

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA INTEGRADA**

FABIO ANIBAL JARA GOIRIS

**ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DAS RESPOSTAS BIOLÓGICAS APÓS
UTILIZAÇÃO DE HIDROXIAPATITA PURA (UEPG) E HIDROXIAPATITA COM
COLÁGENO (UEPG), EM CONJUNTIVO SUBCUTÂNEO DE DORSO E EM DEFEITO
CRÍTICO EM CALVÁRIA: ESTUDO EM RATOS**

**PONTA GROSSA
2017**

FABIO ANIBAL JARA GOIRIS

**ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DAS RESPOSTAS BIOLÓGICAS APÓS
UTILIZAÇÃO DE HIDROXIAPATITA PURA (UEPG) E HIDROXIAPATITA COM
COLÁGENO (UEPG), EM CONJUNTIVO SUBCUTÂNEO DE DORSO E EM DEFEITO
CRÍTICO EM CALVÁRIA: ESTUDO EM RATOS**

Tese apresentada como pré-requisito para a obtenção do título de Doutor na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de Doutorado em Odontologia – Área de Concentração: Clínica Integrada - Linha de Pesquisa: Propriedades Físico-Químicas e Biológicas de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki.

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio André dos Santos.

**PONTA GROSSA
2017**

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

G615 Goiris, Fabio Anibal Jara
Análise histomorfométrica das respostas biológicas após utilização de Hidroxiapatita pura (UEPG) e Hidroxiapatita com colágeno (UEPG), em conjuntivo subcutâneo de dorso e em defeito crítico em calvária: estudo em ratos/ Fabio Anibal Jara Goiris. Ponta 130f.

Tese (Doutorado em Odontologia - Área de Concentração: Clínica Integrada), Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientador: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki.

1.Biomateriais. 2.Hidroxiapatitas. 3.Biocompatibilidade. 4.Neoformação óssea. I.Otuki, Michel Fleith. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Doutorado em Odontologia. III. T.

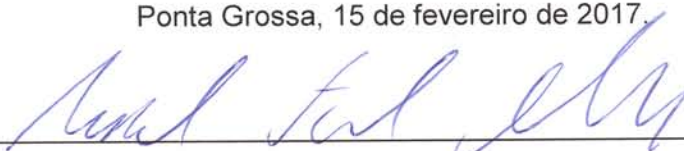
CDD: 617.695

FÁBIO ANIBAL JARA GOIRIS

Análise histomorfométrica das respostas biológicas após utilização de hidroxiapatita pura (UEPG) e hidroxiapatita com colágeno (UEPG), em conjuntivo subcutâneo de dorso e em defeito crítico em calvária: estudo em ratos.

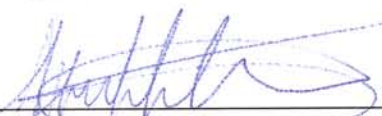
Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto sensu em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração em Clínica Integrada, linha de pesquisa de Propriedades Físico-Químicas e Biológicas de Materiais.

Ponta Grossa, 15 de fevereiro de 2017.



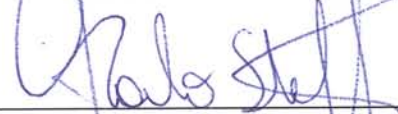
Prof. Dr. Michel Fleith Otuki

Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Humberto Schwartz

Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. João Paulo Steffens

Universidade Federal do Paraná



Prof^a. Dr^a. Giovana Mongruel Gomes

Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. Douglas Augusto Roderjan

Universidade Estadual de Ponta Grossa

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG - pela oportunidade de tornar-me aluno de graduação, aluno de pós-graduação e professor desta instituição. Agradeço ao Prof. Galbas Augusto Knechtel, *in memoriam*, primeiro professor da Disciplina de Periodontia da UEPG, por ter me incentivado e apoiado para aceder como docente dessa especialidade.

À Fundação Araucária – Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná – pelo financiamento de grande parte desta pesquisa mediante Convênio nº 374/2012 com a Universidade Estadual de Ponta Grossa e contemplada no *Programa Universal – Pesquisa Básica e Aplicada* - Chamada de Projetos 05/2011 – Ciência da Saúde, Periodontia.

Ao meu orientador professor Michel Fleith Otuki, importante pesquisador com Produtividade Sênior da área de bioquímica, pela lealdade e constância de, mesmo já sendo professor da UFPR, continuar com o seu papel de orientador até este momento final da defesa da tese de doutorado.

Ao professor Fábio André dos Santos, destacado pesquisador do Programa de Pós-Graduação da UEPG que envolve a Periodontia pela orientação segura no desenvolvimento das experimentações com animais de laboratório e nos rumos que seguiu a parte estatística deste trabalho.

À professora Sandra Regina Masetto Antunes do Departamento de Química da UEPG pela contribuição fundamental não apenas para o desenvolvimento de novos biomateriais, como as hidroxiapatitas que foram o objeto deste trabalho, mas, pela atenção sempre cordial e as orientações permanentes para que a pesquisa pudesse conseguir estes resultados.

Ao professor Edson Durval Menezes Alves, implantodontista, pelo acompanhamento do trabalho e o facilitamento de instrumentos, dispositivos, aparelhos e biomateriais que fizeram possível o desenvolvimento e a finalização desta pesquisa.

Ao professor Eduardo Campagnoli, da UEPG, pelas orientações na análise e interpretação dos resultados originados a partir das lâminas histológicas em hematoxilina e eosina.

Aos amigos e alunos do curso de graduação da UEPG – Aline, Érika, Matheus Tadao, Lucas Takeo, Roberto e João – pelo trabalho prático experimental em mais de uma centena de ratas Wistar; desde o estudo piloto até a última eutanásia. Saliente-se que não se verificou nenhuma morte dos animais, nem durante e nem após a complexa experiência cirúrgica, o que revela o extremo cuidado dos participantes quanto aos princípios éticos da experimentação animal.

A todos os que de alguma forma e de diferentes maneiras tornaram possível a conclusão desta pesquisa.

Muito Obrigado!!!

“Jamais chegaremos a dominar completamente a natureza; nosso corpo, como parte dela, sempre será algo transitório e limitado em sua capacidade de adaptação. Mas este raciocínio não deve ser desanimador; pelo contrário, pode apontar a direção e o sentido de nossas percepções e atividades”.

Sigmund Freud

Do seu livro ‘O mal-estar na cultura’, 1930.

DADOS CURRICULARES

Fabio Anibal Jara Goiris

Nascimento	Pedro Juan Caballero, Paraguai.
1977 – 1980	Graduação em Odontologia na Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG
1983 – 1984	Especialização em Periodontia na Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
1989 – 1991	Mestrado em Periodontia na Universidade de São Paulo – USP. Bolsa de estudos/Capes
1996 – 1997	Especialização em Prótese Dentária na Associação Brasileira de Odontologia – ABO de Curitiba, Paraná.
1997-1999	Mestrado em Ciência Política pelo Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS. Bolsa de estudos/Capes
2001-2002	Curso de Pós-Graduação em Sociologia Política na Universidade de Londres - <i>Institute of Education</i> –, Inglaterra. Bolsa de estudos SETI/Paraná
2004–2005	Aperfeiçoamento em Implantodontia no Instituto Latino de Pesquisa e Ensino Odontológico – ILAPEO e Universidade Tuiuti, Curitiba, Paraná
2005-2009	Graduado em Direito pela Faculdade de Direito do Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais – CESCAGE - de Ponta Grossa, Pr.
1994	Professor Assistente da Disciplina de Periodontia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, com carga horária de 40 horas
2003	Professor da Disciplina de Periodontia II do Curso de Odontologia do Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais – CESCAGE - de Ponta Grossa, Pr.

Goiris FAJ. Análise histomorfométrica das respostas biológicas após utilização de hidroxiapatita pura (UEPG) e hidroxiapatita com colágeno (UEPG), em conjuntivo subcutâneo de dorso e em defeito crítico em calvária: estudos em ratos. [Tese]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2017.

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar *in vivo* dois novos biomateriais de substituição óssea - hidroxiapatita pura e hidroxiapatita com colágeno - visando determinar a sua biocompatibilidade em tecidos moles e a sua capacidade de possibilitar a neoformação óssea em defeitos críticos em calvária de ratas. As duas formas de hidroxiapatitas sintéticas – Hidroxiapatita pura (HaP) e Hidroxiapatita com colágeno (HACol) - foram desenvolvidas pelo departamento de Química da Universidade Estadual de Ponta Grossa. A terceira hidroxiapatita sintética utilizada como elemento de comparação foi a hidroxiapatita comercial *Alobone®* (HaAl), disponível no mercado brasileiro. O experimento 1 realizado em conjuntivo de dorso de animais, utilizou 45 ratas fêmeas da espécie Wistar, divididos aleatoriamente em três grupos de 15 (HaP, HaCol e HaAl) e que sofreram eutanásia aos 7, 15 e 30 dias do pós-operatório. O exame histomorfométrico aos 30 dias verificou-se ausência do infiltrado característico de células inflamatórias e presença de fibras colágenas não inflamatórias. Estes resultados significam biocompatibilidade dos materiais implantados. O Experimento 2 utilizou 60 ratas Wistar divididos aleatoriamente em 4 grupos (Grupo 1, HaP; Grupo 2 HaCol, Grupo 3 HaAl) e Grupo 4, Controle). Realizaram-se defeitos críticos de 8 mm em calvária e a seguir colocaram-se os três tipos de biomateriais. Todos os grupos receberam também membrana de colágeno. Aos 30 dias, observou-se praticamente uma ausência da resposta inflamatória no local do defeito em todos os grupos, especialmente quando comparado ao período de 7 dias. Verificaram-se áreas de neoformação óssea. Houve predominância de osteoblastos, osteócitos e macrófagos em menor quantidade. No aspecto radiográfico, em 30 dias, a nossa pesquisa confirmou uma marcada biodegradação das hidroxiapatitas e sinais de neoformação óssea. Os resultados histomorfométricos da implantação de hidroxiapatitas sintéticas demonstraram a ocorrência de uma ossificação intramembranosa a partir do tecido de granulação com a participação de macrófagos ósseo-residentes. É possível concluir que os resultados dessa pesquisa podem ser utilizados como recurso preliminar de informações sobre biocompatibilidade, biodegradabilidade e neoformação óssea a partir da implantação de novos biomateriais *in vivo*.

Palavras-chave: Biomateriais, hidroxiapatitas, biocompatibilidade, neoformação óssea.

FAJ Goiris. Histomorphometric analysis of biological responses following the use of pure hydroxyapatite (UEPG) and hydroxyapatite with collagen (UEPG), in subcutaneous dorsal connective tissue and in critical defects in calvaria: studies in rats. [Thesis]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2017.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate *in vivo* two new biomaterials for bone substitution – pure hydroxyapatite and collagen hydroxyapatite – aiming at determining their biocompatibility in soft tissues and their ability to enable bone neoformation in critical size defects in rats' calvaria. Both types of synthetic hydroxyapatite were developed by the Chemistry department of the State University of Ponta Grossa – Pure hydroxyapatite (HaP) and Hydroxyapatite with collagen (HCol). The third synthetic hydroxyapatite used as a comparing element was the commercial hydroxyapatite *Alobone*® (HaAl), which is available in the Brazilian market. Experiment 1 was carried out with the animals' dorsal connective tissue and used 45 Wistar female rats, divided randomly into three groups of 15 animals each (HaP, HaCol and HaAl) which were euthanized after 7, 15 and 30 days of operation. The histomorphometric exam after 30 days revealed the absence of inflammatory cell characteristic infiltrates and the presence of non-inflammatory collagen fibers. These results show the biocompatibility of the material implanted. Experiment 2 used 60 Wistar rats divided randomly into 4 groups (Group 1, HaP; Group 2, HaCol; Group 3, HaAl and Group 4, Control). Critical size defects of 8mm were performed in the calvaria and the three biomaterials were implanted. All groups also received collagen membrane. On day 30, inflammatory response on the defect was practically absent in all groups, mainly when compared to the period of 7 days. Some areas of bone neoformation were seen. There was predominance of osteoblasts, osteocytes and macrophages in lower amount. Regarding the radiographic aspect, after 30 days our study confirmed a marked biodegradation of the hydroxyapatite and signs of bone neoformation. The histomorphometric results of the synthetic hydroxyapatite implant demonstrated the probable occurrence of intramembranous ossification from the granulation tissue with the presence of bone-resident macrophages. It was possible to conclude that the results of our study *in vivo* can be used as a preliminary source of information about biocompatibility, biodegradability and bone neoformation from the implant of new biomaterials *in vivo*.

Keywords: Biomaterials, hydroxyapatites, biocompatibility, new bone formation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Esquema 1	- Divisão dos animais da pesquisa em 3 grupos, com 15 animais em cada.....	25
Esquema 2	- Obtenção de amostras do dorso dos animais após eutanásia: duas amostras por animal, experimental e controle.....	26
Esquema 3	- Os 60 animais da pesquisa foram divididos em 4 grupos, com 15 animais em cada.....	32
Figura 1	- Hidroxiapatita Pura (HaP), micrografia do MEV.....	20
Figura 2	- Hidroxiapatita Pura (HaP), micrografia do MEV e EDS.....	20
Figura 3	- Hidroxiapatita Pura (HaP), difração de raios-X.....	21
Figura 4	- Hidroxiapatita com colágeno (HaCol), micrografia do MEV.....	22
Figura 5	- Hidroxiapatita com colágeno (HaCol), MEV e EDS.....	22
Figura 6	- Hidroxiapatita comercial Alobone (HaAl), micrografia do MEV.....	23
Figura 7	- Hidroxiapatita comercial Alobone (HaAl), MEV e EDS.....	23
Figura 8	- Hidroxiapatita comercial Alobone (HaAl), difração de raios-X.....	24
Figura 9	- Anestesia geral intraperitoneal (IP) de <i>Rattus norvegicus albinus</i>	26
Figura 10	- Animais submetidos a tricotomia.....	27
Figura 11	- Procedimentos de anisepsia nos animais tricotomizados.....	27
Figura 12	- Incisão e divulsão realizadas por meio de uma tesoura de ponta romba	28
Figura 13	- Colocação do biomaterial com porta-amálgamas de metal	29
Figura 14	- Animais já suturados no dorso iniciam a recuperação em gaiolas específicas.....	29
Figura 15	- Pesquisa em calvária, após a anestesia geral intraperitoneal realizou-se a tricotomia da região fronto-parietal.....	34
Figura 16	- Delimitação com lápis de uma área triangular e colocação de pequenas quantidades de anestésico no tecido para hemostasia local.....	34
Figura 17	- Retalho total triangular e início da osteotomia mediante broca de trefina de 8mm de diâmetro.....	34
Figura 18	- Defeito ósseo crítico em calvária realizado com trefina em fase de conclusão.....	34
Figura 19	- Defeito ósseo em calvária realizado com trefina e sob intensa irrigação com soro fisiológico.....	35
Figura 20	- Defeito ósseo concluído. Dura-máter intacta sob o defeito ósseo.....	35
Figura 21	- Barreira física colocada sobre o defeito crítico consistiu de uma membrana de colágeno reabsorvível - <i>Heli Tape</i> ®	35
Figura 22	- As hidroxiapatitas hidratadas de 0,30 mg colocadas no defeito crítico.....	36
Figura 23	- Colocação de membrana de colágeno <i>HeliTape</i> ® (<i>Absorbable Collagen Wound Dressing</i>) sobre o biomaterial.....	36
Figura 24	- Técnica da sutura com fio de seda utilizada para a fixação do retalho total.....	37

Figura 25	- Sutura concluída. Observa-se a intensa irrigação e lavagem da região operada para evitar que os animais exalem odor a sangue.....	37
Figura 26	- Tábuas ósseas corticais de 8 milímetros de diâmetro removidas da calvária de ratas mediante osteotomia com broca trefina.	37
Figura 27	- Biópsia de calvária de rata onde se observa a pele do animal e, portanto, corresponde à parte do periósteo (anverso).....	39
Figura 28	- A mesma biópsia, mas do lado interno da cortical óssea (reverso); o endósteo, que contata com a dura-máter.....	39
Figura 29	- Tecido biopsiado e submetido a descalcificação por 21 dias, mediante ação do EDTA a 7% em água destilada.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMPs	Proteínas morfogenéticas ósseas
BTE	<i>Bone Tissue Engineering</i> – Engenharia de tecido ósseo
CSD	<i>Critical Size Defects</i> - Defeitos de tamanho crítico
DRX	Difratometria de raios X
ECM	<i>Extracellular Matrix</i> - Matriz extracelular
EDS	<i>Energy Dispersive x-ray Spectroscopy</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FGF	Fator de Crescimento derivado de Fibroblastos
Ha	Hidroxiapatita
HaP	Hidroxiapatita Pura
HaCol	Hidroxiapatita com colágeno
HaAl	Hidroxiapatita comercial Alobone
HE	Hematoxilina e Eosina
Il 1	Interleucina 1
Il 6	Interleucina 6
IP	Anestesia geral intraperitoneal
MCSF ou CSF1	Fator Estimulador da Colônia de Macrófagos
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MSC	Células-tronco Mesenquimais
nHAp	<i>Nanocrystalline hydroxyapatite</i>
OPG	Osteoprotegerina
OsteoMacs	Macrófagos do tecido ósseo
PDGF	Fator de Crescimento derivado de Plaquetas
PVPI	Povidona-iodo
PMNs	Polimorfonucleares neutrófilos
RANK	Receptor para RANK-L expresso em osteoclastos
RANK-L	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i> , é um ligante para o receptor RANK, expresso em osteoblastos
<i>Restitutio ad integrum</i>	Regeneração completa do tecido afetado
RTG	Regeneração Tecidual Guiada
TCP	Fosfato tricálcico
TNF α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

1	INTRODUÇÃO	13
2	PROPOSIÇÃO	18
2.1	Proposição Geral.....	18
2.2	Proposições Específicas.....	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1	Experimento 1 - Análise histomorfométrica das respostas biológicas após utilização de hidroxiapatita pura e hidroxiapatita com colágeno: estudo em conjuntivo subcutâneo de dorso de ratas.....	19
3.1.1	Obtenção e caracterização dos biomateriais.....	19
3.1.2	Análise da biocompatibilidade.....	24
3.1.3	Procedimento cirúrgico e cuidados pós-operatórios.....	25
3.1.4	Obtenção das biópsias e preparo histotécnico.....	29
3.1.5	Procedimento histotécnico e Análise histomorfométrica.....	30
3.1.6	Análise estatística.....	30
3.2	Experimento 2 - Análise histomorfométrica das respostas biológicas após utilização de hidroxiapatita pura e hidroxiapatita com colágeno: estudo em modelo de defeito crítico em calvaria de ratas.....	31
3.2.1	Procedimentos cirúrgicos e cuidados pós-operatórios.....	33
3.2.2	Obtenção das biópsias e preparo histotécnico.....	38
3.2.3	Procedimento histotécnico e Análise histomorfométrica.....	40
3.2.4	Análise radiográfica.....	40
3.2.5	Análise estatística.....	42
3.2.5.1	Análise histomorfométrica.....	42
4	ARTIGO 1 - Histomorphometric analysis of biological responses following the use of pure hydroxyapatite and hydroxyapatite with collagen: a study in subcutaneous dorsal tissue of rats	43
5	ARTIGO 2 - Histomorphometric analysis of biological responses following the use of pure hydroxyapatite and hydroxyapatite with collagen: a study in a rat critical-size calvarial defect model	78
6	DISCUSSÃO	99
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	114
	REFERÊNCIAS	116
	ANEXO A – TERMO DE APROVAÇÃO DO PROJETO NA COMISSÃO DE ÉTICA	130

1 INTRODUÇÃO

Os biomateriais compreendem uma representativa fração de produtos utilizados na área da saúde humana. Dentre eles, podem ser citados os dispositivos biomédicos (tubos de circulação sanguínea, sistemas de hemodiálise, biossensores), materiais implantáveis (substitutos ósseos, suturas, placas, tendões, telas, válvulas cardíacas, lentes), dispositivos para a liberação de medicamentos (na forma de filmes, implantes subdérmicos e partículas), órgãos artificiais (coração, rim, fígado, pâncreas, pulmões, pele), dentre muitos outros (Pires et al.¹ 2015).

O conceito de biomaterial envolve a utilização em áreas de saúde de materiais desenvolvidos com a finalidade de substituir elementos vivos que perderam sua função. Inclui qualquer substância sintética ou natural que pode ser usada como tratamento para substituição total ou parcial de tecidos e órgãos. Constatou-se um enorme crescimento no mercado mundial de biomateriais e, no Brasil, grande parte destes é importada, gerando grandes custos aos cofres públicos, como se verifica no Sistema Único de Saúde - SUS (Soares² 2006).

A aplicação de substitutos nas lesões ou defeitos que comprometem o tecido ósseo humano tem sido objeto de intensa pesquisa, especialmente a partir do encontro organizado em Genebra pela OMS em 2000: 'Década do Osso e da Articulação', onde a efetivação da multidisciplinariedade procurou ultrapassar as limitações e complicações decorrentes das substituições e enxertias ósseas (Kawachi et al.³ 2000).

Incorporando a designação de engenharia tecidual ou, mais especificamente, Engenharia de Tecido Ósseo (*Bone Tissue Engineering – BTE* - Amini, Laurencin, Nukavarapu⁴ 2012) a pesquisa, especialmente na Periodontia e na Implantodontia, vem desenvolvendo também o uso da terapia celular como alternativa para as técnicas regenerativas. Nesse modelo, procurou-se modular a resposta tecidual do hospedeiro; ou por meio da utilização de biomateriais, isoladamente ou mediante implantação *in vivo* de células cultivadas *in vitro* e transportadas em materiais carreadores, dentre os quais se incluíram o colágeno e a hidroxiapatita.

Suaid et al.⁵ (2009) assinalaram que a idoneidade clínica dos biomateriais de substituição óssea deve incluir não apenas suas propriedades de mantenedor de espaços e de biocompatibilidade, mas também a sua capacidade de interagir com as

células transportadas, podendo estimular a expressão gênica das mesmas. A cultura e o armazenamento de células mesenquimais indiferenciadas (MSC), como aquelas oriundas do ligamento periodontal, poderão sofrer reimplantes em defeitos ósseos, auxiliados por carreadores específicos e moléculas moduladoras (Citocinas e Fatores de Crescimento).

Nesse sentido, o uso de novas tecnologias capazes de manipular a matéria em escala nanométrica poderá permitir uma nova geração de biomateriais que poderão substituir os próprios enxertos de osso autógeno. As futuras gerações de biomateriais (terceira geração) serão concebidas para serem não apenas osseocondutoras, mas também osseoindutoras, visando estimular a regeneração tecidual combinando engenharia de tecidos e métodos de regeneração molecular *in situ* (Henkel et al.⁶ 2013).

Dentre os materiais osseocondutores contemporâneos estão as biocerâmicas, que podem ser de origem natural ou sintética. São naturais as hidroxiapatitas (HA) obtidas a partir de estruturas de coral ou de matriz mineral de osso bovino. Dentro da classe dos sintéticos, destacam-se aqueles à base de *fosfato de cálcio*: fosfato tricálcico (TCP), hidroxiapatita (HA) e fosfatos de cálcio bifásicos (hidroxiapatita e TCP) (Gutierrez, Lopes, Hussain⁷ 2006).

De acordo com Jensen et al.⁸ (2009), a hidroxiapatita apresentou uma reabsorção lenta, ao contrário do fosfato tricálcico (TCP), podendo manter-se no organismo durante anos. Em razão de guardar grande semelhança com os fosfatos de cálcio encontrados na fase de mineralização do osso, a aplicação da hidroxiapatita se generalizou não apenas na reparação óssea, mas, inclusive no preenchimento de cavidades ósseas pós exérese de tumores. A hidroxiapatita é utilizada também no recobrimento de metais como tratamento de superfície dos implantes de osseointegração visando melhorar a união bioativa através de uma camada de apatita similar à do osso vivo haversiano.

