. Implant* 1997; 5(5):7-14.
18. Misch CM. Maxillary autogenous bone grafting. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2011 May;23(2):229-38.
19. Carvalho, PSP., Lenharo, A., Mendes, V.C., Bassi A.P.F., Ponzoni, D. *Revista Brasileira de Cirurgia e Implantodontia*, v.9, n.34, p.117-123, 2002.
20. Wakimoto M, Ueno T, Hirata A, Lida S, Aghaloo T, Moy PK. Histologic evaluation of human alveolar sockets treated with an artificial bone substitute material. *J Craniofac Surg*. 2011 Mar;22(2):490-3.
21. Mardas N, D'Auito F, Mezzomo L, Arzoumanidi M, Donos N. Radiographic alveolar bone changes following ridge preservation with two different biomaterials. *Clin Oral Implants Res*. 2011 Apr;22(4):416-23.
22. Antunes AA, Oliveira Neto P, De Santis E, Caneva M, Botticeli D, Salata LA. Comparisons between Bio-Oss® and Straumann® Bone –Ceramic in immediate and staged implant placement dogs mandible bone defects. *Clin Oral Implants Res*. 2013 Feb;24(2):135-42.
23. Yuan H, Van Den Doel M, Van Blitterswijk CA, De Groot K, De Bruijn JD. A comparison of the osteoinductive potential of two calcium phosphate ceramics implanted intramuscularly in goats. *J. Mater Sci Mater Med*. 2002 Dec;13(12):1275-5.
24. Daculsi G, Jegoux F, Layrolle P. The micro macroporous biphasic calciumphosphate concept for bone reconstruction and tissue engineering. In: Basu B, Katti DS, Kumar A, editors. *Advance biomaterials: fundamentals processing and applications*. New York: Wiley-American Ceramic Society; 2009. p.101–42.
25. Bodde EW, Wolke JG, Kowalski RS, Jansen JA. Bone regeneration of porous beta-tricalcium phosphate (conduict TCP) and biphasic calcium phosphate

- ceramic(Biosel) in trabecular defects in sheep. *J Biomed Mater Res A*. 2007 Sep;82(3):711-22.
26. Zhu XD, Zhang HJ, Fan HS, Li W, Zhang XD. Effect of phase composition and microstructure of calcium phosphate ceramic particles on protein adsorption. *Acta Biomater*. 2010 Apr;6(4):1536-41.
27. Khue J, Bartl R, Frisch B, Hammer C, Jansson V, Zimmer M. Bone formation in coralline hydroxyapatite. Effects of pore size studied in rabbits. *Acta Orthop Scand*. 1994 Jun;65(3):246-52.
28. Volkmer E, Drosse I, Stangelmayer A, Stangele M, Kallukalam B, Mutschler W, Schieker M. Hypoxia in static dynamic 3D culture systems for tissue engineering of bone. *Tissue Bone Part A*. 2008 Aug;14(8):1331-40.
29. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2006 Sep;26(27):5474-91.
30. Horowitz RA, Mazor Z, Miller RJ, Krauser J, Prasad HS, Rohrer MD. Clinical evaluation alveolar ridge preservation with a beta-tricalcium phosphate socket graft. *Compend Contin Educ Dent*. 2009 Nov-dec;30(9):588-90.

FIGURAS

Figura1: Fase Cirúrgica. A: Bloco ósseo pronto para ser removido B: Instalação do bloco de osso autógeno; C: Instalação do biomaterial Graftys BCP.