A hidroxiapatita em estado puro é um sal duplo de fosfato tricálcico e hidróxido de cálcio, cuja composição estequiométrica é definida - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; sendo sua célula unitária uma representação completa do cristal de apatita. A parte orgânica do tecido ósseo humano consiste numa fase amorfa (que predomina em ossos novos) e uma fase cristalina. A primeira é composta de fosfato tricálcico enquanto que a última de hidroxiapatita. As apatitas biológicas, que compõem as

fases minerais dos tecidos calcificados (esmalte, dentina e ossos) e algumas calcificações patológicas (cálculo dentário e pedras salivares e urinárias) são geralmente referidas como hidroxiapatitas cálcio (Shi, Jiang, Wen, 2000⁹, Dorozhkin¹⁰ 2013).

Em razão da sua similaridade química com a fase mineral dos tecidos ósseos, a hidroxiapatita é um dos materiais cerâmicos conhecidos mais biocompatíveis, fenômeno já observado desde 1926 (De Jong et al.¹¹ 1926), mediante pesquisas em padrões de difração de raios X. A hidroxiapatita é capaz de favorecer e direcionar o crescimento ósseo para os locais onde ela se encontra (osseocondutor), estabelecendo ligações de natureza química entre ela e o tecido ósseo (bioatividade) e permitindo a proliferação de fibroblastos, macrófagos e osteoblastos, entre outras células, para viabilizar a neoformação tecidual (Notodihardjo et al.¹² 2012).

Autores como Dong et al.¹³ (2001), Cancian et al.¹⁴ (2004), Cruz et al.¹⁵ (2008) e Xiong et al.¹⁶ (2015) assinalaram que há um crescente aumento do número de materiais cerâmicos utilizados como biomateriais de substituição óssea devido, principalmente, às limitações dos enxertos ósseos autógenos (que podem ser obtidos apenas em pequenas quantidades) e alógenos (por apresentarem riscos antigênicos potenciais de transmissão de doenças em cirurgias que envolvem enxertia óssea). O material *autógeno* é obtido de área doadora do próprio indivíduo; o *alógeno*, obtido de um indivíduo e enxertado em outro indivíduo da mesma espécie (receptor); os *xenógenos*, obtidos de espécies diferentes do receptor, bovinos, por exemplo, e, finalmente, os *aloplásticos*, que podem ser de natureza metálica, cerâmica como a hidroxiapatita ou polimérica como o colágeno e a quitosana.

Nos experimentos *in vitro*, procurou-se avaliar especialmente a citotoxicidade do biomaterial, além de aferir o comportamento da superfície dos materiais na presença de fluidos corpóreos e/ou de substâncias orgânicas, como proteínas e enzimas (Kokubo, Kim, Kawashita¹⁷ 2003). Considerando a existência de um controle cada vez mais rigoroso sobre o uso de animais de laboratório, surgiu a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de dispositivos, principalmente aqueles de aplicação clínica, como os biomateriais, que não devem causar reações adversas e nem lesar o organismo do animal e obviamente do paciente. Nesse sentido, Rogero, Braga e Higa¹⁸ (1999)

avaliaram *in vitro* a citotoxicidade de biocerâmicas de fosfato de cálcio através de um método de contagem de células, usando cultura de células de ovário de Hamster em contato com extratos diluídos de biocerâmicas. Os resultados mostraram que entre pirofosfato de cálcio, hidroxiapatita sintética e hidroxiapatita proveniente de osso de boi, apenas este último apresentou efeito citotóxico. Diversas pesquisas, com diferentes metodologias, estudaram *in vitro* a hidroxiapatita analisando suas propriedades mecânicas e de biocompatibilidade (Li et al.¹⁹ 2008, Chen et al.²⁰ 2012, Zhang et al.²¹ 2013).

Os ensaios *in vivo* realizados mediante a utilização de diferentes espécies e linhagens de animais de laboratório, principalmente em tecido conjuntivo subcutâneo e em tecido ósseo, demonstraram que os biomateriais, particularmente os compostos de fosfato de cálcio, apresentaram um comportamento biocompatível por não ter havido, em geral, qualquer indício de rejeição do implante de biomaterial ou de excessiva reação inflamatória (Gregghi, Campos Junior²² 1994, Dong et al.¹³ 2001, Cancian et al.¹⁴ 2004, Nishikawa et al.³⁰ 2005, Cruz et al.¹⁵ 2008, Santos et al.²³ 2008, Jin et al.²⁴ 2012, Hyeong-ho et al.²⁵ 2012, Adam et al.²⁶ 2014, Xiong et al.¹⁶ 2015).

As experimentações *in vivo* utilizando animais de laboratório predominam no conjunto de estudos com biomateriais, geralmente identificadas como experimentações básicas ou pré-clínicas. Estas investigações são necessárias não apenas visando futuras aplicações em humanos, mas pelo fato de proporcionarem dados biológicos decisivos, especialmente sobre novos materiais para especialidades odontológicas como endodontia, periodontia, implantodontia e cirurgia buco-maxilo-facial.

Da mesma forma, as pesquisas clínicas com hidroxiapatita incluindo diferentes regiões do corpo humano (Puricelli²⁷ 2002, Jensen, Terheyde²⁸ 2009) também demonstraram a capacidade osseocondutora da hidroxiapatita. Em geral a hidroxiapatita, no tecido humano, particularmente a de conformação densa, tem relação bioativa direta com o osso, pouca reabsorção e as fibras colágenas que se formam em torno do biomaterial são saudáveis e densas, apenas apresentando uma orientação preferencialmente paralela à perpendicular (Oguchi et al.²⁹ 1995).

Esta pesquisa *in vivo*, realizada em ratas, especificamente em tecido conjuntivo subcutâneo e em defeitos ósseos em calvária, mediante análise

histomorfométrica, teve por objetivo analisar o comportamento biológico de duas formas de hidroxiapatitas sintéticas desenvolvidas pelo departamento de Química da Universidade Estadual de Ponta Grossa, hidroxiapatita pura (HaP) e hidroxiapatita com colágeno (HaCol) e compará-las a uma hidroxiapatita já existente no mercado - Alobone® (Conz et al.³¹ 2010).

A utilização em nossa pesquisa do composto de hidroxiapatita pura mais colágeno (HaCol) apresentaria a vantagem de que os polímeros naturais como a gelatina, o alginato e a quitosana podem minimizar tanto a toxicidade do biomaterial em estado puro como a própria inflamação crônica. Além disso, o colágeno é um polímero natural de alta biocompatibilidade, pouco irritante ao organismo e facilmente biodegradável (Zhao et al.³² 2015).

A escolha do Alobone® - HaAl- (Conz et al.³¹ 2010), como elemento de comparação, obedece ao fato de ser um biomaterial de fácil aquisição e já existente no mercado brasileiro desde 2010. De acordo com os autores, trata-se de uma hidroxiapatita pura, porosa e totalmente sintética (Conz, Granjeiro, Soares³³ 2005 Conz et al.³¹ 2010), características que a aproximam bastante do biomaterial produzido pela UEPG. Outras hidroxiapatitas importadas, como o Bio-Oss®, não são sintéticas, mas de origem bovina (Polimeni, Xiropaidis, Wikesjö³⁴ 2006). De outra parte, a bibliografia sobre a hidroxiapatita Alobone® é bastante reduzida (Conz, Granjeiro, Soares³³ 2005, Almeida Mourão et al.³⁵ 2015, Bassols Machado et al.³⁶ 2012, Dias et al.³⁷ 2014), o que restringe os resultados sobre a sua biocompatibilidade e capacidade de osseocondução. Contudo, este material vem sendo utilizado em seres humanos.

Assim, o objetivo desta pesquisa consistiu em avaliar *in vivo* dois novos biomateriais de substituição óssea produzidos pelo Departamento de Química da UEPG – hidroxiapatita pura e hidroxiapatita com colágeno – visando determinar a sua biocompatibilidade em tecidos moles (conjuntivo subcutâneo de dorso de ratas) e a sua capacidade de possibilitar a neoformação óssea, em defeitos críticos de 8 mm em calvária de ratas.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Proposição geral

- Avaliar através de experimentos *in vivo* o comportamento biológico – biocompatibilidade - de duas novas hidroxiapatitas, como materiais de substituição óssea, produzidas pelo Departamento de Química da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG

- Avaliar através de experimentos *in vivo* a capacidade osseocondutora de duas hidroxiapatitas sintéticas, entendidas como materiais de substituição óssea, produzidas pelo Departamento de Química da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG

2.2 Proposições específicas

Avaliar através de experimentos *in vivo* e mediante análise histomorfométrica a biocompatibilidade de dois biomateriais, hidroxiapatitas sintéticas produzidas pela UEPG, que foram implantadas em conjuntivo subcutâneo de dorso de 45 ratas da espécie Wistar, divididas aleatoriamente em três grupos de 15 animais.

Avaliar através de experimentos *in vivo* e mediante análise histomorfométrica a capacidade osseocondutora e de neoformação óssea de dois biomateriais, hidroxiapatitas sintéticas produzidas pela UEPG, que foram implantadas em defeitos críticos de 8 mm em calvária de 60 ratas.

Avaliar através de experimentos *in vivo* e mediante análise histomorfométrica, tanto em conjuntivo de dorso de ratas como em calvária de animais, as duas hidroxiapatitas produzidas pela UEPG, em comparação com um terceiro biomaterial, uma hidroxiapatita sintética já utilizada no mercado brasileiro. Esta análise em tecido ósseo inclui a utilização de radiografias digitais de calvária de ratas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto desta pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética do Uso de Animal (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, conforme Carta de Aprovação – Processo CEUA 22/2012, Protocolo UEPG, 08258/2012. (Anexo A).

Previamente à execução dos experimentos realizou-se um *estudo piloto* visando determinar a anestesia ideal para os animais, desenvolver o treinamento dos procedimentos cirúrgicos, incluindo a determinação completa de um protocolo cirúrgico, com as etapas de eutanásias e biópsias.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no laboratório de Patologia Bucal do Departamento de Odontologia da UEPG e as peças biopsiadas foram processadas e coradas no *Laboratório de Patologia Médica* da cidade de Ponta Grossa, Paraná – Rua Santos Dumont, 1436.

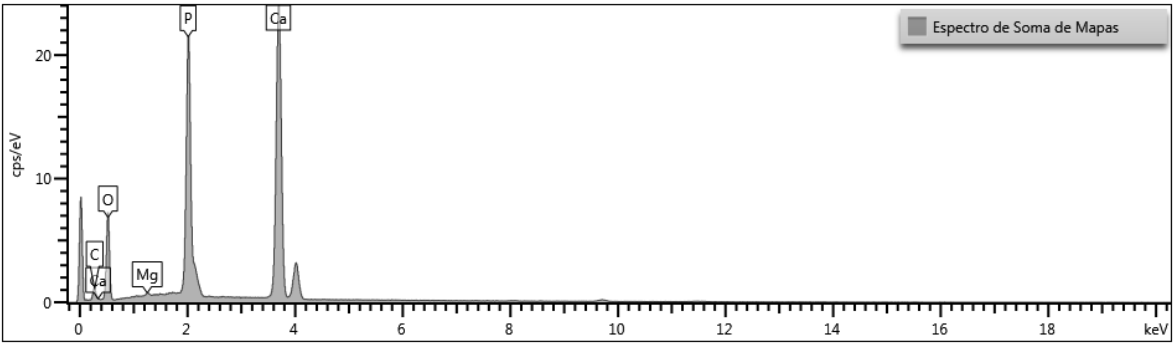
3.1 EXPERIMENTO 1 - Análise histomorfométrica das respostas biológicas após utilização de hidroxiapatita pura e hidroxiapatita com colágeno: estudo em conjuntivo subcutâneo de dorso de ratas.

3.1.1 Obtenção e caracterização dos biomateriais:

O pó de hidroxiapatita foi obtido pelo método da precipitação, combinando H_3PO_4 (Nuclear, P.A. 85%) ao $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Vetec, P.A. 95%), na razão molar Ca/P de 1,67, em meio aquoso. Ao término da adição da solução de ácido o pH foi ajustado para 10, com NH_4OH (Reatech, P.A. 28%). O precipitado foi envelhecido por 76 h, filtrado à vácuo e o precipitado resultante de cada amostra foi seco em estufa à temperatura de 100°C por 24 horas. Uma vez obtido o pó de hidroxiapatita sintética (HaP) o colágeno bovino foi adicionado e solubilizado em água, pelo método de ultrassom por 1 hora e liofilizados: o resultado foi a obtenção da hidroxiapatita com colágeno (HaCol). As amostras foram caracterizadas por difratometria de raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG). Abaixo, nas figuras 1 a 8, a caracterização dos três biomateriais (Ha pura; Ha

Colágeno e Ha Alobone) mediante microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) e difratometria de raios X (DRX).

A



B

_OINA.Reporting.Mustang.Placeholder.SpectrumEntity

Elemento	Wt%	Sigma Wt%
C	7,06	0,24
O	43,49	0,24
Mg	0,23	0,03
P	16,78	0,1
Ca	32,44	0,16
Total:	100	

C

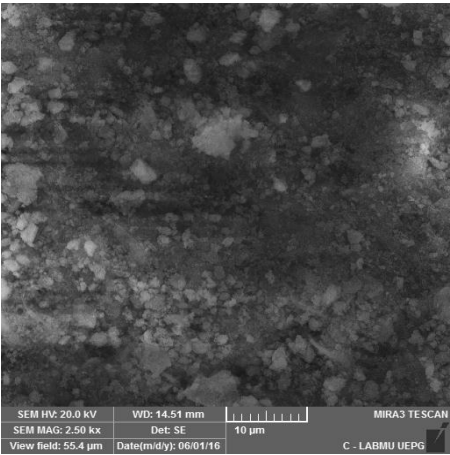


Figura 1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Hidroxiapatita Pura - HaP:
Em (A) composição química da hidroxiapatita, mapeamento da distribuição de elementos químicos por minerais; em (B) distribuição e porcentagem dos elementos químicos constituintes; em (C), micrografia do MEV mostrando a forma esferoide e microparticulada do biomaterial e com grandes aglomerados.

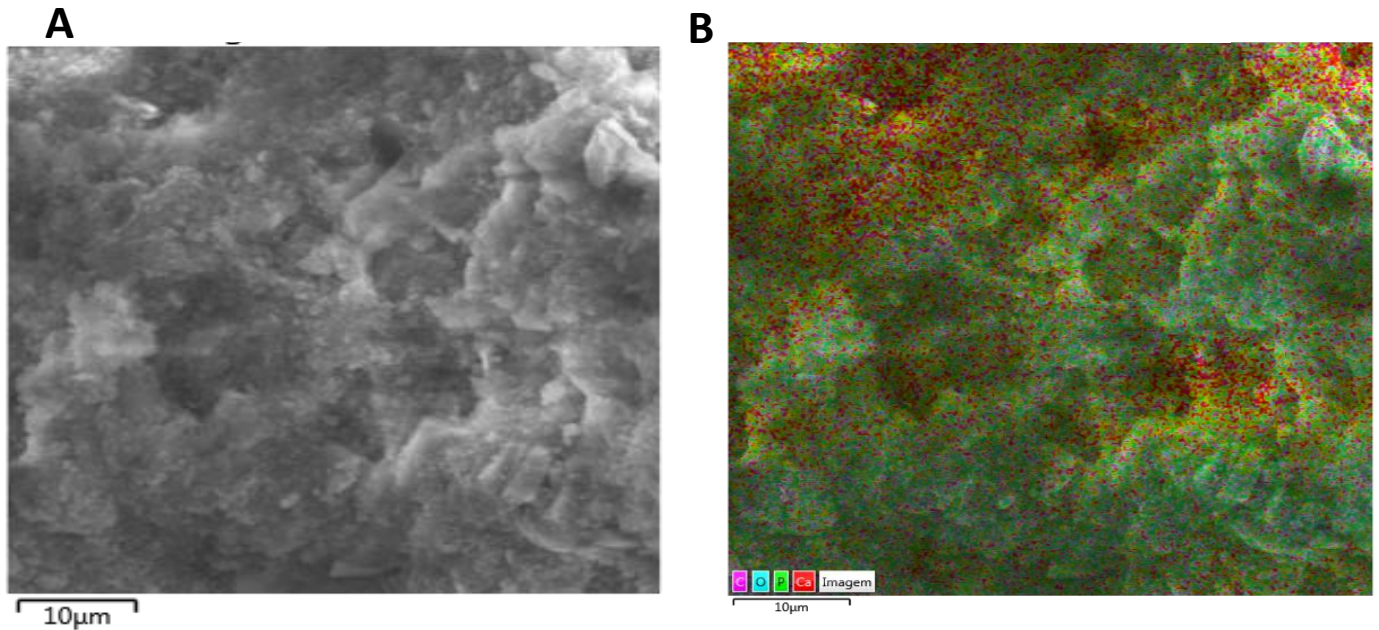


Figura 2. Superfície de eletrodiposições do MEV e o espectro do EDS.

Hidroxiapatita Pura - HaP:

Em (A) micrografia do MEV (eletrodiposições). Em (B) EDS - *Energy dispersive X-ray spectroscopy* da mesma amostra, mostrando a identificação dos elementos e a sua concentração.

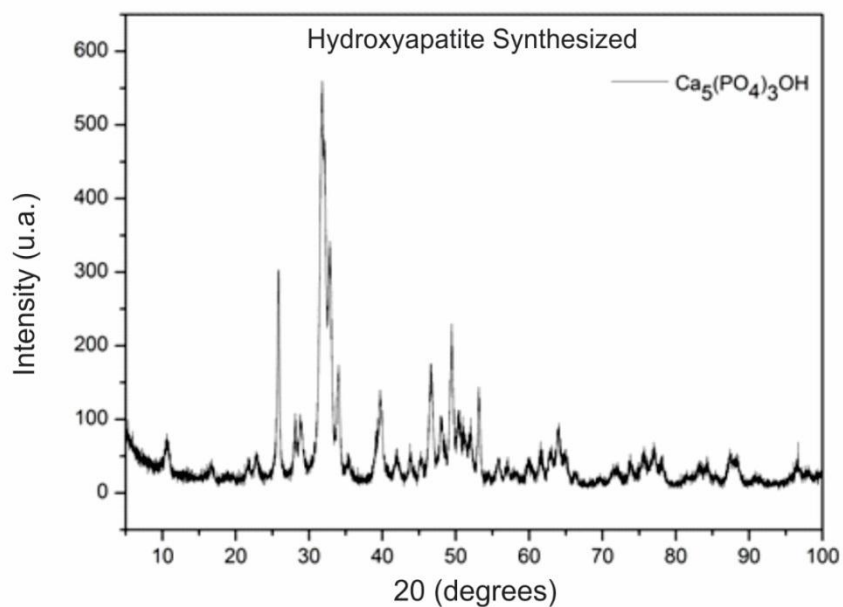
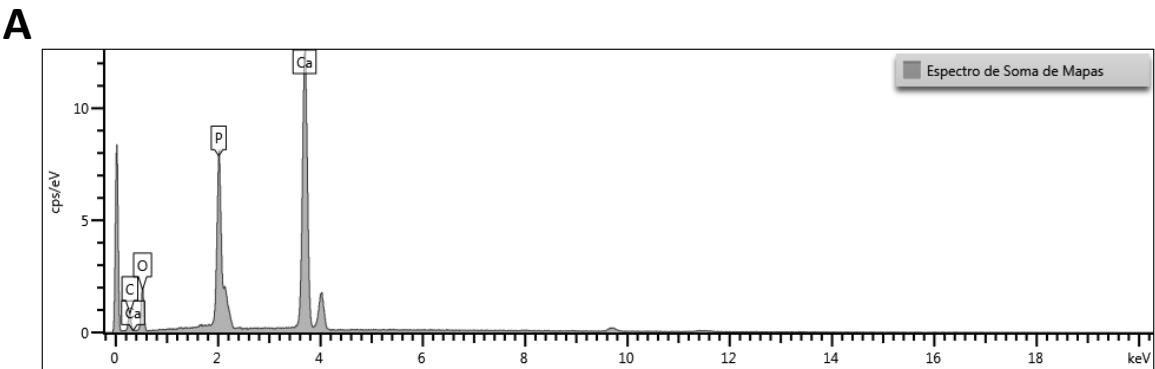


Figura 3. Difratoograma originado de difratometria de raios-X. Hidroxiapatita Pura - HaP:

A difração de raios-X do pó mineralizado usa o difratômetro para a caracterização espacial de átomos que tem formas cristalinas. Mostra a distribuição de fases e os campos de tensão. A difração significa o espalhamento ou dispersão de fótons da radiação eletromagnética causada pela radiação de raios-X sobre os átomos do biomaterial (objeto difrator). A obtenção experimental da estrutura cristalina de um material conhecido (picos característicos) pode diferenciá-lo de um desconhecido.



B

_OINA.Reporting.Mustang.Placeholder.SpectrumEntit y		
		Sigma
Elemento	Wt%	Wt%
C	12,53	0,46
O	33,73	0,51
P	13,69	0,17
Ca	40,04	0,38
Total:	100	

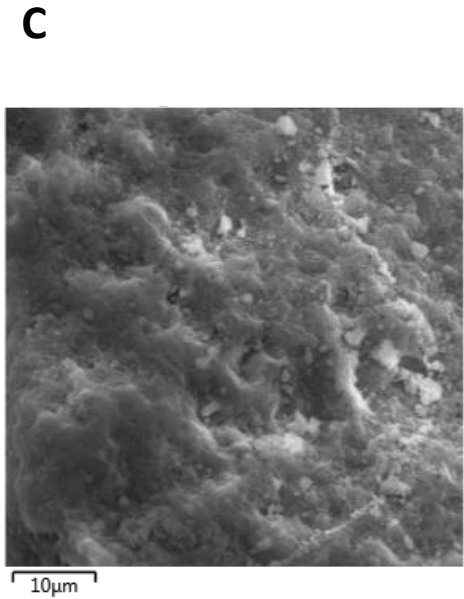


Figura 4. Hidroxiapatita com colágeno - HaCol: Em (A) e (B), hidroxiapatita com colágeno. Em (C), micrografia do MEV.

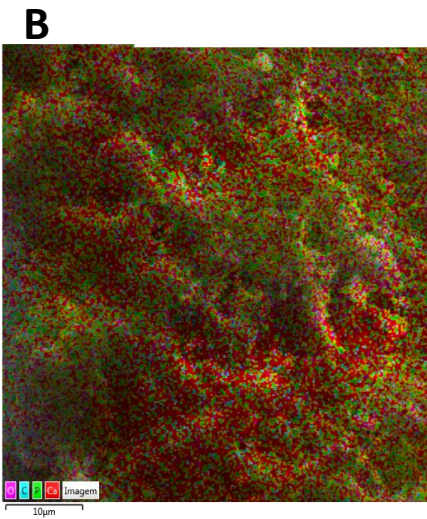
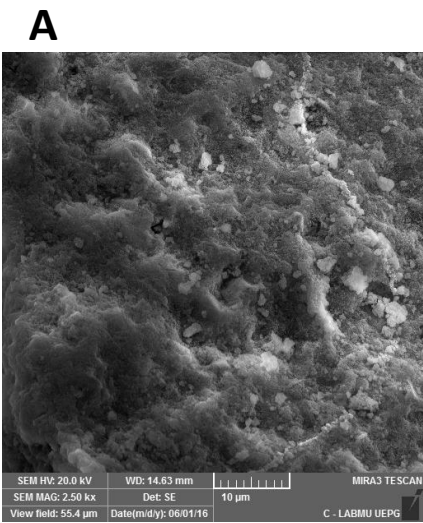
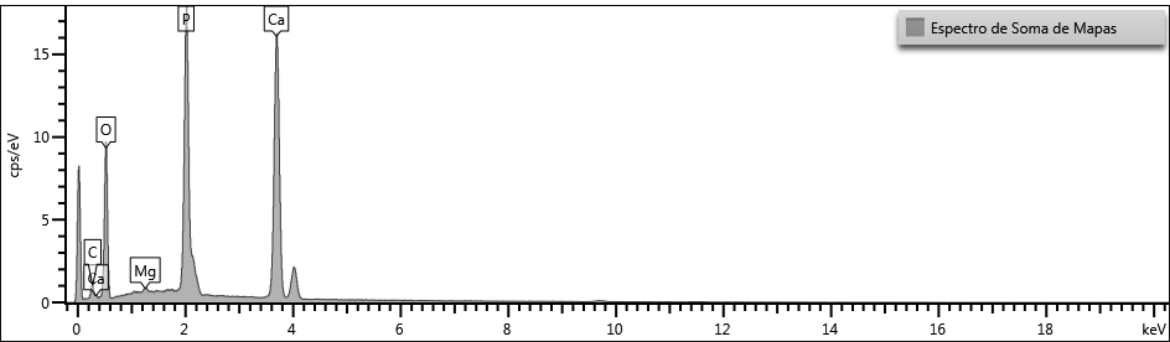


Figura 5. Hidroxiapatita com colágeno - HaCol: Em (A) micrografia do MEV. Em (B) EDS - *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*, da mesma amostra.

A



B

_OINA.Reporting.Mustang.Placeholder.SpectrumEntit
y

Elemento	Wt%	Sigma Wt%
C	6,38	0,29
O	53,11	0,27
Mg	0,26	0,03
P	15,58	0,11
Ca	24,67	0,15
Total:	100	

C

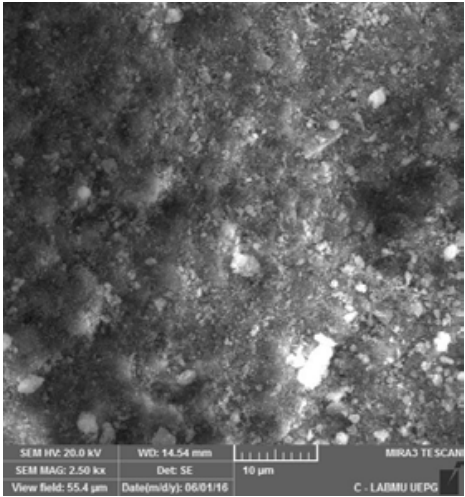
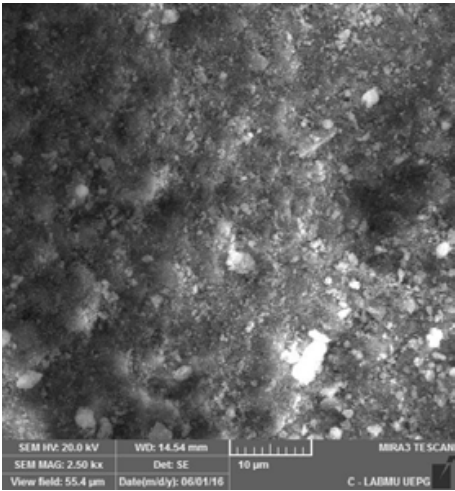


Figura 6. Hidroxiapatita Comercial - HaAlobone: Em (A) e (B) a composição da hidroxiapatita. Em (C), micrografia do MEV.

A



B

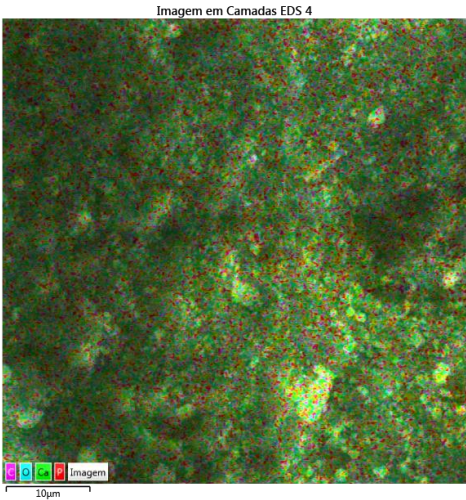


Figura 7. Hidroxiapatita Comercial- HaAlobone®: Em (A) micrografia do MEV . Em (B) EDS da mesma amostra.

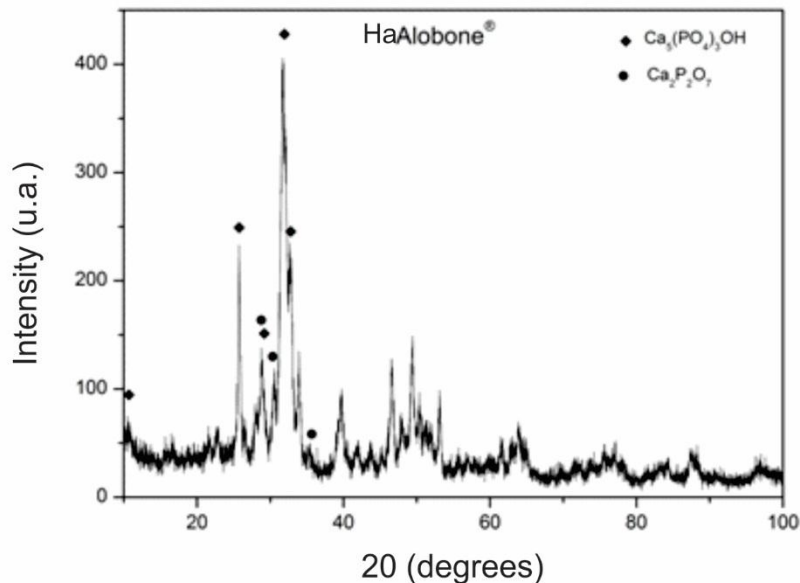


Figura 8. Difração de Raios X do biomaterial comercial - HaAlobone®.

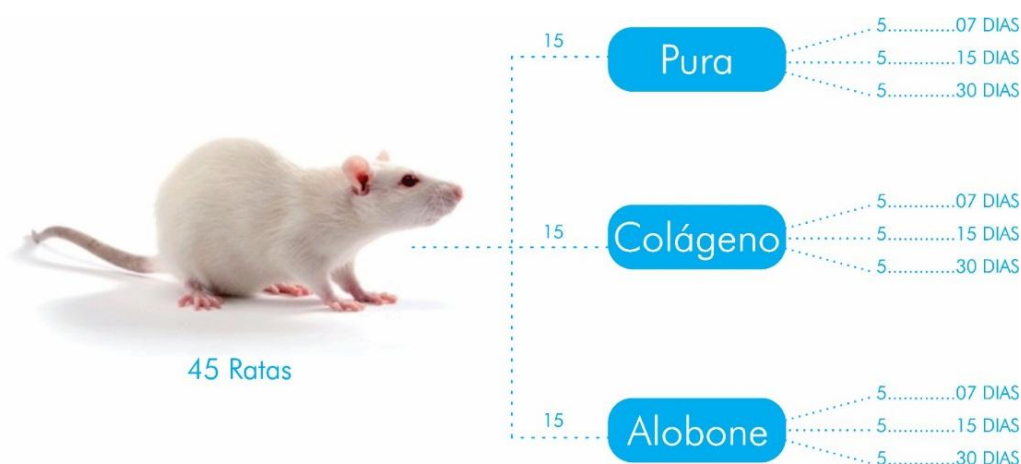
Este material apresentou na sua composição uma Fase Gama, onde não se observou a Hidroxila (OH); apenas $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$, fosfato de cálcio. Esta alteração apareceu em torno de 32 graus da escala de 0 a 100 e representou menos do que 10% desta hidroxiapatita. Contudo, não trouxe alteração nos resultados.

3.1.2 Análise da biocompatibilidade:

Esta pesquisa em conjuntivo subcutâneo de dorso de ratas utilizou 45 animais (N=45) nos quais se implantou três biomateriais diferentes: hidroxiapatita pura – *Uepg* (Hap); hidroxiapatita-colágeno – *UEPG* (HaCol) e hidroxiapatita comercial do tipo *Alobone* – *Osseocon*® - (HaAl). Os animais foram obtidos a partir de reprodução controlada pelo biotério da UEPG, espécie *rattus norvegicus albinus*, da variedade *wistar*. A idade dos animais oscilou em torno de 3 meses, com pesos corpóreos variando entre 250 a 300 gramas e divididos aleatoriamente para compor os diferentes grupos. Os animais foram sacrificados nos períodos de 7, 15 e 30 dias para verificação do comportamento biológico dos tecidos e células em torno dos biomateriais implantados (ver Esquema 1).

3.1.3 Procedimento cirúrgico e cuidados pós-operatórios

Utilizaram-se 45 ratas. Os animais foram divididos nos seguintes grupos (15 para cada grupo): Grupo 1: Hidroxiapatita pura – Uepg; Grupo 2: Hidroxiapatita com colágeno - Uepg e Grupo 3: Hidroxiapatita comercial *Alobone*. Subdividiu-se esses três grupos em três tempos para análise do material implantado (7, 15 e 30 dias),



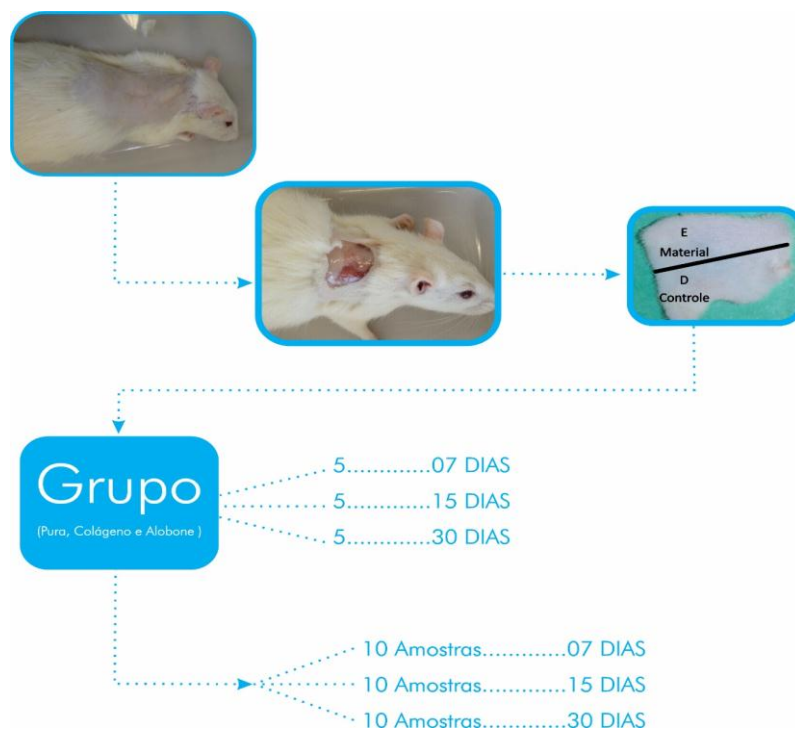
Esquema 1: Os 45 animais da pesquisa foram divididos em 3 grupos, com 15 animais em cada. Os grupos foram divididos em três subgrupos de tempo (07, 15 e 30 dias), com 5 animais (n=5) em cada subgrupo.

Os animais foram submetidos à anestesia geral intraperitoneal (IP), Figura, 9, utilizando o anestésico Ketamina, 100mg/mL (Anestésico geral injetável, à base de Cloridrato de ketamina 1,16 g; 10 mL, Ceva Brasil®), mediante diluição de 3,75mL desta solução de Ketamina associada ao relaxante muscular Xilazina, 100mg/mL (Xilazina, 200mg., miorelaxante; frasco de 10 ml, uso veterinário, importado, *Hertape Calier®*), na proporção de 0,5ml de Xilazina diluído em 5,75mL de água destilada. A administração em cada animal foi de 0,2 mL para cada 100g de peso. A Ketamina associada a Xilazina produziu nos animais anestesia e sedação por tempo hábil entre 30 e 40 minutos. (Mezadri, Tomás³⁸ 2004).



Figura 9: Anestesia geral intraperitoneal (IP) de um *Rattus norvegicus albinus*, da variedade Wistar, com idade aproximada de três meses e peso entre 250 a 300 gramas.

Cada animal recebeu a implantação do biomaterial num dos lados do dorso (lado experimental) e apenas uma ferida cirúrgica no outro (lado controle); recolhendo-se duas amostras por animal (10 amostras – 5 experimental e 5 controles.) (Esquema 2).



Esquema 02: Cada animal recebeu o tratamento nos dois lados do dorso, resultando em duas amostras por animal, experimental e controle. Assim, cada grupo apresentou cinco animais por tempo operatório, resultando em 10 amostras por tempo operatório (7, 15 e 30 dias) em cada grupo.

Após a anestesia procedeu-se a tricotomia com aparelho elétrico (máquina aparadora de barba e cabelo) da região dorsal (Figura 10) e antissepsia (solução tópica de PVPI, iodopovidona a 10 %, frasco de 100 ml; fabricante Geyer®) (Figura 11)



Figura 10: Os animais foram submetidos a tricotomia na região dorsal selecionada como a área a ser incisada.



Figura 11: Os animais receberam procedimentos de antissepsia na região tricotomizada mediante solução tópica de PVPI 10%.

A incisão e divulsão foram realizadas por meio de uma tesoura de ponta romba Metzenbaum-14 Duflex® (SS White, Brasil). A incisão inicial longitudinal retilínea foi realizada na linha sagital mediana no terço médio do dorso (Figura 12). A ferida cirúrgica realizada no dorso evita a irritação por contato e o autocanibalismo.



Figura 12: A incisão e divulsão foram realizadas por meio de uma tesoura de ponta romba, na linha sagital mediana no terço médio do dorso, com cerca de 18 mm de extensão (comprimento) e 15 mm de largura (profundidade).

A divulsão, realizada no lado direito como do esquerdo, apresentou medidas de aproximadamente 18mm de extensão com 15mm de largura. Do lado esquerdo colocou-se o biomaterial e do lado direito se realizou apenas uma divulsão. Os animais não apresentaram sangramento ou qualquer outra condição sistêmica que pudesse descartá-los da pesquisa. Para a colocação do biomaterial utilizaram-se porta-amálgamas de metal esterilizados (Golgran)[®] (ver Figura 13). Os biomateriais foram previamente hidratados com soro fisiológico em um pote de *Dapen*. As hidroxiapatitas tiveram peso padrão de 0,3 g (após hidratação) de maneira que a quantidade de material implantado seja a mesma em todos os animais. Após a colocação dos biomateriais realizaram-se suturas interrompidas no dorso do animal com fio de seda preta n° 3.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brasil), visando uma cicatrização por primeira intenção (ver Figura 14).



Figura 13: Para a colocação do biomaterial utilizaram-se porta-amálgamas de metal de maneira a depositar o material no conjuntivo subcutâneo do dorso do animal.



Figura 14: Animais já suturados no dorso com fio de seda iniciam a recuperação em gaiolas específicas.

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais receberam analgésico e anti-inflamatório cetoprofeno injetável dose única na proporção de 2mg/kg e foram colocados em gaiolas específicas (expostos a pouca luz), para a recuperação da anestesia. A temperatura do ambiente do pós-operatório imediato oscilou entre 27 a 30°C para evitar a hipotermia. O consumo de água imediato foi monitorado evitando-se a desidratação. Nos dias subsequentes a alimentação foi normal e a administração de água foi *ad libitum*. Não se verificou nenhum óbito pós-operatório dos animais.

3.1.4 Obtenção das biópsias e preparo histotécnico:

Os animais (15 por cada período de tempo) foram sacrificados contando a partir do pós-operatório imediato em 7, 15 e 30 dias. Utilizou-se dose excessiva de isoflurano, frasco com 240 mL (solução para inalação indicado em humanos para a indução e manutenção da anestesia geral). Sob efeito do isoflurano cada animal foi submetido à manobra de deslocamento cervical com barra de metal visando causar definitivamente a eutanásia. Foram observadas no dorso do animal as marcas da sutura o que facilitou a remoção da biópsia do local exato. As biópsias no dorso do animal seguiram a rotina de: tricotomia e incisão com auxílio de uma tesoura de

ponta romba Metzenbaum-14 A, para remoção de toda a área de pele e submucosa conjuntiva com o biomaterial (hidroxiapatita), incluindo a parte do dorso que recebeu apenas incisão e divulsão (controle). Foi marcado com tinta nanquim o lado correto da peça para orientar o corte com o micrótomo. As biópsias foram fixadas em formol 4% tamponado durante 48 horas.

3.1.5 Procedimento histotécnico e Análise histomorfométrica:

As peças foram submetidas ao procedimento histotécnico padrão para a coloração de hematoxilina e eosina. Colocação da peça em bloco de parafina para que o corte pelo micrótomo (em torno de 5 a 7 µm de espessura) corresponda tanto ao biomaterial hidroxiapatita (experimental) como à área de divulsão cirúrgica do dorso (controle). As cinco lâminas do grupo experimental foram analisadas (por um único profissional, previamente calibrado pela utilização do Kappa) realizando uma análise descritiva e semi-quantitativa considerando parâmetros representativos do processo de reparo, tais como: infiltrado inflamatório, predominância de determinado tipo de célula inflamatória e sinais de reparo do tecido conjuntivo. As referências numéricas de correspondência adotadas para a presença ou a ausência desses parâmetros foram: 0 = Ausente: sem infiltrado de células inflamatórias. 1 = Leve: células inflamatórias espalhadas, sem alterações de tecido. 2 = Moderada: infiltração focal de células inflamatórias com alterações do tecido, mas sem necrose. 3 = Severa: profusa e intensa infiltração de células inflamatórias com ou sem formação de abscessos. (Modificado a partir de Zaazou et al.³⁹ 2013).

Para analisar os resultados utilizaram-se cinco lâminas coradas por HE, para cada grupo experimental e para cada tempo pós-operatório (7, 15 e 30 dias). As fotografias das lâminas foram feitas no laboratório de Patologia Bucal do Departamento de Odontologia da UEPG em lente 40x visando uniformizar as imagens.

3.1.6 Análise estatística:

Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com o teste de Dunn (comparações múltiplas) para estudar a

resposta do tecido subcutâneo aos diferentes biomateriais. A análise estatística foi realizada usando o sistema de Estatísticas IBM® SPSS® (SPSS Inc., IBM Corporation, NY, EUA) Versão 21 para Windows. Quanto aos níveis de significância observados, como indicado por um asterisco nas figuras, foram consideradas estatisticamente significativas a relação $p < 0,05$. Em nossa pesquisa, utilizou-se também o índice kappa. O índice kappa é frequentemente utilizado para confirmar um grau adequado de concordância do examinador (Hefti, Preshaw⁴⁰ 2012).

3.2 EXPERIMENTO 2 - *Análise histomorfométrica das respostas biológicas após utilização de hidroxiapatita pura e hidroxiapatita com colágeno: estudo em modelo de defeito crítico em calvária de ratas*

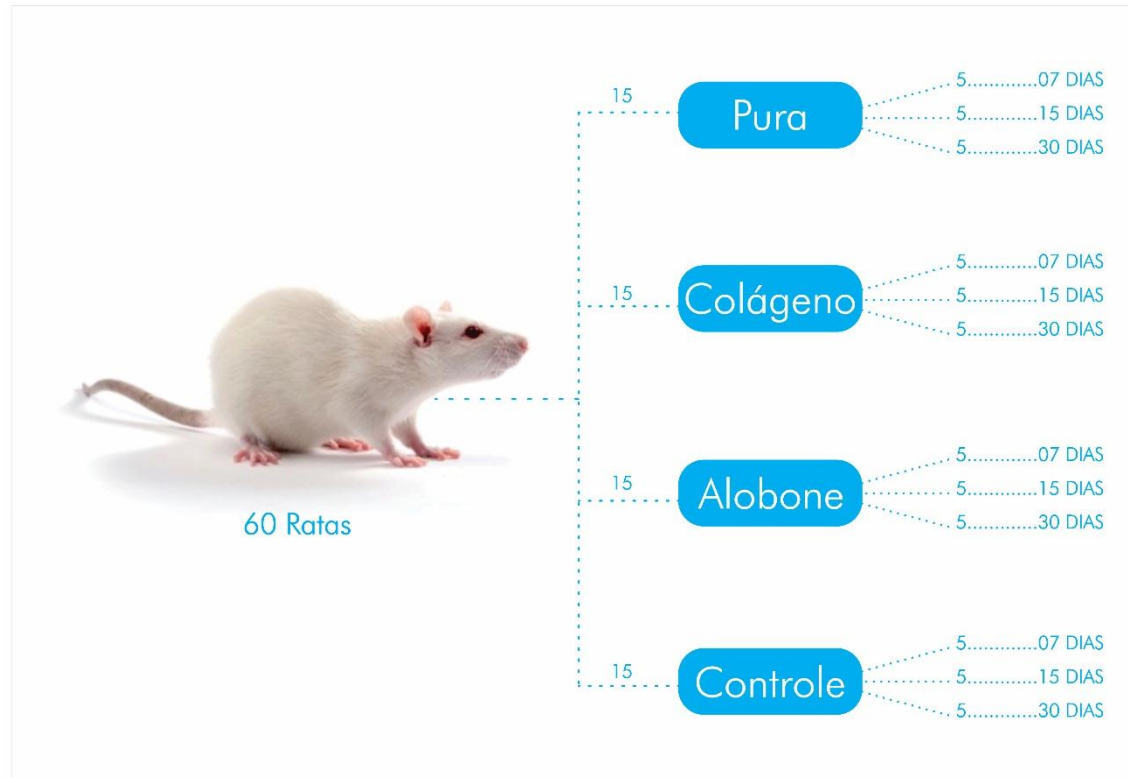
Esta pesquisa analisou o comportamento biológico de duas formas de hidroxiapatita desenvolvidas pelo departamento de Química da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG; hidroxiapatita pura e hidroxiapatita com colágeno e efetuou uma comparação com uma hidroxiapatita já existente no mercado brasileiro - Alobone®. O estudo foi realizado em calvária de ratas, utilizando o modelo de defeito crítico (*critical size defects - CSD*).

Como já foi explicitado na pesquisa anterior, para a obtenção das hidroxiapatitas utilizou-se a técnica da precipitação aquosa ou por via úmida empregando precursores de cálcio e fósforo com controle sistemático da temperatura e do pH da solução. O pó precipitado resultou numa hidroxiapatita cristalina, nanoparticulada e estequiométrica.

Nesta pesquisa utilizaram-se 60 ratas divididas em quatro grupos (ver Esquema 3). Foram colocados três tipos de materiais na calvaria de 45 ratas: Ha-pura, Ha-com colágeno e um material utilizado no mercado Ha-Alobone (*Alobone – Osseocon®*). Do grupo de 15 animais, 5 faziam parte de cada tipo de biomaterial ($n=5$). Outro grupo de 15 animais serviu como controle da pesquisa e nos quais não se utilizou biomateriais.

Os animais foram obtidos a partir de reprodução controlada pelo biotério da UEPG, espécie *rattus norvegicus albinus*, da variedade *wistar*. A idade dos animais

oscilou em torno de 3 meses, com pesos corpóreos variando entre 250 a 300 gramas e divididos aleatoriamente para compor os diferentes grupos. Esta pesquisa seguiu os mesmos padrões de anestesia e tratamento dos animais para análise de biocompatibilidade realizados em conjuntivo de dorso de ratas e já descrito anteriormente.



Esquema 3: Os 60 animais da pesquisa foram divididos em 4 grupos, com 15 animais em cada. Os grupos foram divididos em três subgrupos de tempo (07, 15 e 30 dias), com 5 animais em cada (n=5).

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no laboratório de Patologia Bucal do Departamento de Odontologia da Uepg e as peças biopsiadas foram processadas e coradas no *Laboratório de Patologia Médica* da cidade de Ponta Grossa. Previamente à execução do experimento realizou-se também um *estudo piloto* como no Experimento 1.