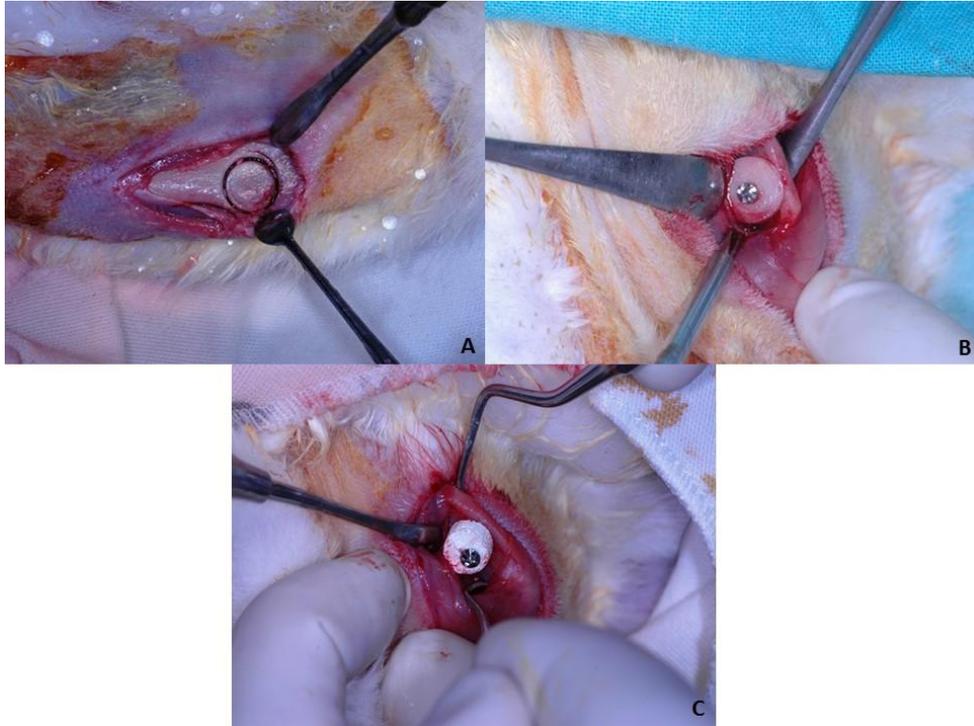


Figura 2: Grupo Autógeno 30 dias – HE 40X. A: Enxerto autógeno; B: Leito receptor; C: Interface; D: Local parafuso de fixação.

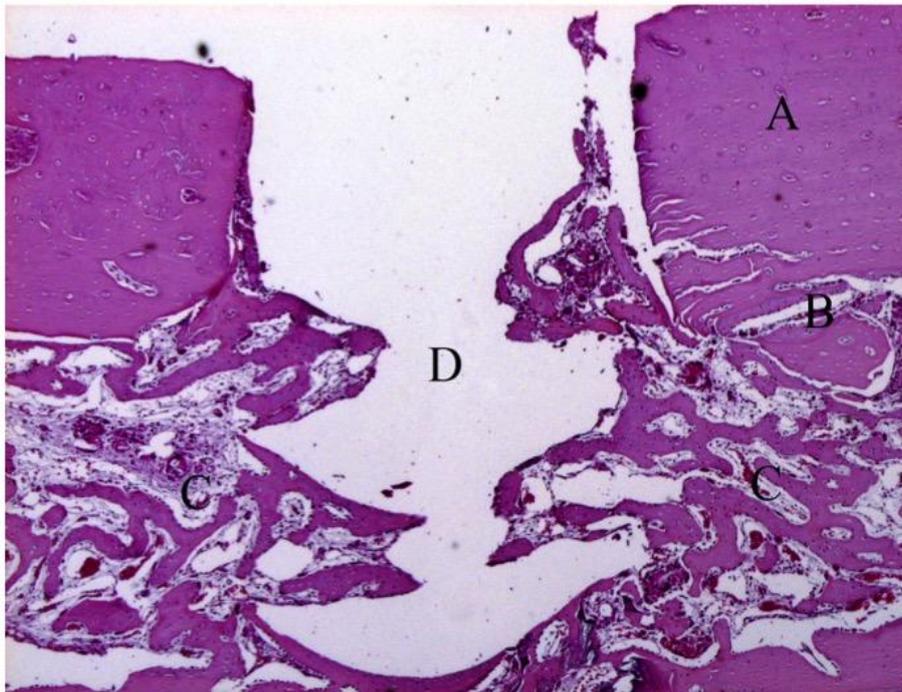


Figura 3: Grupo Autógeno 30 dias – HE 125X. A: Enxerto autógeno; B: Tecido ósseo neoformado; →Região de remodelação óssea.