3.2.1 Procedimentos cirúrgicos e cuidados pós-operatórios:

Este estudo utilizou 60 ratas (N = 60), no qual foram implantados três biomateriais diferentes: hidroxiapatita pura - UEPG; hidroxiapatita-colágeno – UEPG; e comercial com hidroxiapatita (Alobone®). Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de tratamento, cada grupo com 15 animais: Grupo 1 – Hidroxiapatita pura (HaP); Grupo 2 Hidroxiapatita com colágeno (HaCol) e Grupo 3 Hidroxiapatita comercial Alobone®. O Grupo controle, com 15 animais, não recebeu a implantação de nenhum tipo de biomaterial, apenas utilizou-se membrana de colágeno - *Helitape*® (Brunel et al.⁴¹ 1996, Wang et al.⁴² 2016).

Após a anestesia geral intraperitoneal realizou-se a tricotomia da região fronto-parietal da cabeça do animal com aparelho elétrico de barbear (Figura 15) e assepsia local mediante Povidona-iodo – 10%. Utilizando um formato triangular (Figura 16) realizou-se uma incisão mucoperiosteal, com uma lâmina de bisturi nº15, na calvaria do rato e com auxílio de um periostômo de Molt e cinzel de Oshsenbein nº1 (SSWHITE), os retalhos de espessura total foram obtidos expondo amplamente a cortical óssea da região. Utilizando-se um Motor de Implante Driller Smart Cirúrgico mais Contra Ângulo 20:1, realizou-se em cada um dos animais um defeito crítico de 8mm na calvária (*Critical Size Defects* – CSD – Schmitz, Hollinger⁴³, 1986) mediante broca de trefina de 8mm de diâmetro (marca Medin® fabricada em aço inox, comprimento de 20 mm; marcação de 8mm) - Figuras 17, 18 e 19.

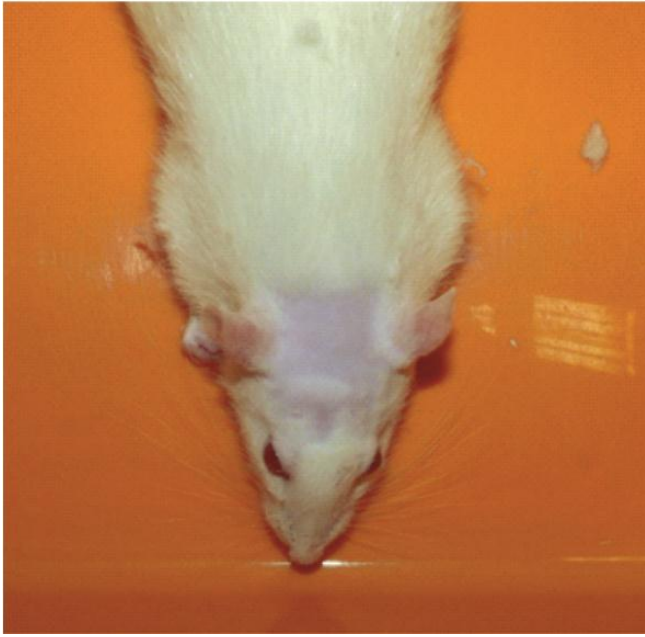


Figura 15: Após a anestesia geral intraperitoneal realizou-se a tricotomia da região fronto-parietal.



Figura 16: Delimitação com lápis da área triangular e colocação de pequenas quantidades de anestésico no tecido para hemostasia local.



Figura 17: Retalho total triangular e início da osteotomia mediante broca de trefina de 8mm de diâmetro.



Figura 18: Defeito ósseo crítico em calvária realizado com trefina em fase de conclusão.

A dura-máter em todos os animais foi obrigatoriamente mantida íntegra (Figura 20). Um dos resultados positivos desta condição foi a ausência de animais mortos durante a experiência. Após a remoção das tábuas corticais, interna e externa (Figura 26), os defeitos críticos com 8,0 mm de diâmetro foram preenchidos apenas com coágulo (para o grupo controle), enquanto nos grupos experimentais os defeitos foram preenchidos com os biomateriais, contendo um peso de 0,30mg (Figura 22). Utilizou-se como barreira física uma membrana de colágeno (*HeliTape® Absorbable Collagen Wound Dressing*) – Figura 21.



Figura 19: Defeito ósseo em calvária realizado com trefina. Este procedimento é executado sob intensa irrigação com soro fisiológico.



Figura 20: Defeito ósseo concluído. Ver a dura-máter intacta sob o defeito ósseo. A lesão e hemorragia da dura-máter pode levar facilmente o animal ao óbito.

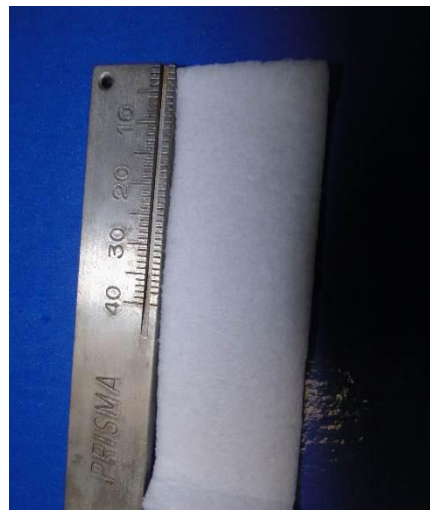


Figura 21. A barreira física colocada sobre o defeito crítico consistiu de uma membrana de colágeno reabsorvível - *Heli Tape®* que cobriu completamente o biomaterial e o defeito ósseo.



Figura 22. As hidroxiapatitas hidratadas de 0,30 mg colocadas no defeito crítico.



Figura 23. Colocação de membrana de colágeno *HeliTape®* (*Absorbable Collagen Wound Dressing*) sobre o biomaterial e cobrindo todo o defeito.

Após a colocação dos biomateriais (Figura 22), previamente hidratada com solução salina em pote Dapen, foi colocada a membrana de colágeno *HeliTape®* (*Absorbable Collagen Wound Dressing*) (Figura 23), com uma medida de 11x12 mm de maneira a recobrir completamente o defeito ósseo de 8 mm (Brunel et al. ⁴¹ 1996). Os retalhos, a seguir, foram reposicionados e suturados (Figuras 24 e 25) com fio de seda preta n° 3-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brasil). Os animais não apresentaram sangramento na região da dura-máter ou qualquer outra condição sistêmica que pudesse descartá-los da pesquisa.



Figura 24. Técnica da sutura com fio de seda utilizada para a fixação do retalho total. A primeira fixação é realizada no vértice anterior e o fio passando sobre a membrana



Figura 25. Sutura concluída. Observa-se a intensa irrigação e lavagem da região operada para evitar que os animais exalem odor a sangue.



Figura 26. Tábuas ósseas corticais de 8 milímetros de diâmetro removidas da calvária de ratas mediante osteotomia com broca trefina. Num dos lados (anverso) se observa o perióstio, que contata com a pele do animal e no outro (reverso) o endóstio, que contata com a dura-máter.

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais receberam analgésico e anti-inflamatório cetoprofeno injetável dose única na proporção de 2mg/kg e foram colocados em gaiolas específicas (de 5 animais em cada) e expostos a pouca luz, para a recuperação da anestesia. A temperatura do ambiente do pós-operatório imediato oscilou entre 27 a 30°C para evitar a hipotermia. O consumo de água imediato foi monitorado evitando-se a desidratação. Nos dias subsequentes a alimentação foi normal e a administração de água foi *ad libitum*. Não se verificou nenhum óbito pós-operatório dos animais.

3.2.2 Obtenção das biópsias e preparo histotécnico

Os animais (15 por cada período de tempo) foram sacrificados, contando a partir do término do pós-operatório imediato, em 7, 15 e 30 dias, mediante dose excessiva de isofluorano (solução para inalação indicado em humanos para a indução e manutenção da anestesia geral - frasco com 240 ml). Sob efeito do isofluorano cada animal foi submetido à manobra de deslocamento cervical com barra de metal visando causar definitivamente a eutanásia. A seguir as biópsias da calvária dos animais seguiram a rotina de: tricotomia, incisão inicial profunda com lâmina de bisturi no. 15 e remoção da calota craniana com serra circular de aço inoxidável de 16 mm de diâmetro (Figuras 27 e 28). As biópsias foram fixadas em formol 4% tamponado durante 48 horas. Posteriormente as biópsias de calvária de ratas foram submetidas a descalcificação com EDTA a 7% em água destilada por um tempo de 21 dias; o EDTA, substância quelante, tem sido o agente descalcificador mais utilizado, atuando na captura de íons cálcio da camada externa do cristal de apatita – Figura 29 (Carvalho et al.⁴⁴ 2008).

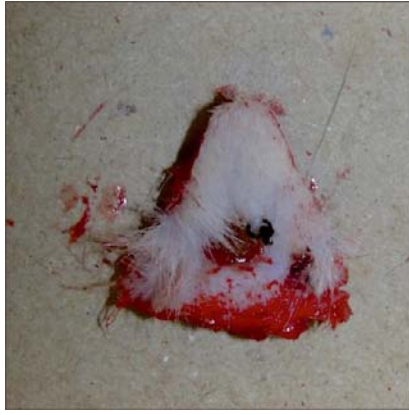


Figura 27. Biópsia de calvária de rata onde se observa a pele do animal e, portanto, corresponde à parte do periósteo (anverso).



Figura 28. A mesma biópsia, mas do lado interno; o endósteo da cortical óssea (reverso); que contata com a dura-máter.

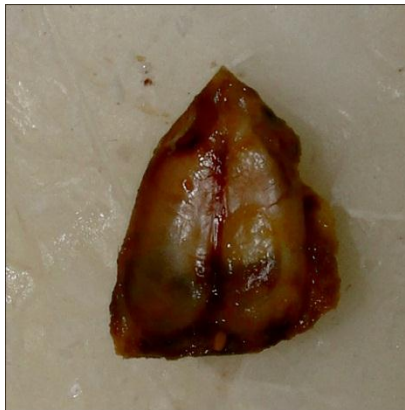


Figura 29. Tecido biopsiado e submetido a descalcificação por 21 dias, mediante ação do EDTA a 7% em água destilada.

3.2.3 Procedimento histotécnico e Análise histomorfométrica:

As peças foram submetidas ao procedimento histotécnico padrão para a coloração com hematoxilina e eosina. Colocação da peça em bloco de parafina para que o corte pelo micrótomo (em torno de 5 a 7 µm de espessura). As lâminas foram analisadas (por um único profissional, calibrado pelo método kappa para avaliar o nível de concordância) realizando uma análise descritiva e semi-quantitativa considerando parâmetros representativos do processo de reparo, tais como: infiltrado inflamatório, predominância de determinado tipo de célula inflamatória e sinais de reparo ósseo. Os referenciais numéricos de correlação adotados quanto à presença ou ausência daqueles parâmetros foram as seguintes: reparo do tecido conjuntivo (presença de fibras colágenas) e resposta inflamatória (predominância de determinado tipo de célula): 0=ausente; 1=discreto; 2=moderado; 3=intenso (Mendonça et al.⁴⁵ 2007). Para analisar os resultados utilizaram-se três lâminas coradas por HE, por cada animal, incluídos dentro dos quatro grupos experimentais (20 animais) e para cada tempo pós-operatório (7, 15 e 30 dias). Dos 4 grupos que correspondem ao tempo de 7 dias, por exemplo, cada grupo teve 12 lâminas, chegando ao total a 60 lâminas, nesse período. As fotografias das lâminas foram feitas em lente 40x visando uniformizar as imagens.

3.2.4 Análise radiográfica

Os procedimentos de análise das radiografias foram realizados da seguinte maneira: após a eutanásia e a remoção das calvárias dos animais e antes da descalcificação das peças, procedeu-se às tomadas radiográficas de todas as peças dos quatro grupos estudados (Controle, HaP; HaCol; HaAl). Consideraram-se os tempos diferentes das eutanásias, 7, 15 e 30 dias. De um total de 20 radiografias (oriundas de 4 grupos de 5 animais) por cada tempo de eutanásia (7 dias, por exemplo), escolheram-se 3 radiografias, completando 12 radiografias. Nos três tempos de eutanásia obtiveram-se 36 radiografias.

As imagens radiográficas foram obtidas utilizando um aparelho radiográfico odontológico (70 kVp, 7mA; Gendex 770, Gendex Corporation, Des Plaines, IL, EUA), durante 0,1 s e filme de raios-X de ultravelocidade Kodak número 2 (Eastman

Kodak Company, Rochester, Nova Iorque, EUA). Todas as peças – calvárias dos 3 grupos nos quais se implantou biomateriais e mais o grupo controle sem biomateriais - foram posicionadas perpendicularmente ao feixe de raios X dental (utilizou-se um posicionador), radiografadas a uma distância fixa, ajustada de 10 cm entre o tubo do aparelho de raios X e a superfície externa das calvárias. As radiografias foram trabalhadas num processador automático de película dentária (A / T 2000, Air Techniques, Hicksville, NY, EUA). As radiografias (filmes analógicos) foram transformados em imagens digitalizadas usando um scanner de filme (620ST AcerScan, San José, CA, EUA) em 1200 dpi, que foi conectado a um PC padrão, onde se observou cada uma das imagens (Pryor et al.⁴⁶ 2006). As imagens foram armazenadas no TIFF (Tagged Image File Format) sem compressão (Spin-Neto et al.⁴⁷ 2012). Em nossa pesquisa foi realizado o delineamento do defeito ósseo crítico (*'critical size defects'*) com um círculo (*'marked with circle'*), da mesma forma como foi desenvolvido em radiografias de calvária de ratos por Roh et al.⁴⁸ (2016).

Para analisar as imagens histológicas e as radiológicas visando determinar uma correlação entre ambas selecionaram-se aleatoriamente 7 cortes histológicos e 7 imagens radiográficas extraídas dos grupos experimentais (HaP, HaCol e HaAl), nos três tempos estudados: 7, 15 e 30 dias.

Os escores utilizados foram os seguintes: escores histológicos, que considerou fibras colágenas e infiltrado inflamatório (0 = Ausente; 1 = Discreto; 2 = Moderado; 3 = Intenso), de acordo com Mendonça et al. 2007⁴⁵. Os escores radiológicos do defeito ósseo (0= sem fechamento; 1= Fechamento parcial; 2= Fechamento completo), de acordo com Pryor et al.⁴⁶ (2006).

Utilizou-se o Coeficiente de correlação de Spearman (ver Tabela 1 – Artigo 2). Um mesmo observador analisou as imagens, as mesmas já utilizadas no sistema Kappa (Hefti, Preshaw⁴⁰ 2012) da análise histológica, para distinguir tecidos mineralizados e não-mineralizados.

3.2.5 Análise estatística

3.2.5.1 Análise histomorfométrica:

Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com o teste de Dunn (comparações múltiplas) para estudar a resposta do tecido subcutâneo aos diferentes biomateriais. A análise estatística foi realizada usando o sistema de Estatísticas IBM® SPSS® (SPSS Inc., IBM Corporation, NY, EUA) Versão 21 para Windows. Quanto aos níveis de significância observados, como indicado por um asterisco nas figuras, foram consideradas estatisticamente significativas a relação $p < 0,05$. Em nossa pesquisa, utilizou-se também o índice kappa.

ARTIGO 1

Journal of Oral Science - Manuscript ID JOS-16-0799

Journal of Oral Science <onbehalfof+jos+nihon-u.ac.jp@manuscriptcentral.com>



Responder |
qua 16/11/2016, 11:27

...

Você respondeu em 16/11/2016 12:46.

16-Nov-2016

Dear Prof. Goiris:

Your manuscript entitled "Histomorphometric analysis of biological responses following the use of pure hydroxyapatite and hydroxyapatite with collagen: a study in subcutaneous dorsal tissue of rats" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Journal of Oral Science.

Your manuscript ID is JOS-16-0799.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/josnurd> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/josnurd>.

Thank you for submitting your manuscript to the Journal of Oral Science.

Sincerely,

Editorial Office
Journal of Oral Science
jos@nihon-u.ac.jp

TITLE PAGE

Histomorphometric analysis of biological responses following the use of pure hydroxyapatite and hydroxyapatite with collagen: a study in subcutaneous dorsal tissue of rats

Fabio A. Goiris¹⁾, Sandra Antunes²⁾, Fabio A. Santos¹⁾, Eduardo B. Campagnoli³⁾, Edson D. Alves⁴⁾, Erika de Lara⁵⁾, Matheus T. Wakasugui⁵⁾, Roberto Nakakogue⁵⁾, Michel F. Otuki⁶⁾.

¹⁾ Department of Periodontics, Faculty of Dentistry, Ponta Grossa State University, Paraná, Brazil

²⁾ Department of Chemistry, Ponta Grossa State University, Paraná, Brazil

³⁾ Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Ponta Grossa State University, Paraná, Brazil

⁴⁾ Department of Implant Dentistry, São Leopoldo Mandic Post Graduate Center, Campinas, São Paulo, Brazil

⁵⁾ Ponta Grossa State University, Paraná, Brazil

⁶⁾ Department of Biochemistry, Universidade Federal do Paraná, Brazil

Correspondence to:

Fabio Anibal Goiris

Campus Uvaranas - Av. General Carlos Cavalcanti, 4748

Faculty of Dentistry, Ponta Grossa State University, Ponta Grossa, Paraná, Brazil

84030-900

fgoiris@hotmail.com

FAX Number +55 42 3220-3000

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the biological responses resulting from the implantation of two types of experimental hydroxyapatite – pure Ha (HaP) and Ha with collagen (HaCol) and compare them with a third type HaAlobone (commercial) – on subcutaneous dorsal tissue of female rats. Forty-five animals were used (15 in each group) which were sacrificed 7, 15 and 30 days after operation. The specimens were fixed, stained with hematoxylin and eosin and then evaluated for inflammatory reactions with a light microscope. The three experimental groups showed high inflammatory response after 7 days, however, without necrosis. The inflammatory response was seen to decrease sharply after 15 days. After 30 days, the foreign body reactions were seen to decrease significantly and an organized collagen tissue was observed, which formed a fibrous capsule around the biomaterial. The results showed that the types of hydroxyapatite tested – HaP and HaCol – are biocompatible. When compared with the commercially available hydroxyapatite, these new biomaterials showed similar biocompatibility performance. Comparing HaP to HaCol there were no significant differences regarding biocompatibility.

KEYWORDS

Hydroxyapatite, Biocompatibility, Subcutaneous implantation.

INTRODUCTION

Bioresorbable materials as porous hydroxyapatite (Hap) - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ - have been clinically applied as bioactive materials and to substitute hard tissues in several medical specialty fields because of excellent biocompatibility and osteoconduction (1, 2). In recent years, orthopedists and oral surgeons have required the high capability of commercial Hap products for biomaterials, such as improvement of bio-absorption at implanted regions and early incorporation into the bio-metabolic system (3).

Porous hydroxyapatite should present the following requirements for the formation of a suitable osteoconductive scaffold in bone regeneration: biocompatibility; osteoconductivity; interconnected porous structures; mechanical strength and biodegradability. These factors are required for an appropriate strategy to deal with a type of bone tissue engineering called "porous osteoconductive scaffold", which operates in combination with osteoinductive and osteogenic molecules or cells (4, 5).

Numerous biocompatible, biodegradable polymers are now available for both experimental and clinical use. A material is considered biocompatible when it does not produce harmful reactions or toxic elements in the tissues around it or adverse systemic reactions as the result of elements, ions and/or compounds that it releases (6). In addition, it should be free of potentially sensitizing agents which might result in an allergenic response, and should not present any carcinogenic potential (7). An adverse reaction might result from the material toxicity. Therefore, toxicity can be considered one reason for the nonbiocompatibility of some material. The material toxicity can be evaluated by carrying out *in vitro* tests, experiments with animals and clinical tests (8).

Biocompatibility reflects the nature and degree of interaction between biomaterials and host tissues and is one of the critical concerns in biomaterials research. Subcutaneous implantation of scaffold is the initial step in order to determine its biocompatibility (9). Subcutaneous implantation of hydroxyapatite and other synthetic materials has been widely used in previous studies to examine its biocompatibility (10, 11).

Nanotechnology, also known as molecular nanotechnology or molecular engineering, is the production of functional materials and structures in the range of 0.1 to 100 nanometers – the nanoscale – through various physical or chemical methods. The intense interest in the use of nanomaterials originates in the idea that they can be used to manipulate the structure of materials and provide dramatic improvement to the electrical, chemical, mechanical and optical properties (5, 12).

The synthetic biomaterial used in our research (HaP and HaCol) was also a nanocrystalline hydroxyapatite (nHAp) with a particle size smaller than 50 nm. This research analyzed the biological behavior of these two types of hydroxyapatite developed by the Chemistry Department of the State University of Ponta Grossa (UEPG), i.e. pure hydroxyapatite (HaP) and hydroxyapatite with collagen – HaCol. A third type of hydroxyapatite (HaAlobone) (13, 14) was included in this study because this is a material that has been commercialized in the Brazilian biomaterial market and mainly because it has been applied to humans. It seems relevant to emphasize the scarcity of *in vitro*, *in vivo* or clinical research on this type of biomaterial which is already commercially available. The present study was performed on the dorsal subcutaneous connective tissue of rats using histomorphometric analysis.

MATERIALS AND METHODS

Obtaining and characterizing the biomaterial:

The hydroxyapatite powder was obtained by the precipitation method, combining H_3PO_4 (Nuclear P.A. 85%) with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Vetec, P.A. 95%) at a molar Ca/P ratio of 1.67 in an aqueous medium. After the acid solution was added the pH was adjusted to 10 with NH_4OH (Reatech, P.A. 28%). The precipitate was aged for 76 h, filtered under vacuum and the resultant precipitate of each sample was dried in an oven at 100 °C for 24 hours. The hydroxyapatite obtained by this method had a nanocomposite structure (particles) and an average below 50 nm, whereas the particle agglomerates had an average that ranged from 6 to 9 micrometers. Other authors used mechanical methods to obtain a similar nanocrystalline hydroxyapatite with crystallite size in the range of 22 nm to 39 nm (15). In the present research bovine collagen was added and solubilized in water by the ultrasound method for one hour and then lyophilized (HaCol). The samples were characterized by X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopy with field emission (FEG-SEM). The characterization of the three biomaterials by scanning electron microscopy with field emission (FEG-SEM) and XRD is shown below (Figure 1 to 3 HaP; figure 4 to 5 HaCol and figure 6 to 8, HaAlobone).

Analysis of biocompatibility:

This study used 45 female rats, in which the following three different biomaterials were implanted: pure hydroxyapatite (HaP) - UEPG; hydroxyapatite-collagen (HaCol) – UEPG; and commercial hydroxyapatite (Alobone®, Osseocon Biomaterials, Rio de Janeiro, Brazil). The animals were obtained from controlled reproduction at the

vivarium of UEPG. The rats were of the *rattus norvegicus albinus* species and the Wistar variety. The animals were aged around three months and their body weight ranged from 250 to 300 grams. They were randomly distributed in different groups. The animals were sacrificed (each group, n = 15 - where each of the three materials were implanted in five animals) at 7, 15 and 30 days to verify the biological behavior of the tissues and cells around the implanted biomaterial. The surgical procedures were performed at the Oral Pathology Laboratory of the Department of Dentistry at UEPG and the biopsied specimens were processed and stained at the Medical Pathology Laboratory of the city of Ponta Grossa. The research project was approved by the Ethics Committee on Animal Use at the Ponta Grossa State University (UEPG) in accordance with Process CEUA 22/2012, UEPG Protocol, 08258/2012. A pilot study was performed prior to the experiment to determine the ideal anaesthetic for the animals, to practice the surgical procedures, and to determine the surgical protocol, including biopsies; in order to minimize animal suffering.