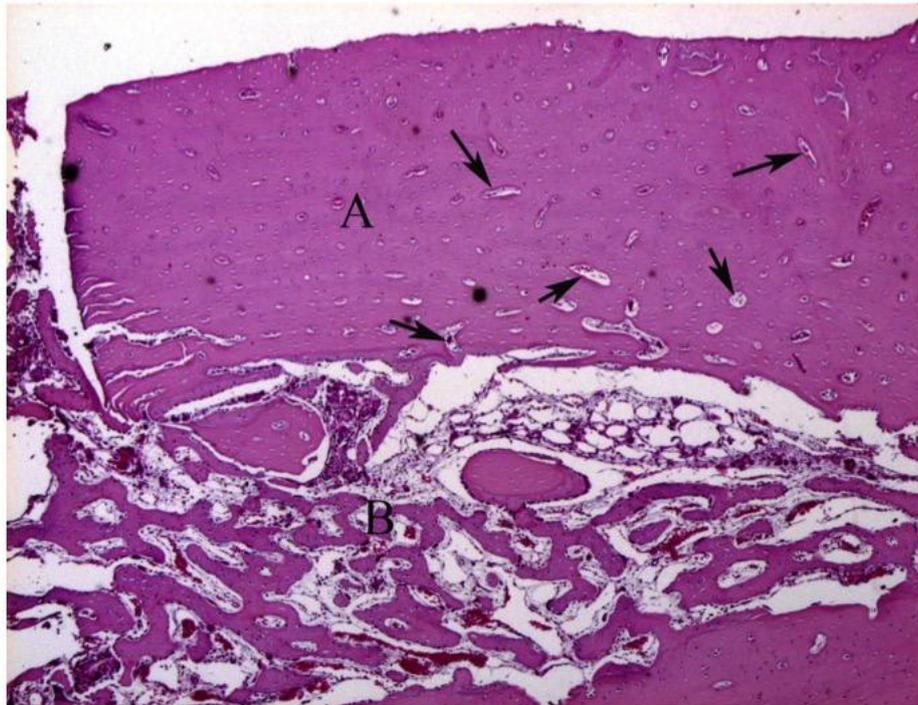


Figura 4: Grupo Autógeno 60 dias – HE 40X. A: Enxerto autógeno; B: Osso neoformado; →osteoplastos

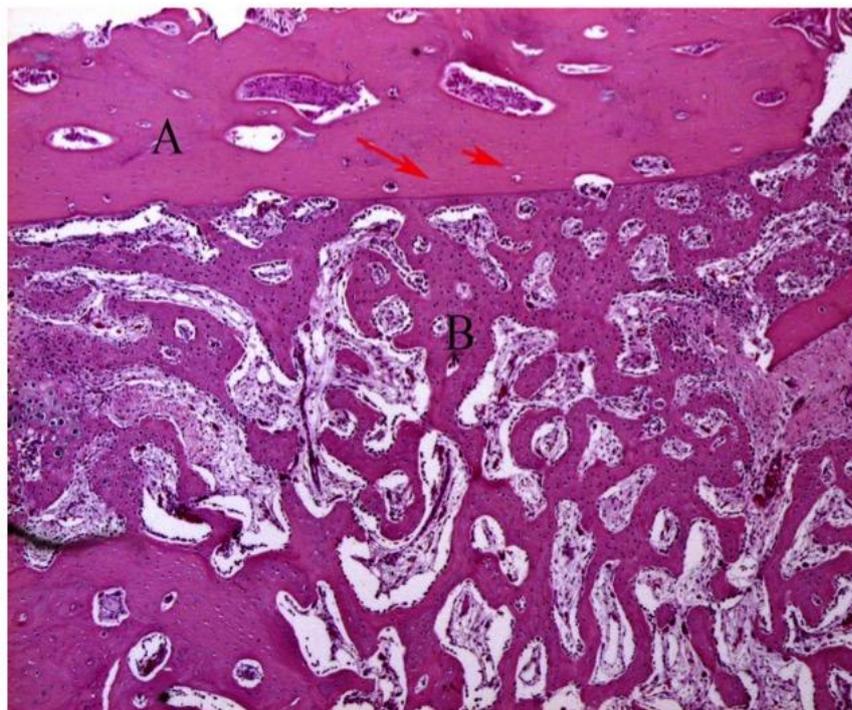


Figura 5: Grupo Autógeno 60 dias – HE 200X. A: Enxerto autógeno; B: Osso neoformado; C: Tecido Conjuntivo; → Íntimo contato entre enxerto e leito (linha de cimentação); →osteoplastos