Surgical procedure and post-operative care:

The animals underwent general anesthesia intraperitoneally (IP) using 100 mg/ml ketamine, (injectable general anesthetic based on 1.16 g hydrochloride ketamine, 10 ml, Ceva Brasil[®]) by dilution of 3.75 ml of this ketamine solution together with the muscle relaxant xylazine, 100 mg/ml (xylazine, 200mg; 10 ml bottle, veterinary use, imported, Hertape Calier[®]), at a ratio of 0.5 ml of xylazine diluted in 5.75 ml of distilled water. Each animal was administered with 0.2 ml per 100 g weight. The use of ketamine together with xylazine produced anesthesia and sedation in the animals within 30-40 minutes (16).

Forty-five rats were used in the experiments and each one received a submucosal incision for the placement of the biomaterial (on the right side of the animal) and another incision, starting from the first (left side of the animal). The control consisted only of a subcutaneous dorsal avulsion (left side of the animal). The animals were divided into the following groups: (n = 15 for each group): Group 1: pure hydroxyapatite - HaP; Group 2: hydroxyapatite with collagen – HaCol; and Group 3, commercial hydroxyapatite HaAlobone®. The surgical wound on the dorsal area was used to prevent irritation by contact and auto-cannibalism.

After anesthesia, trichotomy was performed using an electrical appliance (a hair/beard trimmer) in the dorsal region as well as antisepsis (topical solution of 10% PVP, 100 ml flask; Geyer® manufacturer). The incision and avulsion were performed using Metzenbaum Duflex® 14 scissors with a blunt tip (SS White, Rio de Janeiro, Brazil). The initial incision was made in the median sagittal line in the middle third of the back and it measured approximately 15 mm. The avulsion, which was performed on the right side in the same manner as on the left side, was approximately 18 mm in length and 15 mm wide (Figure 9). The animals showed no bleeding or any other systemic condition that might exclude them from the study. A metal-amalgam port (Golgran®, São Paulo, Brazil) was used for the placement of the biomaterials with a uniform internal depth so that the amount of implanted material in the submucosa was the same for all the animals (0.3 grams). The hydroxyapatite was previously hydrated with saline solution. After the placement of the biomaterials, interrupted sutures were used on the animal's back with No. 3 black silk thread (Ethicon, Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brazil) so that the healing occurred by first intention.

After the surgical procedures, the animals received analgesic and anti-inflammatory ketoprofen (IP) that was injected in a single dose at a ratio of 2 mg/kg and they were placed in special cages (exposed to low light) to recover from the anesthesia. The temperature in the immediate post-operative environment ranged from 27 to 30 °C to avoid hypothermia. The immediate consumption of water was monitored to avoid dehydration. In the following days the food was normal and the administration of water was *ad libitum*. There was no postoperative death of the animals.

Obtaining biopsies and histotechnical preparation:

The animals (n = 15 for each period) were sacrificed 7, 15 and 30 days after surgery by an overdose of isoflurane - 240 ml bottle - (inhalation solution indicated in humans for the induction and maintenance of general anaesthesia). Under the effect of isoflurane, each animal underwent cervical dislocation with a metal bar in order to confirm euthanasia. Marks of sutures were observed on the back of the animals, which facilitated the removal of the biopsy from an exact location. The biopsies from the animal's back were performed in line with the following routine: trichotomy and incision with Metzenbaum Duflex®-14 scissors with a blunt tip to remove all the submucosal area with the biomaterial (hydroxyapatite), including the part of the dorsum that only received incision and avulsion (control). The biopsies were fixed in 4% formalin that was buffered for 48 hours.

Histotechnical procedure and histomorphometric analysis:

The pieces were subjected to the standard procedure for histotechnical staining - hematoxylin and eosin. The pieces were placed in a paraffin block for the cutting by microtome (approximately 5-7 mm thickness) for both the hydroxyapatite biomaterial (experimental) and the surgical avulsion of the dorsal area (control). The slides were

analyzed (by a single professional calibrated by kappa method to assess the level of concordance) and a descriptive and semi-quantitative analysis was performed that considered representative parameters of the repair process such as inflammatory infiltrate, the predominance of certain inflammatory cells and signs of repair to connective tissue. The numerical correlation references adopted for the presence or absence of those parameters were as follows: connective tissue repair (presence of collagen fibers) and inflammatory infiltrate (predominance of a particular type of inflammatory cell): 0= Absent: no inflammatory cells infiltration. 1= Mild: scattered chronic inflammatory cells without tissue changes. 2= Moderate: focal inflammatory cell infiltration with tissue changes but without necrosis. 3= Severe: severe infiltration of inflammatory cells with or without abscess formation (modified from Zaazou, et al., 17).

Statistical analysis:

The data were statistically analyzed using the non-parametric Kruskal–Wallis test with Dunn’s test (for multiple comparisons) to study the response of the subcutaneous tissue to different biomaterials. The statistical analysis was performed using IBM® SPSS® (SPSS Inc., IBM Corporation, NY, USA) Statistics Version 21 for Windows. The observed significance levels, as indicated by an asterisk in the figures, were considered statistically significant at $P < 0.05$. In our research we use the statistic kappa. In the periodontal literature, the statistic kappa is frequently used to confirm an adequate degree of examiner agreement (18).

RESULTS:

Figure 10 shows the inflammatory response at 7, 15, and 30 days for all the groups and Figures 11-13 illustrate the histopathology of the experimental groups.

Seven days

The results showed stages of moderate to severe inflammation. At seven days there were significant differences (*) from the control, which did not contain any biomaterial, compared to HaP, HaCol, and HaAlobone which were the groups that had the highest initial levels of inflammation (Figures 11 A, B and C). In all the groups the initial inflammatory response was acute, with a large presence of neutrophils (PMNs) and exudate was present in some cases. Granulation tissue was clearly observed. However, in 7 days in the control group, no longer perceives more acute inflammation.

Fifteen days

At 15 days there was a decrease in the inflammatory response in all the groups but there was difference between the control, which was without inflammation, and all the other experimental groups (Figures 12, A, B and C). The predominant cells in the experimental groups were macrophages. The connective tissue contained bundles of loose collagen fibers; however, new blood vessel formation was observed.

Thirty days

At thirty days there were no differences between the groups. The inflammatory response had greatly reduced but there was the presence of macrophages and few multinucleated giant cells. The connective tissue contained dense bundles of

organized collagen fibers and fibroblasts were present. There was non-inflammatory connective tissue capsule in all the groups (Figures 13, A, B and C), while in the control group the regeneration in the area of the surgical wound was complete. In the control side there was no difference at seven, 15 and 30 days, and the score of 0 for inflammation predominated.

After seven days, in all the groups where biomaterials were included there was an increase in the scores relating to inflammatory response. At 15 days, the scores were reduced (no significant difference) and they remained at the same level between days 15 and 30. However, there was significant difference between the scores at seven and 30 days because the biomaterials induced intense inflammatory responses in the early days and were completely reduced at 30 days, demonstrating the biocompatibility of the tested biomaterials.

In all the samples, the tested materials were surrounded by a non-inflammatory connective tissue capsule. At day 15, the fibrous capsule with regularly-oriented collagen fibers appeared to be very thin and not fully defined (Figure 12). However, the thickness of the capsule increased over time. At day 30, the biomaterial was surrounded by denser connective tissue with a defined and compact cellular organization (Figure 13). At this stage, the material showed signs of reabsorption due to a reduction in its presence in the tissue (Figure 13). The main feature of this phase was the absence of infiltration of inflammatory cells, which signified the absence of chronic inflammation.

DISCUSSION:

The aim of this study was to evaluate the reaction of tissues to two types of synthetic hydroxyapatites (HaP and HaCol) produced by UEPG, and to compare them to a third commercial type, (HaAlobone®). The implantation of biomaterials within the subcutaneous connective tissue of rats has been widely accepted as an important test to access the biocompatibility of biomaterials in various specialities (20, 21). In conjunction with previous reports (22-27) the results of the present study have shown that the histological response could be used as a preliminary source of information on biocompatibility.

In addition to biocompatibility, the physical architecture of the scaffold is of great importance. One of the main challenges in tissue engineering is designing suitable scaffolds that meet the critical requirements for application in regenerative medicine. Both natural and synthetic polymers have been used for this purpose; however, the ability to adjust the material properties and tailor their performance in terms of tissue response and biodegradation makes synthetic polymers more attractive than natural polymers. In vivo biocompatibility is the most important criterion to determine the validity and feasibility of a biomaterial. Anderson (28), defined biocompatibility as the "ability of a material to perform a specific function in a specific application without provoking host immune response".

The results of this study showed that after seven days of implantation of biomaterial there was a high inflammatory reaction (Figures 11 A, B, C). Neutrophils predominated and there was the formation of exudate in some cases. There were no areas of tissue necrosis. The examination by X-ray diffraction showed the presence of a phase range (calcium gamaphosphate - Figure 8) in HaAlobone®, which was not

observed in the X-ray diffraction results for HaP and HaCol. However, these small changes in X-ray diffraction do not generally alter the inflammatory responses for biomaterials.

The incorporation of pure hydroxyapatite with collagen may be able to improve the body's response to a material that is implanted in vivo (29). Isikli, Hasirci and Hasirci, (30), found that various naturally derived polymers have been successfully implanted in hydroxyapatite nanofibrous scaffolds. The aim of such an approach would be to increase biomimeticity, which is a property of collagen (31). Jaiswal et al., (26), and Vozzi et al., (32), have reported that natural polymers such as collagen, gelatin and chitosan have been blended with synthetic polymers, such as hydroxyapatite, and that these composites incorporate the advantages of both, by providing better biocompatibility, high mechanical properties and high capacity degradation. However, the results of our research found that there was no significant difference in the biological behavior of these two materials (HaP and HaCol). This means that the incorporation of collagen doesn't favor the tissue regeneration processes.

Ducheyne; Qiu (33) found that the adsorption of protein constitutes a fundamental property of bioceramics such as hydroxyapatite. When these biomaterials are implanted in vivo, the surrounding proteins from bodily fluids are spontaneously adsorbed on its surface and adhesion, proliferation and cell migration subsequently occur. This process plays a vital role in the regeneration of damaged tissues. Wang et al. (34) found that the physical-chemical characteristic of the surface of biomaterials is one of the decisive factors in order for the adequate adsorption of proteins to occur. The surface topography, such as the roughness, porosity, pore size, particle size, etc, determines the size of the surface area that

interacts with the protein molecules. Thus, the adsorption of proteins is critical for a sequence of biological activities to occur. In the early days of implantation, intense adsorption of plasma proteins and other macromolecules present at the site of injury, such as fibrinogen, fibronectin and Von Willebrand factor occurs in the biomaterials. This interaction, and the restoration of tissues, fluids and organic macromolecules, occurs directly in the surface of the biomaterial; it is referred to as the Vroman effect and it is governed by the physical and chemical properties of the biomaterial. Jung et al. (35) noted that the Vroman effect refers to Leo Vroman, who was the first person to observe that small molecules adsorb more readily to the surface of biomaterials, as is the case with fibrinogen, which preferentially adsorbs onto tantalum surfaces from blood plasma. These proteins are subsequently replaced by larger proteins. Cross, Toomey; Gallant (36) have written that the ability to more closely mimic the dynamics of an in vivo environment is highly applicable for biomedical implants and drug delivery vehicles. In addition, this control is particularly useful for the development of theoretical models to describe protein adsorption.

At the stage of 15 days after surgery, the predominant cells in the experimental groups were macrophages. The connective tissue was still with bundles of loose collagen fibers; however, the formation of new blood vessels was observed. The regenerative and reparative processes were very active. It should be noted that in the bone matrix the hydroxyapatite implants provided a suitable environment to stimulate bone development, in terms of structural composition, which was very similar to bone. Although heterotopic ossification can occur in ectopic tissues, such as subcutaneous tissues, this was not observed. At this 15-day stage the inflammatory reaction clearly took the chronic form and it could be understood as a protective response by the body against the presence of foreign components. When

a biomaterial is toxic or incompatible with tissues then inflammation persists; it can acquire forms of acute relapse, leading to extensive tissue damage and primarily necrosis. The magnitude and duration of the inflammatory response are directly linked to the biocompatibility of a material (37).

At 30 days there were no differences between the groups. In the tested biomaterials the inflammatory response decreased to levels similar to the control. The presence of macrophages and multinucleated giant cells was observed. The organization of the collagen fibers of the connective tissue was present and the predominant cells were fibroblasts. There was non-inflammatory connective tissue capsule in all the groups (Figure 13); while in the control side the regeneration was complete and there were no signs of inflammation.

After 30 days, the organization of the connective tissue around the biomaterial, which was disordered, scattered and missing in some areas at 15 days, became an organized fibrous capsule with a denser thickness. Ge et al. (38) found that after 90 days the thickness of the fibrous capsule around the Ha-chitin materials had decreased due to the organization and the maturation of the fibrous scarring process. The scar tissue still comprised fibroblasts, macrophages and giant cells, which are called resident cells. Legrand et al., (39), argued that the formation of the fibrous capsule by long collagen fibers and resident cells is part of the tissue reaction to a foreign body. This fibrous capsule may be constantly refurbished and disappear when the biomaterial is resorbed or when it is incorporated into the calcification process. A biomaterial is considered to be biocompatible when the intensity of the tissue reaction clearly decreases over time. At 90 days the connective tissue around the implant should have formed a thin fibrous capsule and there should also be no evidence of inflammatory reaction. Conversely, a material cannot be considered to

be biocompatible when an inflammatory reaction remains within its environment and the fibrous capsule remains fairly thick (40). Small particles of biomaterials (in contrast to larger particles) can evoke a more intense local inflammatory response, which is characterized by the presence of multinucleated giant cells and macrophages, by releasing pro-inflammatory kinins such as Platelet-derived growth factor (PDGF) and Fibroblast growth factor (FGF). This influences the behavior of the fibroblasts and subsequently induces the thickening of the fibrous capsule (41).

In the present study a decrease was observed in the amount of biomaterial in the connective tissue and this was considered to be a form of *in vivo* degradation over 30 days. Kashaba et al. (40) indicated that it is possible to speculate that the soluble fragments of calcium phosphate that are released into the tissue suffer removal by local lymphatic drainage. This hypothesis may explain why the inflammatory reaction decreased with time and why the healing of the connective tissue occurred for all the experimental materials 90 days after implantation. When there is a moderate inflammatory reaction with macrophages and giant multinucleated cells, these phagocytes show full activity. It can be suggested that the large particles of calcium phosphate that were not removed by the local lymphatic drainage or were digested by macrophages and giant cells may remain in the connective tissue, causing a persistent chronic inflammatory reaction that does not allow complete healing of the connective tissue.

CONCLUSION:

Based on the results of this study, it can be concluded that the pure hydroxyapatite and hydroxyapatite with collagen that were produced at the State University of Ponta Grossa (UEPG) and were tested in the dorsal submucosa of rats

showed no toxicity and were biocompatible materials. There were no significant differences between both the biomaterials that were tested regarding biocompatibility. Compared with the third type of hydroxyapatite (HaAlobone®) the two type of hydroxyapatite produced by UEPG did not show significant differences in terms of biocompatibility.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by Fundação Araucária, Paraná State, Brazil

CONFLICT OF INTERESTS

The authors certify that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

REFERENCES:

1. Oyane A (2010) Development of apatite-based composites by a biomimetic process for biomedical applications. *J Ceram Soc Jpn* 118, 77-81.
2. Yoshikawa H (2009) Development and clinical application of interconnected porous hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering. *J Jpn Soc. Biomaterials* 27, 17.
3. Yoshikawa H, Myoui A (2005) Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. *J Artif Organs* 8, 131-136.
4. Artzi Z, Weinreb M, Givol N, Rohrer MD, Nemcovsky CE, Prasad HS, et al. (2004) Biomaterial resorption rate and healing site morphology of inorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate in the canine: a 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 19, 357–368.
5. Sun F, Zhou H, Lee J (2011) Various preparation methods of highly porous hydroxyapatite/polymer nanoscale biocomposites for bone regeneration. *Acta Biomat* 7, 3813–3828.
6. O'Brien WJ. (2009) Dental materials and their selection. Quintessence Publishing, Chicago 4, 23
7. Phillips RW (1991) Science of dental materials. 8th ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia, 65.
8. Polyzois GL (1994) In vitro evaluation of dental materials. *Clin Mater* 16, 21-60.
9. An YH, Woolf SK, Friedman RJ (2000) Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices. *Biomaterials* 21:2635–2652.

10. Kim J, Dadsetan M, Ameenuddin S, Windebank AJ, Yaszemski MJ, Lu L (2010) In vivo biodegradation and biocompatibility of PEG/sebacic acid-based hydrogels using a cage implant system. *J Biomed Mater Res A* 95, 191–197.
11. Yin Y, Ye F, Cui J, Zhang F, Li X, Yao K (2003). Preparation and characterization of macroporous chitosan–gelatin/ β -tricalcium phosphate composite scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 67, 844–855.
12. EL-Roughby DH, Saar A, Halim A (2010) A comparative histological, histochemical, and immunohistochemical study of the biocompatibility of three different nano-restorative material implanted in rats' connective tissue. Dissertation, Faculty of Oral & Dental Medicine, Cairo University.
13. Conz MB, Campos CN, Serrão SD, Soares GA, Vidigal GM (2010) Caracterização físicoquímica de 12 biomateriais utilizados como enxertos ósseos na Implantodontia. *Rev Implantnews* 7, 541-546.
14. Conz MB, Granjeiro JM, Soares GA (2005) Physicochemical characterization of six commercial hydroxyapatites for medicaldental applications as bone graft. *J Appl Oral Sci* 13, 136-140.
15. Silva CC, Pinheiro AG, Miranda MAR, Góes JC, Sombra ASB (2003) Structural properties of hydroxyapatite obtained by mechanosynthesis. *Solid State Sci* 5, 553–558.
16. Mezdari TJ, Tomaz VA, Amaral VLL (2004) Anestesia e analgesia em animais de laboratório. in: *Animais de laboratório: cuidados na iniciação experimental*. Florianópolis: Editora da UFSC, 101-130.

- 17.Zaazou MH, Zaki DY, Mostafa AA, Mahmoud AA, Basha M, Khallaf M (2013)
In vivo biocompatibility evaluation of injectable nano-hydroxyapatite/
Poloxamer 407 based formulations. Part 1. J app Sci Res 9, 5269-5276.
- 18.Hefti AF, Preshaw PM (2012) Examiner alignment and assessment in clinical
periodontal research. Periodontol 2000 59, 41-60.
- 19.Tommila M, Jokinen J, Wilson T, Forsback A, Saukko P, Tenttinen R, et al.
(2008) Bioactive glass-derived hydroxyapatite-coating promotes granulation
tissue growth in subcutaneous cellulose implants in rats. Acta Biomater 4, 354–
361.
- 20.Stanford JW (1980) Recommended standard practices for biological
evaluation of dental materials. Int Endod J 30, 140-188.
- 21.Tomida M, Nakano K, Matsuura S, Kawakami T (2011) Comparative
examination of subcutaneous tissue reaction to high molecular materials in
medical use. Eur J Med Res 16, 249-252.
- 22.Itoh S, Kikuchi M, Takakuda K, Koyama Y, Matsumoto HN, Ichinose S, et al.
(2001) The biocompatibility and osteoconductive activity of a novel
hydroxyapatite/collagen composite biomaterial, and its function as a carrier of
rhBMP-2. J Biomed Mater Res 5, 445-453.
- 23.Cruz ACC, Pochapski MT, Daher JB, da Silva JCZ, Pilatti GL, Santos FA
(2006) Physico-chemical characterization and biocompatibility evaluation of
hydroxyapatites. J Oral Sci 48, 219-226.
- 24.Huang X; Miao X (2007) Novel Porous Hydroxyapatite Prepared by Combining
H₂O₂ Foaming with PU Sponge and Modified with PLGA and Bioactive Glass.
J Biomater Appl 21, 351-375.

25. Seyednejad H, Gawlitta D, Kuiper RV, de Bruin A, van Nostrum CF (2012) In vivo biocompatibility and biodegradation of 3D-printed porous scaffolds based on a hydroxyl-functionalized poly (ϵ -caprolactone). *Biomaterials* 33, 4309-4318.
26. Jaiswal AK, Chhabra H, Soni VP, Bellare JR (2013) Enhanced mechanical strength and biocompatibility of electrospun polycaprolactone-gelatin scaffold with surface deposited nano-hydroxyapatite. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 33, 2376–2385.
27. Xie L, Yu H, Yang W, Zhu Z, Yue L (2016) Preparation, in vitro degradability, cytotoxicity, and in vivo biocompatibility of porous hydroxyapatite whisker-reinforced poly(L-lactide) biocomposite scaffolds. *J Biomater Sci Polym* 27, 505-528.
28. Anderson JM (2001) Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Sci* 31, 81–110.
29. Wahl DA, Czernuszka JT (2006) Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair. *Eur Cell Mater* 11, 43 – 56.
30. Isikli C, Hasirci V, Hasirci N (2012) Development of porous chitosan-gelatin/hydroxyapatite composite scaffolds for hard tissue-engineering applications. 6, 135-143.
31. Arafat MT, Lam CX, Ekaputra AK, Wong SY, Li X, Gibson I (2011) Biomimetic composite coating on rapid prototyped scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater* 7, 809-820.
32. Vozzi G, Corallo C, Carta S, Fortina M, Gattazzo F, Galletti M, et al. (2014) Collagen-gelatin-genipin-hydroxyapatite composite scaffolds colonized by

- human primary osteoblasts are suitable for bone tissue engineering applications: In vitro evidences. *J Biomed Mater Res A* 102, 1415–1421.
33. Ducheyne P, Qiu Q (1999) Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* 20, 2287–2303.
 34. Wang K, Zhou C, Hong Y, Zhang X (2012) A review of protein adsorption on bioceramics. *Interface Focus* 2, 259–277.
 35. Jung SY, Lim SM, Albertorio F, Kim G, Gurau MC, Yang RD, Holden MA, Cremer PS (2003) The Vroman effect: a molecular level description of fibrinogen displacement. *J Am Chem Soc* 125, 12782-12786.
 36. Cross MC, Toomey RG, Gallant ND (2016) Protein-surface interactions on stimuli-responsive polymeric biomaterials. *Biomed Mater* 11, 1-12.
 37. Sawyer A, Hennessy K, Bellis S (2005) Regulation of mesenchymal stem cell attachment and spreading on hydroxyapatite by RGD peptides and adsorbed serum proteins. *Biomaterials* 26, 1467–1475.
 38. Ge Z, Baguenard S, Lim, LY, Wee A, Khor E (2004) Hydroxyapatite–chitin materials as potential tissue engineered bone substitutes. *Biomaterials* 25, 1049–1058.
 39. Legrand AP, Marinov G, Pavlov S, Guidoin MF, Famery R, Bresson B, et al. (2005) Degenerative mineralization in the fibrous capsule of silicone breast implants. *J Mater Sci Mater Med* 16, 477-485.
 40. Khashaba RM, Moussa MM, Mettenburg DJ, Rueggeberg FA, Chutkan NB, Borke JL (2010) Polymeric-Calcium Phosphate Cement Composites-Material Properties: In Vitro and In Vivo Investigations. *Int J Biomater* 2010, 1-14.

41. Van der Meulen J, Koerten HK (1994) Inflammatory response and degradation of three types of calcium phosphate ceramic in a non-osseous environment. J Biomed Mater Res 28, 1455–1463.