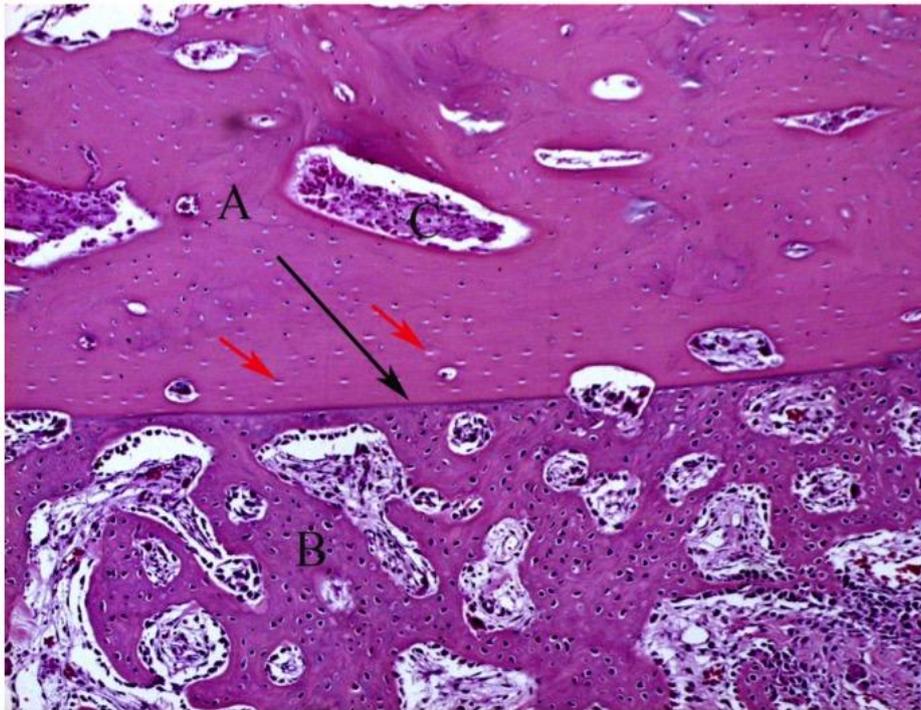


Figura 6: Grupo Biomaterial 30 dias – HE 40X. A: Biomaterial; B: Osso neoformado; C: Leito receptor residual; D: Tecido Muscular; → Osteoblastos dispostos em paliçada.

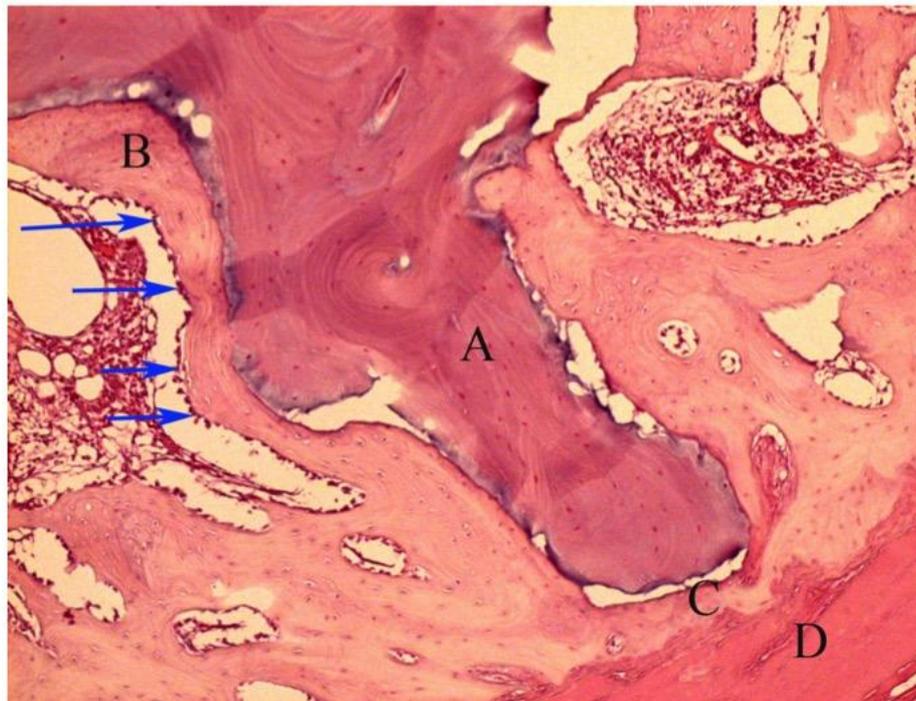


Figura 7: Grupo Biomaterial 30 dias – HE 125X. A: Biomaterial; B: Osso neoformado; → Osteoblastos dispostos em paliçada