Figures
Figure 1

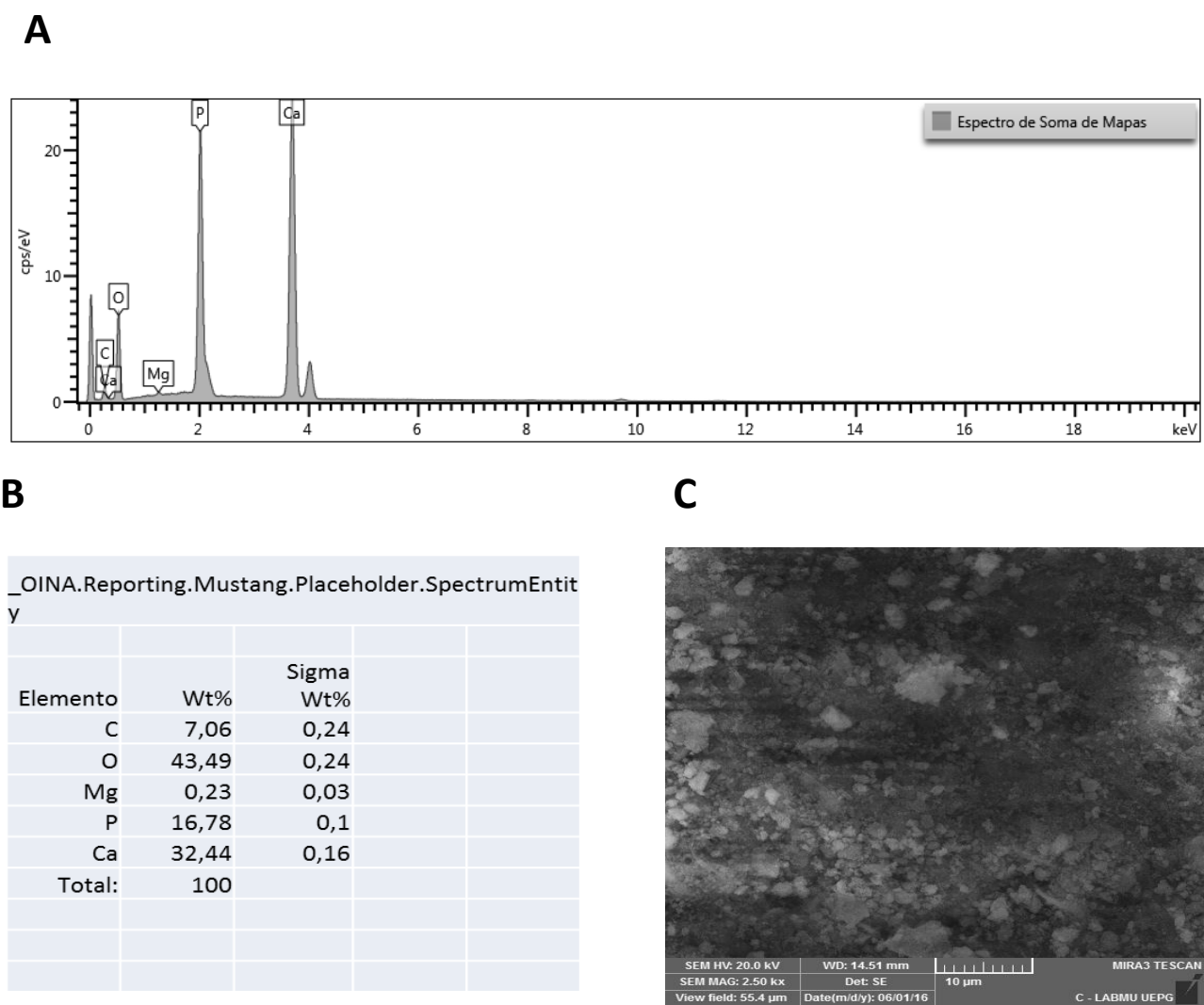


Figure 2

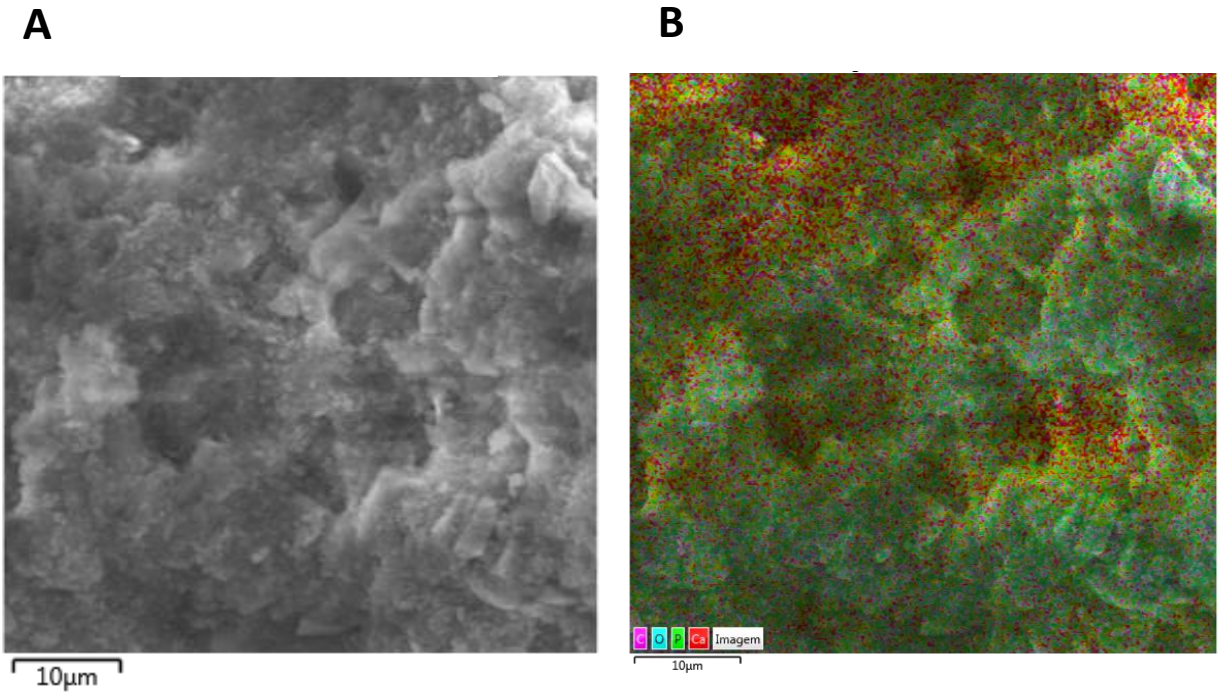


Figure 3

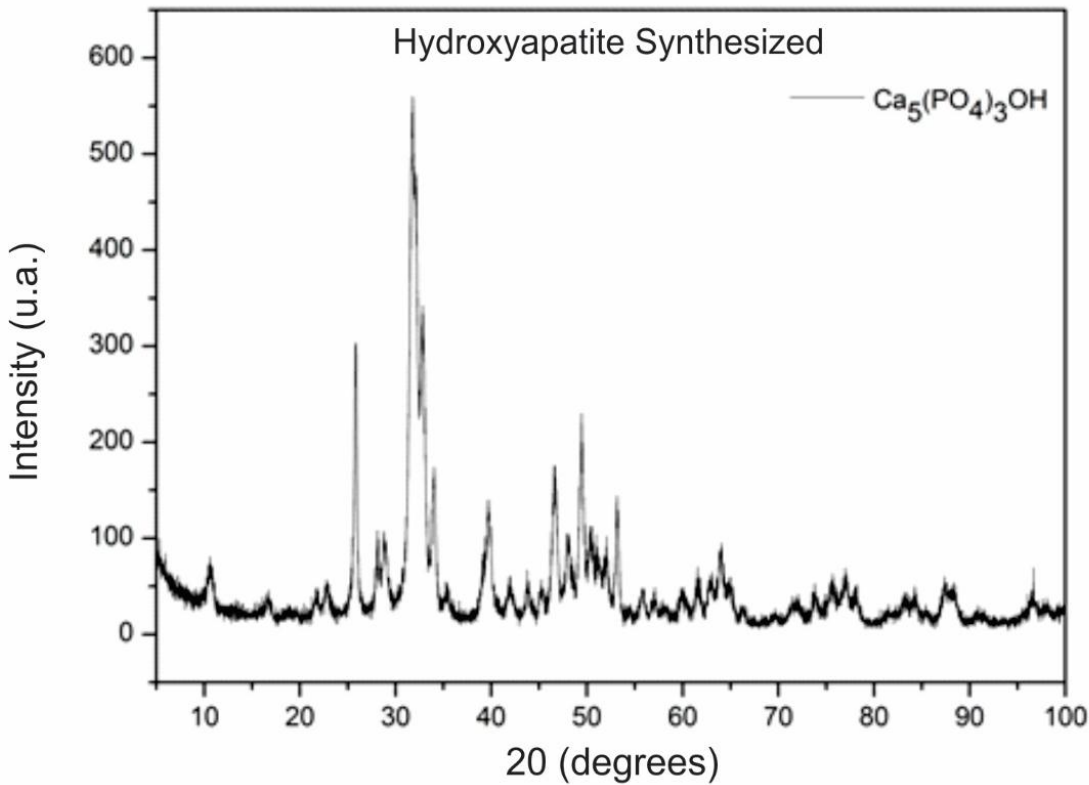
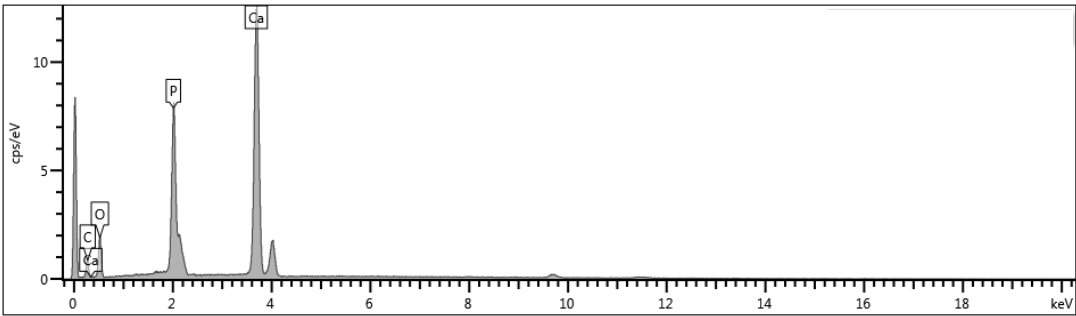


Figure 4

A



B

_OINA.Reporting.Mustang.Placeholder.SpectrumEntit
y

Elemento	Wt%	Sigma Wt%
C	12,53	0,46
O	33,73	0,51
P	13,69	0,17
Ca	40,04	0,38
Total:	100	

C

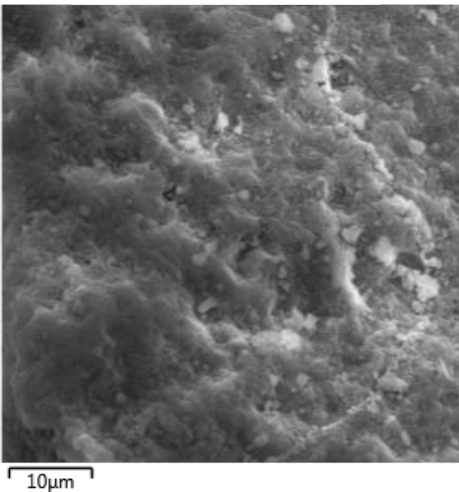


Figure 5

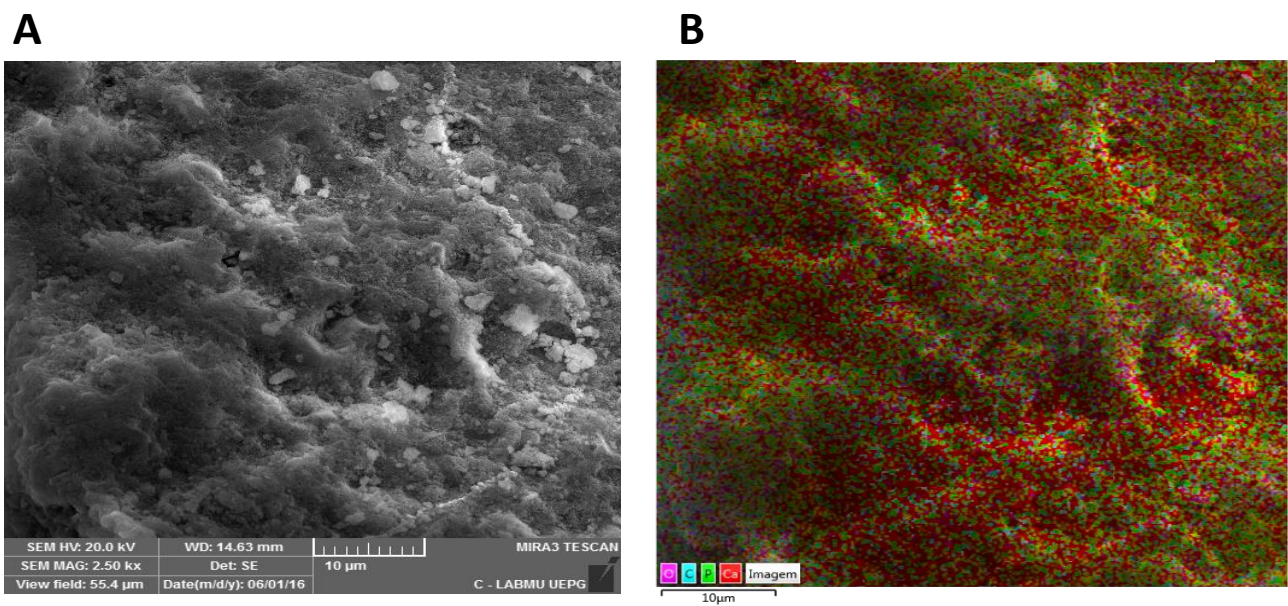


Figure 6

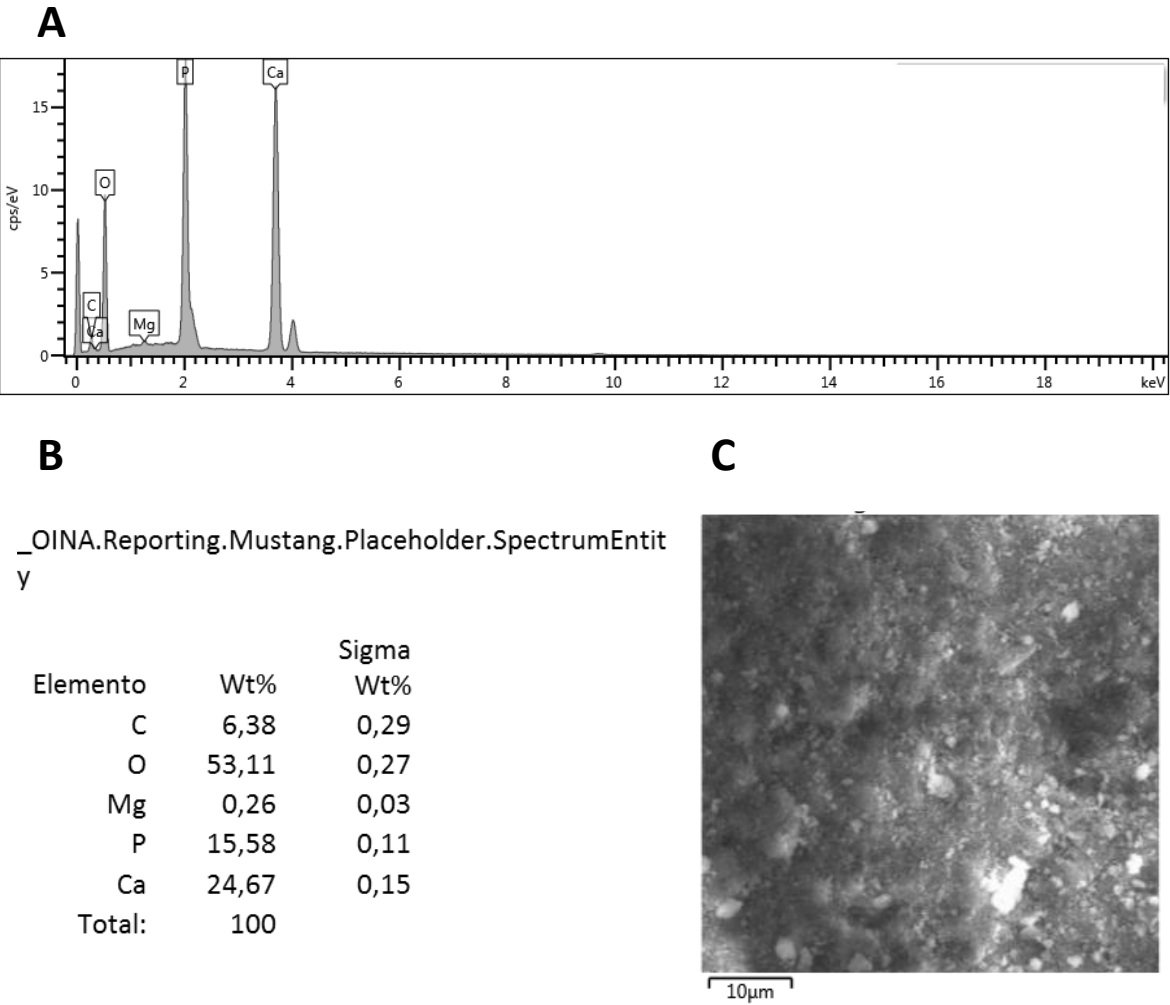


Figure 7

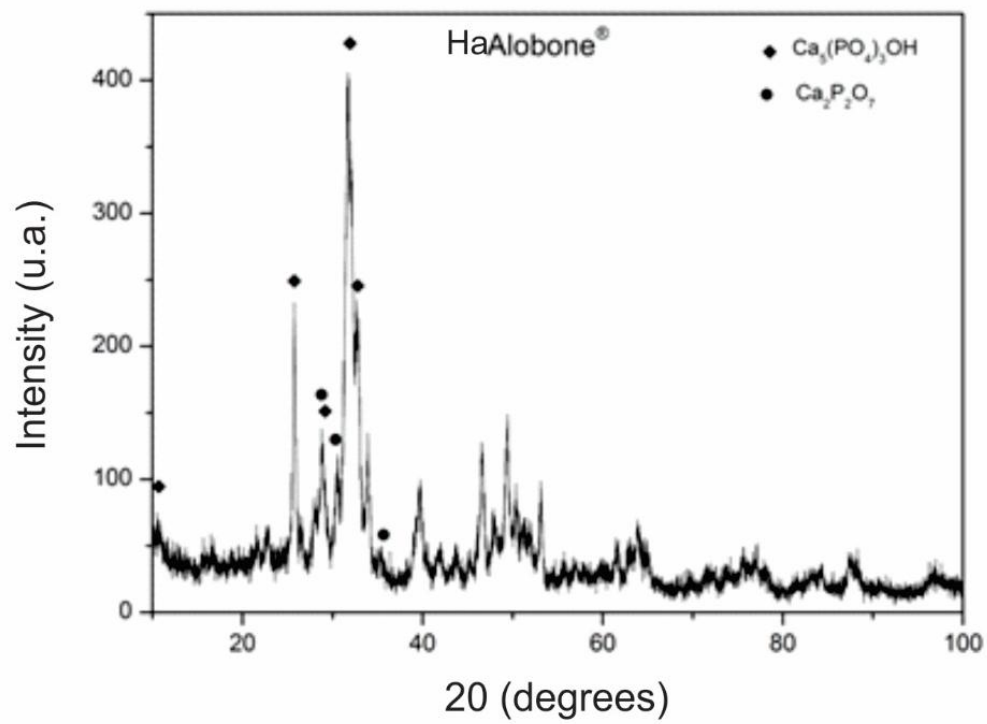
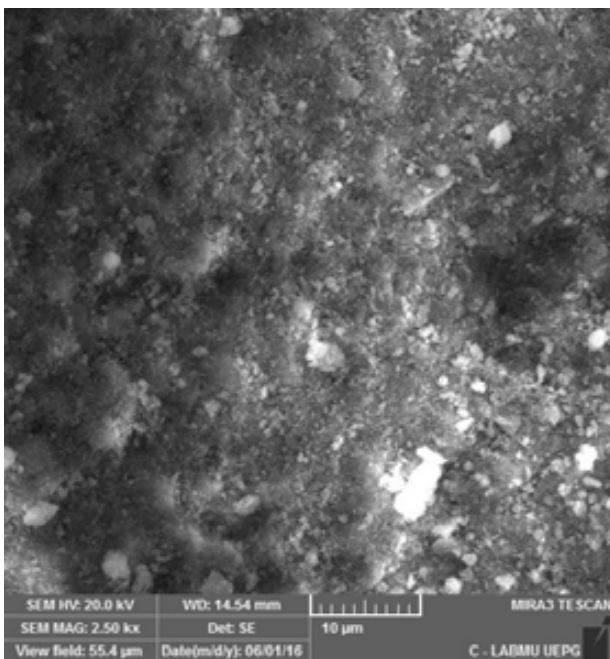


Figure 8

A



B

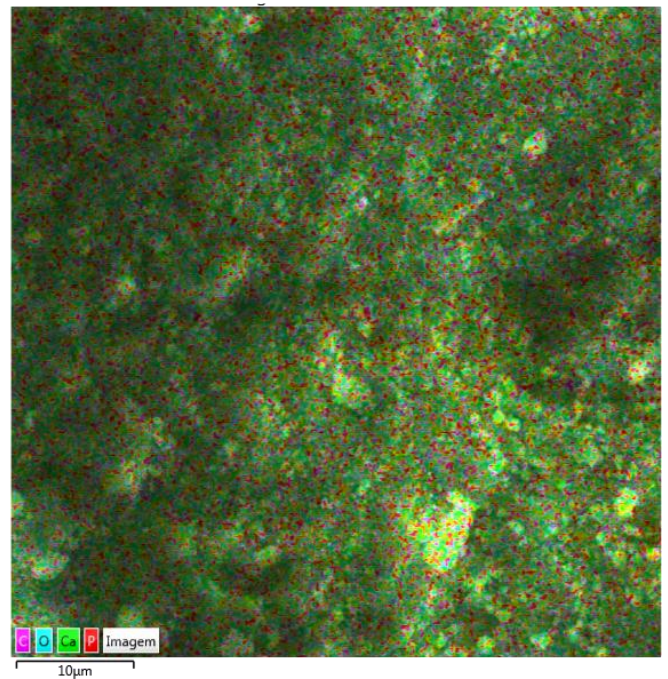


Figure 9

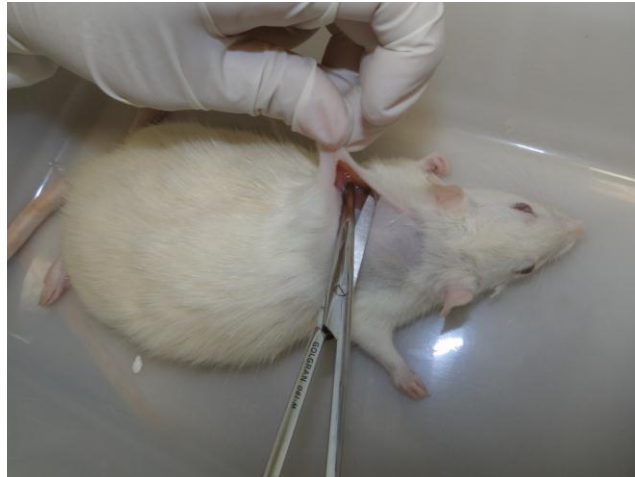


Figure 10

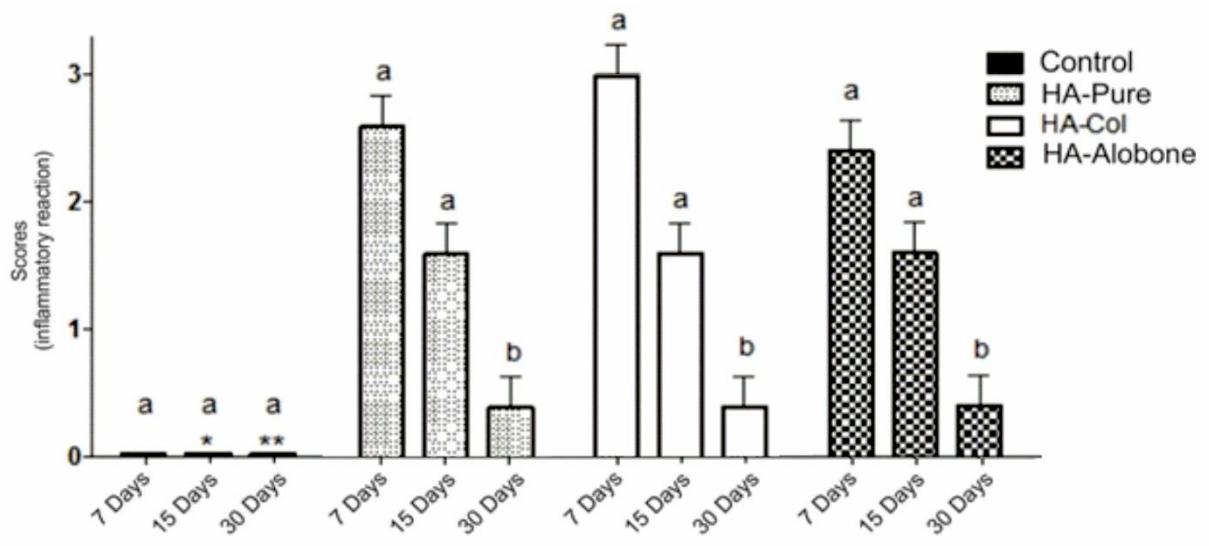


Figure 11

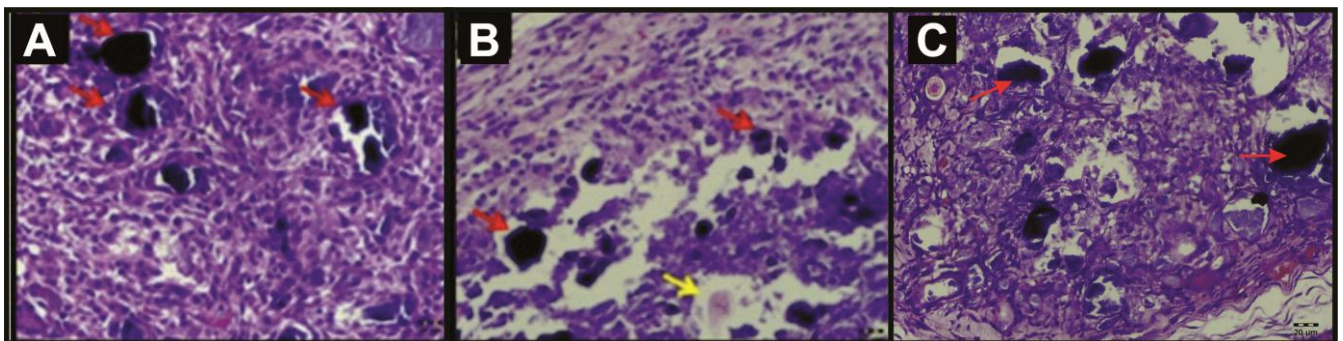


Figure 12

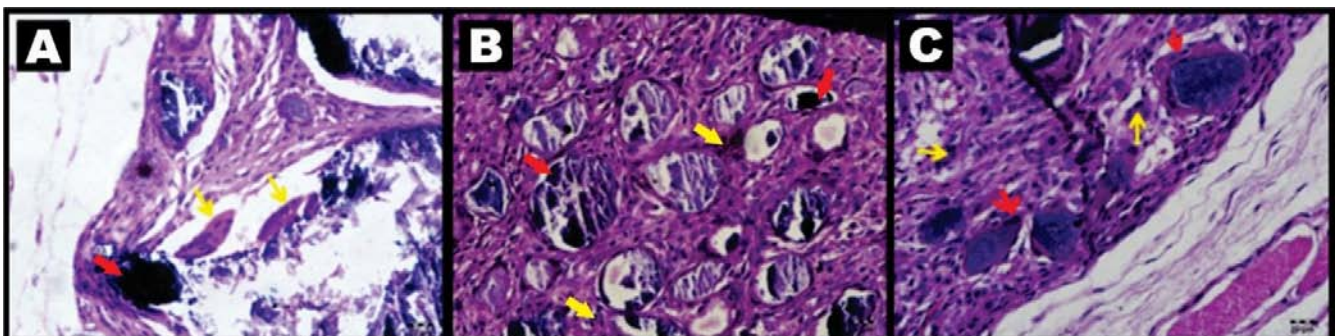


Figure 13

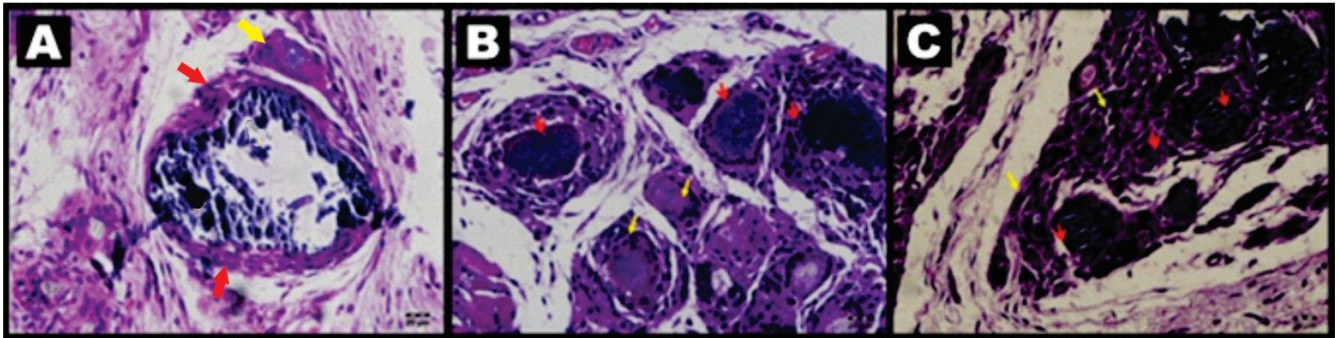


Figure Legends

Figure 1. HaP: In (A) and (B), hydroxyapatite composition. In (C), MEV micrograph.

Figure 2. HaP: In (A) SEM micrograph. In (B) energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) from the same sample.

Figure 3. HaP: Thin-film X-ray diffraction pattern of the mineralized deposit. Hydroxyapatite $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ is usually written as $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ to denote that there are two molecules in the formation of the crystalline unit cell.

Figure 4. HaCol: In (A) and (B), hydroxyapatite with collagen. In (C), MEV micrograph.

Figure 5. HaCol: In (A) SEM micrograph. In (B) energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) from the same sample.

Figure 6. HaAlobone: In (A) and (B) hydroxyapatite composition. In (C), MEV micrograph.

Figure 7. HaAlobone: In (A) the SEM micrograph. In (B) energy dispersive X-ray spectroscopy or EDS from the same sample.

Figure 8. Thin-film X-ray diffraction pattern of the mineralized deposit (HaAlobone). This material has in its composition a Gamma Phase - no hydroxyl ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ - calcium phosphate), around 32 degrees and is less than 10% pure hydroxyapatite.

Figure 9. Surgical procedures: after trichotomy a uniform and carefully incision and avulsion were performed using Metzenbaum Duflex® 14 scissors with a blunt tip. The

amount of biomaterial implanted in the submucosa was the same in all animals, 0.30 grams.

Figure 10. Comparison between different groups at each time point (Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test). Subcutaneous tissue response after 7, 15 and 30 days. Scores: 0 = absent; 1 = mild; 2 = moderate; 3 = severe.

(*) $P < 0.05$, with HaP and HaCol after 7 days.

(**) $P < 0.05$, with HaAlobone[®], HaP and HaCol after 14 days.

Comparison between different times in the same group (Kruskal-Wallis test with Dunn's post- test).

Different letters ($P < 0.01$ significance) for biomaterials.

Figure 11. In (A) **HaP - 7 days**, the biomaterial (red arrows) was observed in the connective tissue with dense inflammatory infiltrate. There was a predominance of neutrophils. In (B) **HaCol - 7 days**, the biomaterial (red arrows) was distributed in the tissue with inflammatory infiltrate. There was little presence of exudate (yellow arrow). In (C) **HaAlobone[®] - 7 days**, the biomaterial (red arrows) was surrounded by connective tissue and inflammatory response was visible. (Images HE, 400X).

Figure 12. In (A) **HaP, 15 days**, the biomaterial (red arrow) was surrounded by the fibroblastic proliferation process. The presence of multinucleated giant cells and macrophages (yellow arrows) near the biomaterial was observed. In (B) **HaCol, 15 days**, around the biomaterial (red arrows) the fibroblast proliferation process was already starting. There was a reduction in the inflammatory infiltrate and macrophages predominated. Multinucleated giant cells were present (yellow arrows). In (C) **HaAlobone[®], 15 days**, it was observed that around the biomaterial (red

arrows) the process of fibroblastic proliferation had already begun. There was a reduction in the inflammatory infiltrate and macrophages predominated (yellow arrows). (Images, HE, 400X).

Figure 13. In (A), **HaP, 30 days**, the formation of a fibrous capsule was observed around the biomaterial (red arrows). Inflammatory infiltrate was not evident; there were few macrophages and giant cells were present (yellow arrow). In (B) **HaCol, 30 days**, the biomaterial was surrounded by a fibrous capsule (red arrows). There was minimal inflammatory infiltrate, with the presence of macrophages and multinucleated giant cells (yellow arrows). In (C) **HaAlobone[®], 30 days**, the formation of a fibrous capsule around the biomaterial (red arrows) was evident. Inflammatory infiltrate was not visible. Macrophages and multinucleated giant cells were present (yellow arrows). (Images, HE, 400X).

ARTIGO 2

Histomorphometric and radiographic analysis of biological responses following the use of pure hydroxyapatite and hydroxyapatite with collagen: a study in a rat critical-size calvarial defect model

Goiris, F.A.J. 1), Antunes, S. 2), Santos, F.A 1), Campagnoli, E.B, 3), Alves, E.D.M. 4), De Lara, E.5), Wakasugui, M.T. 5), R. Nakakogue, 5) Otuki, M. F. 6)

1) Professor of Periodontics, Faculty of Dentistry, Ponta Grossa State University - UEPG, Paraná State, Brazil

2) Professor of Chemistry, Department of Chemistry, UEPG, Paraná State, Brazil

1) Professor of Periodontics Faculty of Dentistry, UEPG, Paraná State, Brazil

3) Professor of Stomatology, Faculty of Dentistry, UEPG, Paraná State, Brazil

4) MA and PhD in Implant Dentistry at the Post Graduate Center São Leopoldo Mandic, Campinas, São Paulo

5) Student of Faculty of Dentistry UEPG

6) Professor of Biochemistry, Department of Biochemistry, UEPG, Paraná State, Brazil

Abstract: The application of bone substitutes, such as hydroxyapatites (Ha) in lesions or defects that compromise human bone has been the subject of intense research. Several *in vivo* studies in rats have demonstrated that biomaterials, particularly calcium phosphate compounds, have shown biocompatible behavior without resulting in the rejection of the implant or the presence of an excessive inflammatory reaction. This study used the guided bone regeneration (GBR) technique and two new forms of hydroxyapatite (with and without collagen) on 60 female rats. The histopathological results showed the biocompatibility of the biomaterials, with high inflammation in the first seven days, while in the final 30 days there was a reduction in the inflammatory response and new bone formation. When compared with a hydroxyapatite that is already commercially available, these new biomaterials showed similar biological behavior. Comparing pure Ha with Ha with collagen there were no significant difference in relation to biocompatibility.

Keywords: hydroxyapatite; *in vivo*; guided bone regeneration; biocompatibility.

Introduction

Because of its similarities in terms of chemical composition and properties compared to natural bone, hydroxyapatite (HA) has been widely used as a bone substitute, among other applications. Porous hydroxyapatite should fulfil the following requirements for the formation of a suitable osteoconductive scaffold in bone regeneration: biocompatibility; osteoconductivity; interconnected porous structures; mechanical strength and biodegradability. These factors provide an appropriate strategy for bone tissue engineering that is called "osteoconductive porous scaffold", which acts in combination with osteoinductive and osteogenic molecules or cells (1).

This study analyzed the biological behavior of two forms of hydroxyapatite that were developed by the Chemistry Department of the State University of Ponta Grossa (UEPG); pure hydroxyapatite and hydroxyapatite with collagen (2, 3) and compared them with a form of hydroxyapatite that is already commercially available - Alobone® (4). The study was performed using a critical size defects model in the calvaria of rats and histomorphometric analysis was subsequently performed.

In order to obtain the hydroxyapatites, the technique of wet or humid precipitation was used, employing calcium and phosphorus precursors with the systematic control of the temperature and pH of the solution. The precipitated powder was then calcined at high temperatures in order to obtain a sintered and stoichiometric apatite (5).

This study used 60 rats, which were divided into four groups. The following three types of materials were placed in the calvaria of 45 of the rats: pure hydroxyapatite; hydroxyapatite with collagen; and commercial hydroxyapatite (Alobone®). A group of 15 rats were used as control and the biomaterials were not used with these animals. The results indicated that the three biomaterials were biocompatible. In the first weeks there was a large inflammatory infiltrate, with the presence of large numbers of neutrophils and macrophages. In the fourth week the infiltrate virtually disappeared and there was a predominance of multinucleated giant cells around a fibrous capsule, which surrounded the biomaterial. New bone formation was also evident.

Materials and Methods

Obtaining and characterizing the biomaterial:

The hydroxyapatite powder was obtained by the precipitation method, combining H_3PO_4 (Nuclear P.A. 85%) with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Vetec, P.A. 95%) at a molar Ca/P ratio of 1.67 in an aqueous medium. After the acid solution was added the pH was adjusted to 10 with NH_4OH

(Reatech, P.A. 28%). The precipitate was aged for 76 h, filtered under vacuum and the resultant precipitate of each sample was dried in an oven at 100 °C for 24 hours. The hydroxyapatite obtained by this method had a nanocomposite structure (particles) and an average below 50 nm, whereas the particle agglomerates had an average that ranged from 6 to 9 micrometers. Other authors used mechanical methods to obtain a similar nanocrystalline hydroxyapatite with crystallite size in the range of 22 nm to 39 nm (6). In our research bovine collagen was added and solubilized in water by the ultrasound method for one hour and then lyophilized. The samples were characterized by X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopy with field emission (EG-SEM). The characterization of the three biomaterials by scanning electron microscopy with field emission (EG-SEM) and XRD is shown below (Figure 1 to 8).

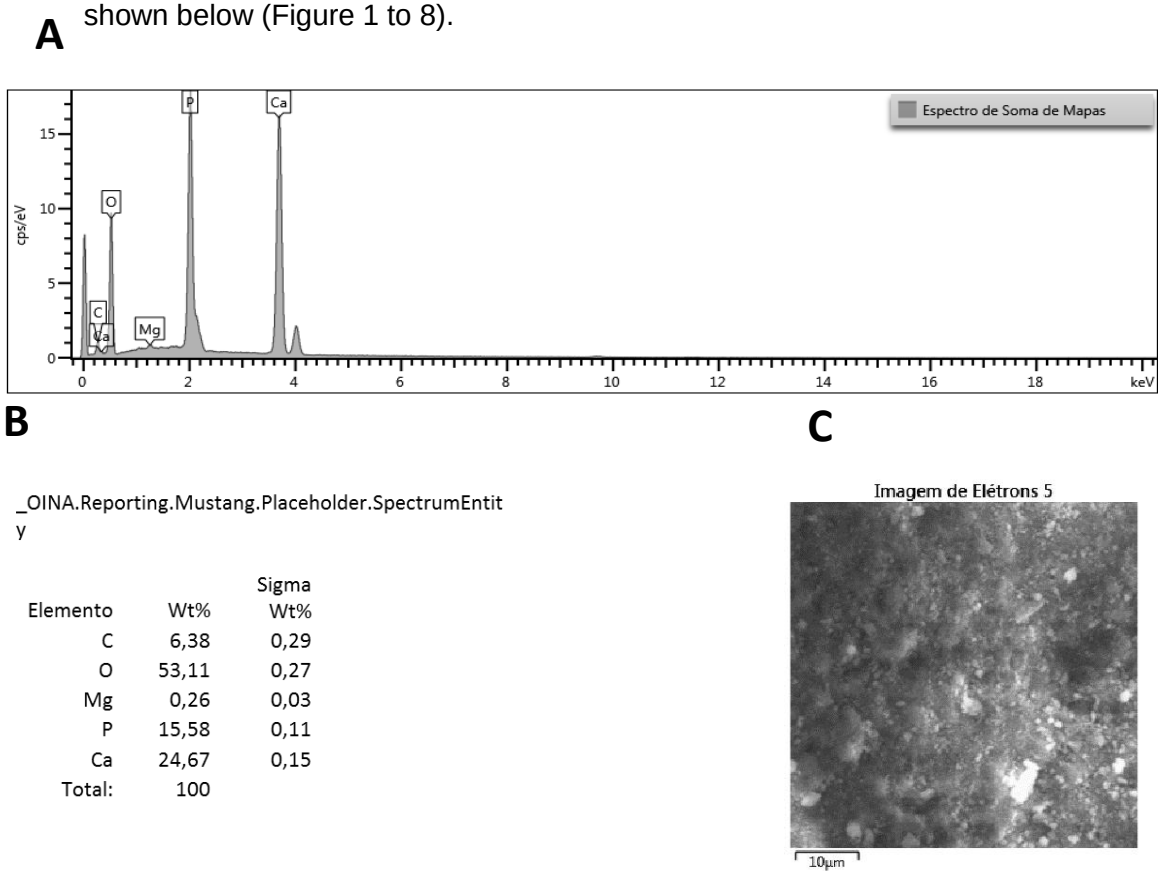


Figure 1, HaAlobone: In (A) and (B) hydroxyapatite composition. In (C), MEV micrograph.

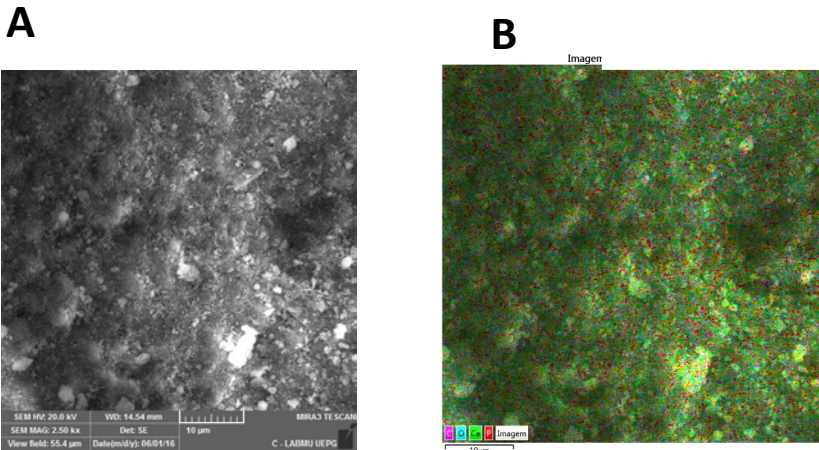


Figura 2, HaAlobone®: In (A) the SEM micrograph. In (B) energy dispersive X-ray spectroscopy or EDS from the same sample.

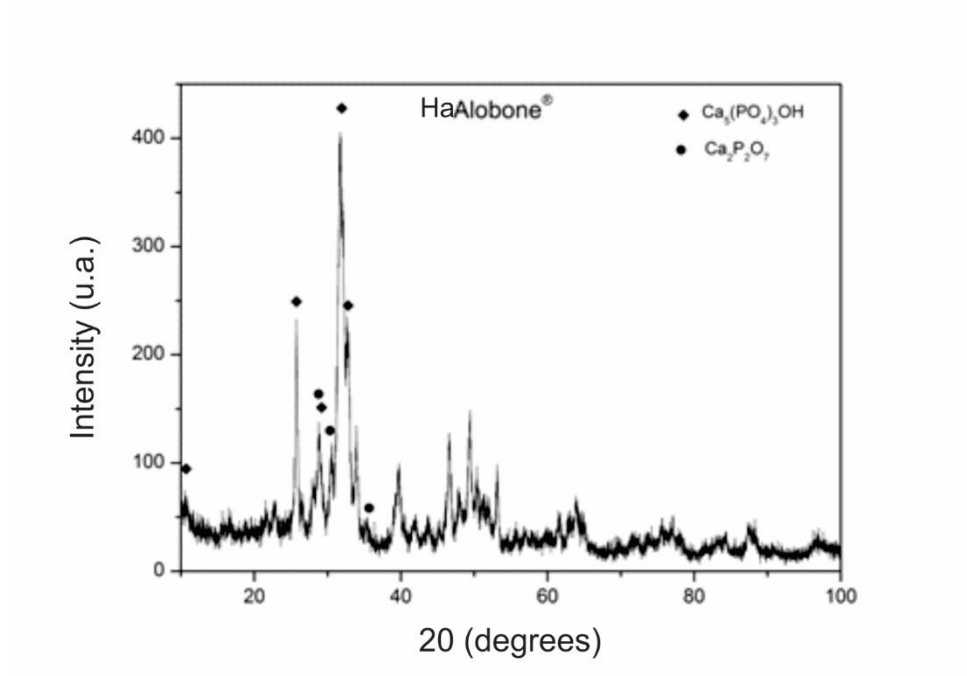
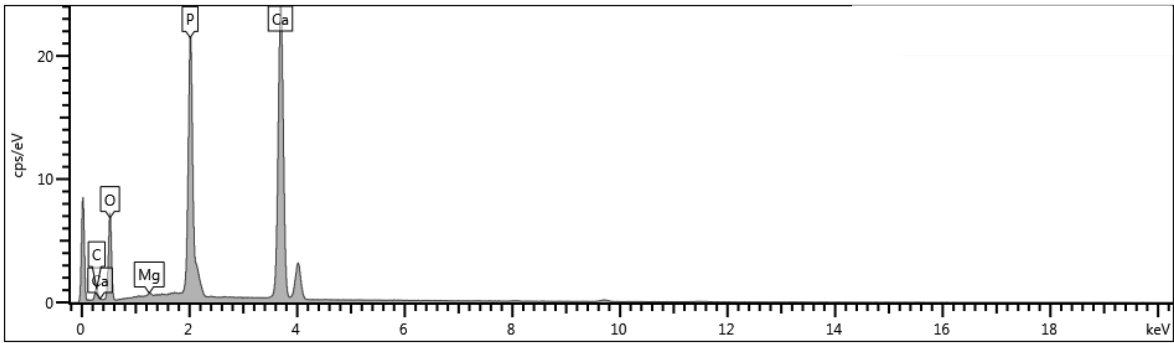


Figure 3. Thin-film X-ray diffraction pattern of the mineralized deposit (HaAlobone®). This material has in its composition a Gamma Phase - no hydroxyl ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ - calcium phosphate), around 32 degrees and is less than 10% pure hydroxyapatite.