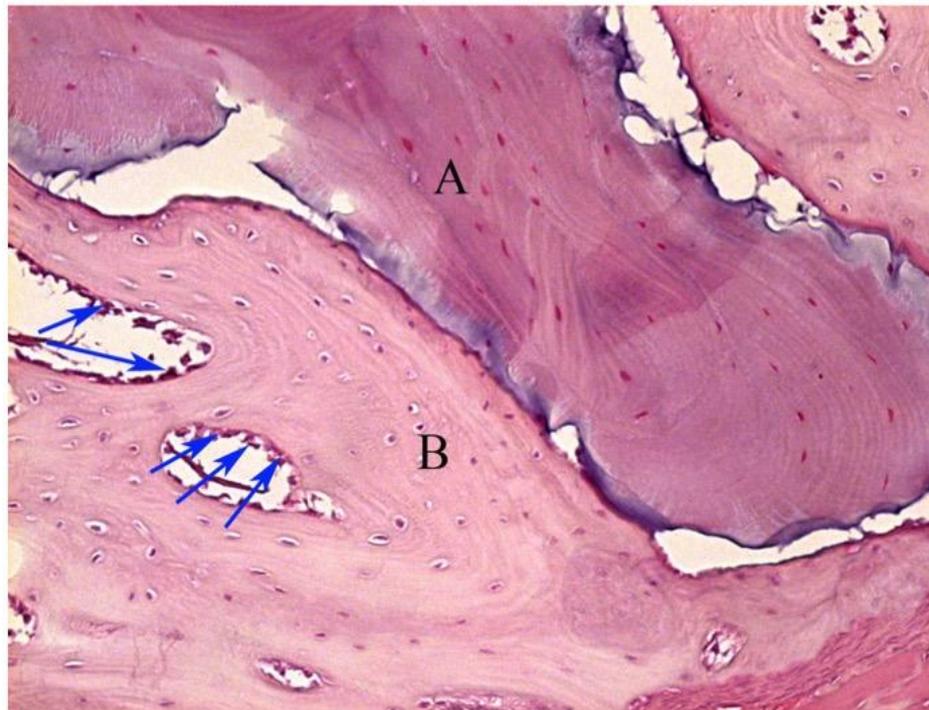
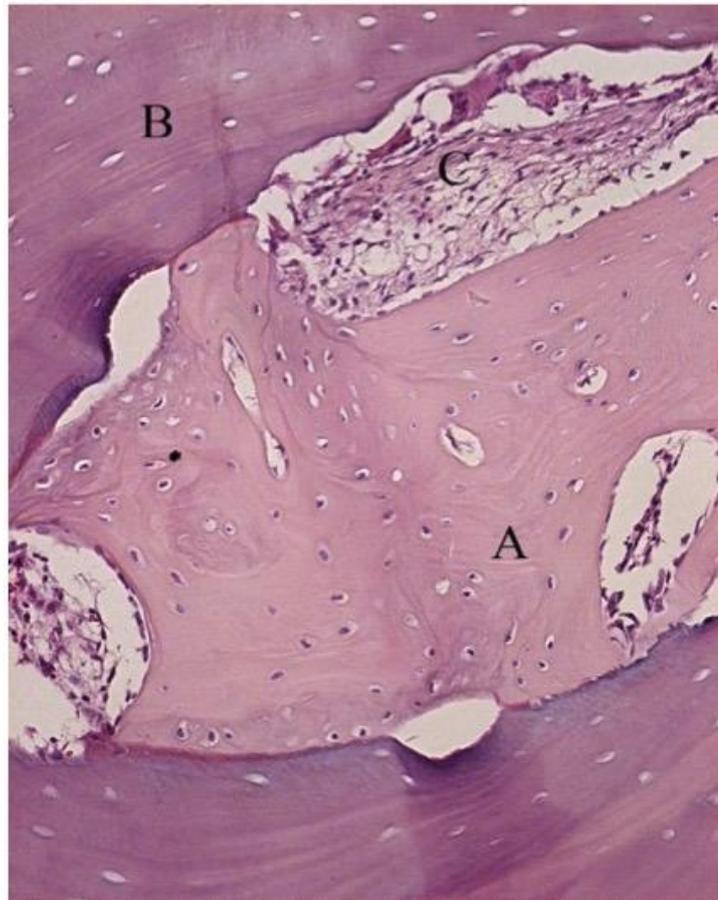


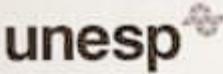
Figura 8- Grupo Biomaterial 60 dias – HE 40X. A: Biomaterial; B: Osso neoformado; C: Ilhas de tecido ósseo neoformado.



Figura 9- Grupo Biomaterial 60 dias – HE 200x. A: Ilha de tecido ósseo neoformado; B: Biomaterial; C: Tecido conjuntivo



ANEXO A – Comitê de Ética


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

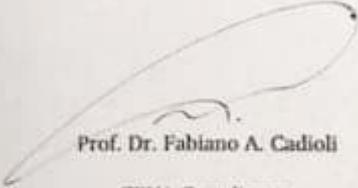
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

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

CERTIFICATE

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


 Prof. Dr. Fabiano A. Cadioli
 CEUA Coordinator

Faculdade de Odontologia e Faculdade de Medicina Veterinária – Departamento de Clínica, Cirurgia e
 Reprodução Animal – Rua Cláudio Penna, 793 CEP: 14250-600 Araçatuba – SP
 Tel: (18) 3636-1440 Fax: (18) 3636-1403 E-mail: fcadiao@cadioli@fmeda.unesp.br