A



B

_OINA.Reporting.Mustang.Placeholder.SpectrumEntit
y

Elemento	Wt%	Sigma Wt%
C	7,06	0,24
O	43,49	0,24
Mg	0,23	0,03
P	16,78	0,1
Ca	32,44	0,16
Total:	100	

C

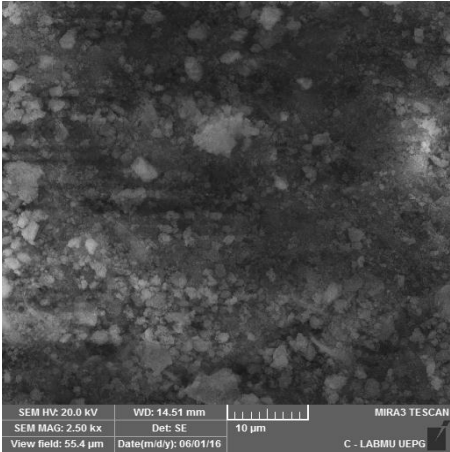
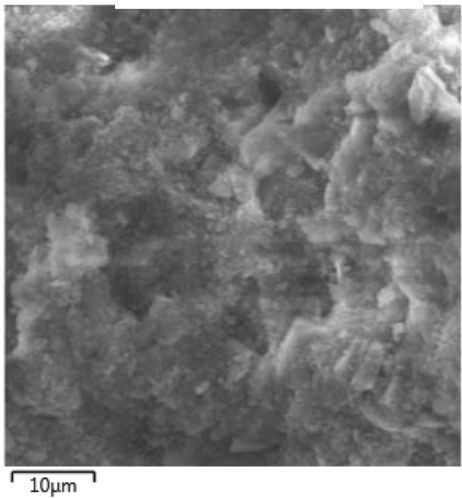


Figure 4, HaP: In (A) and (B), hydroxyapatite composition. In (C), MEV micrograph.

A



B

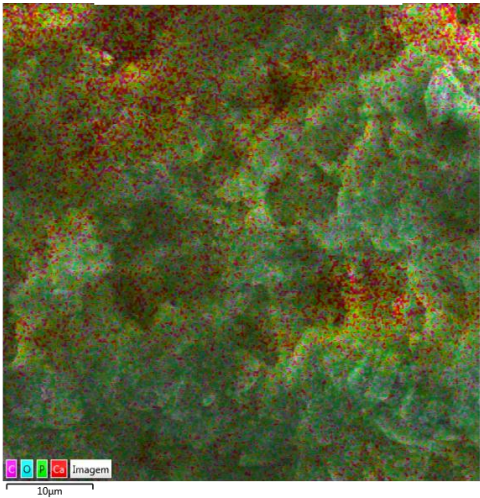


Figure 5, HaP: In (A) SEM micrograph. In (B) energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) from the same sample.

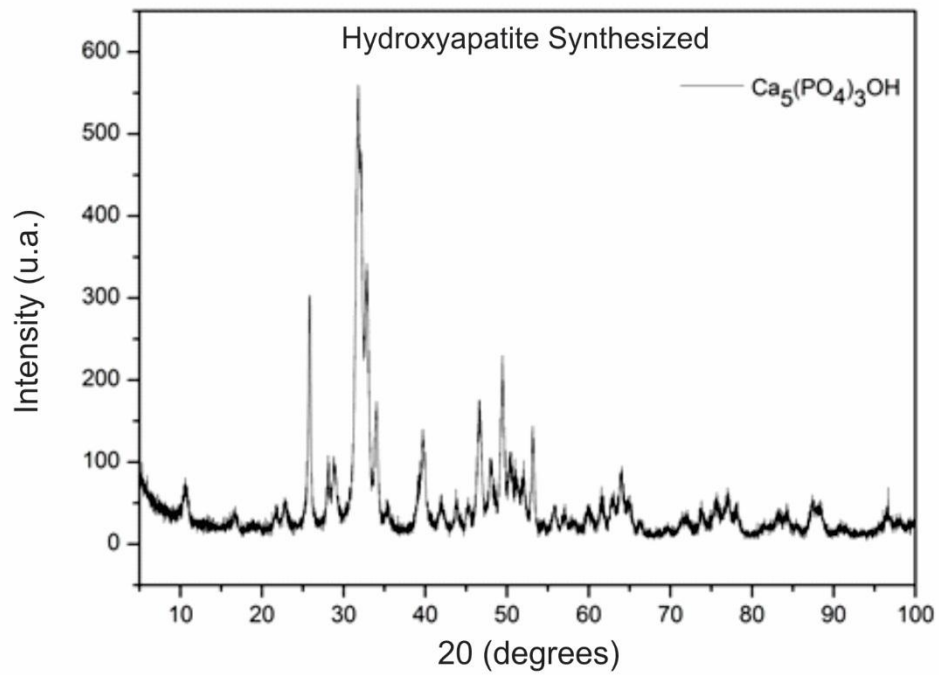


Figure 6. HaP: Thin-film X-ray diffraction pattern of the mineralized deposit. Hydroxyapatite $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ is usually written as $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ to denote that there are two molecules in the formation of the crystalline unit cell.

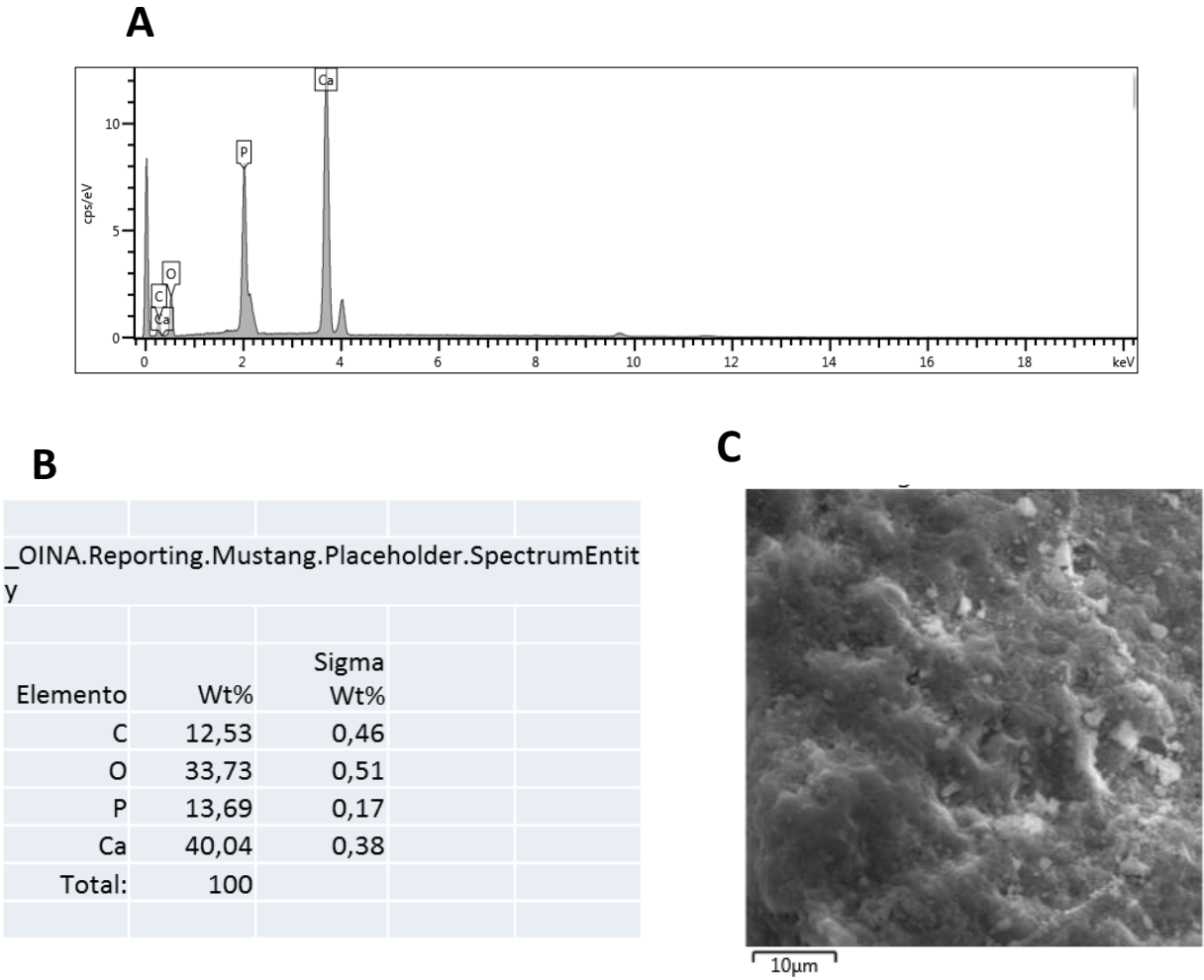


Figure 7, HaCol: In (A) and (B), hydroxyapatite with collagen. In (C), MEV micrograph.

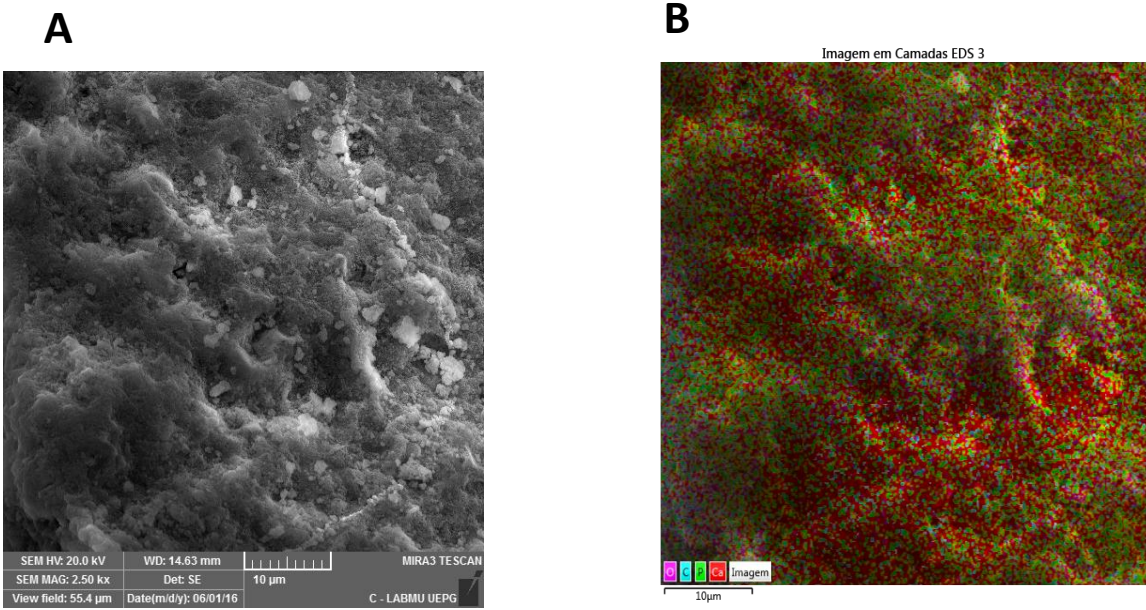


Figure 8, HaCol: In (A) SEM micrograph. In(B) energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) from the same sample.

Analysis of biocompatibility:

The animals were obtained from controlled reproduction at the vivarium of the UEPG. The rats were of the *rattus norvegicus albinus* species and the Wistar variety. The animals were aged around three months and their body weight ranged from 250 to 300 grams. They were randomly distributed in different groups. The animals were sacrificed (each group, n = 15) at 7, 15 and 30 days to verify the biological behavior of the tissues and cells around the implanted biomaterial. The surgical procedures were performed at the Oral Pathology Laboratory of the Department of Dentistry at UEPG and the biopsied specimens were processed and stained at the Medical Pathology Laboratory of the city of Ponta Grossa. The research project was approved by the Ethics Committee on Animal Use at the Ponta Grossa State University (UEPG) in accordance with Process CUA 22/2012, UEPG Protocol, 08258/2012. A pilot study was performed prior to the experiment to determine the ideal anaesthetic for the animals, to practice the surgical procedures, and to determine the surgical protocol, including biopsies.

Surgical procedure and post-operative care:

The animals underwent general anesthesia intraperitoneally (IP) using 100 mg/ml ketamine, (injectable general anesthetic based on 1.16 g hydrochloride ketamine,. 10 ml, Ceva Brasil®) by dilution of 3.75 ml of this ketamine solution together with the muscle relaxant xylazine, 100 mg/ml (xylazine, 200mg ; 10 ml bottle, veterinary use, imported, Hertape Calier®), at a ratio of 0.5 ml of xylazine diluted in 5.75 ml of distilled water. Each animal was administered with 0.2 ml per 100 g weight. The use of ketamine together with xylazine produced anesthesia and sedation in the animals within 30-40 minutes (7).

This study used 60 female rats (n=60), in which the following three different biomaterials were implanted: pure hydroxyapatite (UEPG); hydroxyapatite-collagen (UEPG); and commercial hydroxyapatite (Alobone®). The animals were randomly divided into the following four groups for treatment, based on calvarial defect filling material: 1) Ha- Alobone® group (n = 15); 2) Pure Ha group (n = 15); 3) Ha-collagen group (n = 15); and 4) Control group (n = 15), which used no type of filling material. After anesthesia, trichotomy of the fronto-parietal region of the animal's head was performed using an electric shaving appliance and local asepsis using 10% povidone-iodine. A triangular format was used to perform a mucoperiosteal incision with a No. 15 razor scalpel in the calvaria of the rats. A Molt periostómo and a No. 1 Ochsenbein (SS WHITE) chisel were used to ensure that the full thickness of the flaps was obtained and that the cortical bone of the region were completely exposed.

Bicortical, full-thickness, critical defects were created in the fronto-parietal region of each animal using an 8.0mm outer diameter trephine. The critical size defect with trephine was performed with sufficient irrigation using saline. The physical barrier placed over the critical defect consisted of a *Heli Tape* (Integra Life Sciences Corporat[®], USA) absorbable collagen wound dressing. The dura under the critical defect was obligatorily kept intact (see Figure 9 A). After removal of the outer and inner cortical strips the critical defects (8.0 mm diameter) were only filled with blood clot, and only with collagen membrane (for the control group). In the experimental groups the defects were filled with biomaterials and then collagen membranes were put in place (see Figure 9 C). Then the flaps were repositioned using No. 3 black silk thread (Ethicon, Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brazil) sutures. The animals showed no bleeding or any other systemic condition that could exclude them from the study. A metal-amalgam port (Golgran[®]) was used for the placement of the biomaterials with a uniform internal depth so that the amount of implanted material in the submucosa was the same for all the animals. The hydroxyapatite was previously hydrated with saline solution. After the placement of the biomaterials, interrupted sutures were used on the animal's back with No. 3 black silk thread (Ethicon, Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brazil) so that the healing occurred by first intention.

After the surgical procedures, the animals received analgesic and anti-inflammatory ketoprofen (IP) that was injected in a single dose at a ratio of 2 mg/kg and they were placed in special cages (exposed to low light) to recover from the anesthesia. The temperature in the immediate post-operative environment ranged from 27 to 30 °C to avoid hypothermia. The immediate consumption of water was monitored to avoid dehydration. In the following days the food was normal and the administration of water was ad libitum. There was no postoperative death of the animals.

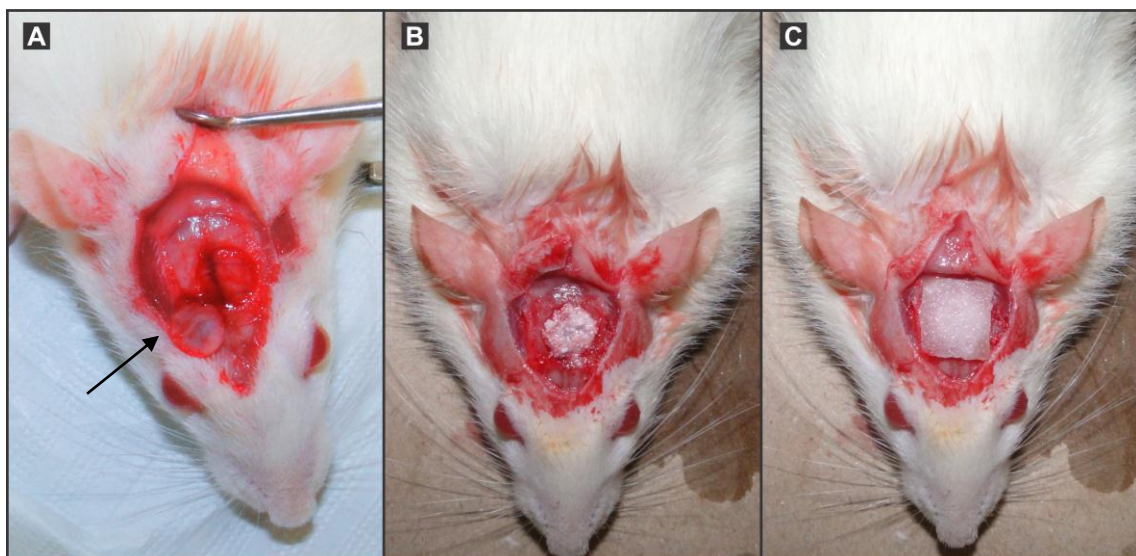


Figura 9. In (A) after carefully removal (to prevent damage to the dura) of the outer and inner cortical strips the critical defects (8.0 mm diameter- see the cortical cover pointed to by an arrow). In (B) the defects were filled with biomaterials; in (C) collagen membranes were put in place and then flaps were carefully sutured.

Obtaining biopsies and histotechnical preparation:

The animals (n = 15 for each period) were sacrificed at 7, 15 and 30 days after surgery by an overdose of isoflurane - 240 ml bottle - (inhalation solution indicated in humans for the induction and maintenance of general anaesthesia). Under the effect of isoflurane, each animal underwent cervical dislocation with a metal bar order to confirm euthanasia. The biopsies of the fronto-parietal region of the animals were performed in line with the following routine: trichotomy and using a disc-shaped rotary tool under low speed to remove the fronto-parietal bone of the animals. The biopsies were fixed in 4% formalin that was buffered for 48 hours. The biopsies were decalcified with EDTA to 7% for 21 days.

Histotechnical procedure and histomorphometric analysis:

The decalcified tissue were subjected to the standard procedure for histotechnical staining - hematoxylin and eosin. The pieces were placed in a paraffin block for the cutting by microtome (approximately 5-7 mm thickness). The slides were analyzed (by a single professional) and a descriptive and semi-quantitative analysis was performed. The numerical correlation references adopted for the presence or absence of those parameters were as follows: osseous repair, connective tissue repair (presence of collagen fibers) and inflammatory infiltrate (predominance of a particular type of inflammatory cell): 0 = absent; 1 = mild; 2 = moderate; 3 = severe (8).

Radiographic processing and analysis:

Radiographic processing and analysis Standardized radiographic images of the rat calvaria gross specimens were obtained using a dental radiographic unit (70 kVp, 7mA for 1 s; Gendex 770, Gendex Corporation, Des Plaines, IL, USA) and No. 2 Kodak Ultra-speed X-ray film (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA). The calvaria gross specimens, recorded individually, were placed on the radiographic film, the defect area placed flat on the film and the X-ray source directed perpendicular to the film/gross specimen. The X-ray source–film distance was 12 in. Radiographs were processed in an automatic dental film processor (A/T 2000, Air Techniques, Hicksville, NY, USA). The radiographs (analog films) were transformed into digitized images using a film scanner (620ST AcerScan, San Jose, CA, USA) at 1200 dpi, which was connected to a standard PC (Pryor et al. 2006).

In our research we performed the design of the critical bone defect ('critical size defects') with a circle, as carried out on digital radiographs of rats' calvaria (Roh et al., 2016). The same and only observer analyzed the images, which had been used in the Kappa system of the histological analysis to distinguish the different radiographic scores – 0, 1 and 2 (Pryor et. al.⁴⁶ 2006).

Statistical analysis:

Data were statistically analyzed using the Non-Parametric Kruskal–Wallis test with Dunn's test (for multiple comparisons) to study the subcutaneous tissue response to different biomaterials. Statistical analysis was performed with IBM® SPSS® (SPSS Inc., IBM Corporation, NY, USA) Statistics Version 21 for Windows. Observed significance levels, as indicated by an asterisk in the figures, were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results

Figure 10 shows the inflammatory response at 7, 15, and 30 days for all the groups. Figures 11-13 illustrate the histopathology of the experimental groups and the figures 14-16 shows radiographic findings.

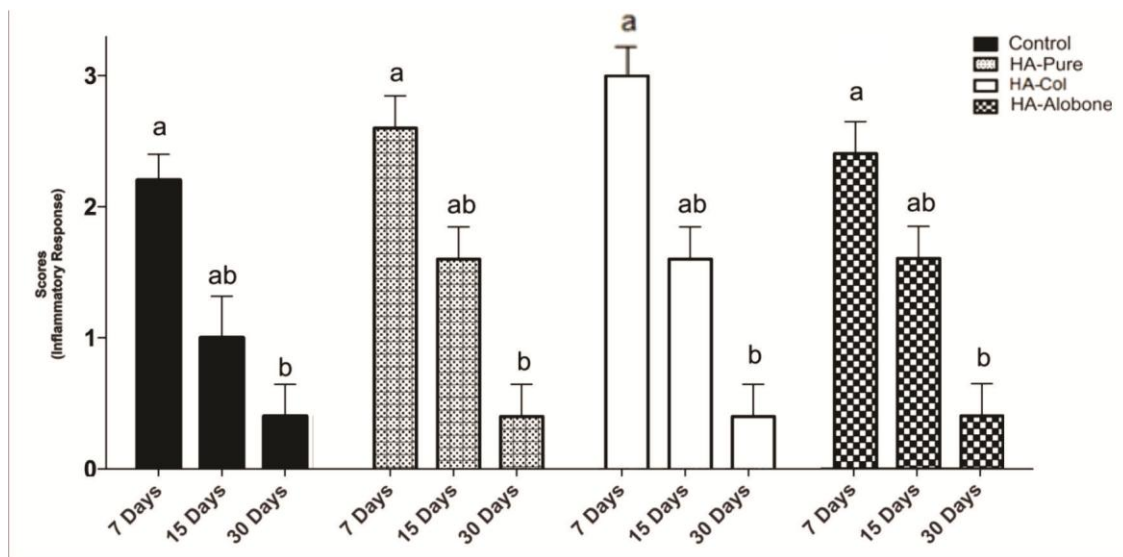


Figure 10. Comparison between different groups at each time point (Kruskal-Wallis test); $p > 0.05$, no significant difference.

Comparison between different times in the same group (Kruskal-Wallis test with Dunn's post test)
Different letters ($p < 0.01$, significant) for biomaterials.

The results showed no significant differences between the groups, when they were compared at each of the evaluated time periods. In terms of the same group at the different time periods, the inflammation at seven days was greatest, reducing by day 15 (with no

significant difference); there was also no significant difference between 15 and 30 days. However, the differences were significant for the values between seven and 30 days. This behavior was observed in all the groups.

7 days

In the first week after surgery an increase was observed in the values for inflammation in all the groups. Neutrophils and macrophages were present in all the groups and the biomaterial was dispersed in the area of the critical defect. Granulation tissue was present in all the groups. Figure 11.

15 days

At this time there was a decrease in the inflammatory response in all the groups. The control group, which only contained collagen membrane, showed the greatest reduction in inflammation. The increased formation of collagen tissue was observed within the granulation tissue. The development of new blood vessels in the developing granulation tissue was observed. Osteoblasts and macrophages were the predominant cells. Figure 12.

30 days

There was a significant decrease in the inflammatory response in all the groups, especially when compared to the period of seven days. There were extensive areas of new bone formation. There was a predominance of osteoblasts, osteocytes and macrophages but in lower quantities. The mature bone tissue showed cement lines in contact with the new bone. Figure 13.

Radiographic Results:

Regarding radiographic results, the correlation between histological scores considering collagen fibers, inflammatory infiltrate (0 = absent; 1 = discrete; 2= moderate; 3 = intense), according to Mendonça et Al 2007; and the x-ray analysis scores (0 = not closed; 1 = partially closed; 3 = completely closed), according to Pryor et al. 2005b, can be seen in Table 1.

Variables	Correlation coefficient	P
(n=21)	(Spearman)	value
Histological scores	-0.583	0.006*
X		
X-ray scores		

*Significant correlation – $P < 0,05$

The results of the correlation between histological and x-ray scores show that there was *negative correlation*. This means that when one of the variables increases the other decreases. In such case, we understand that from the moment the inflammatory response scores decrease, the tissue recovery with radiographic bone neoformation increases. Therefore, with the inflammation reduction, the increase in bone formation in the region of the bone defect starts to occur (Figure 14, 15 and 16).

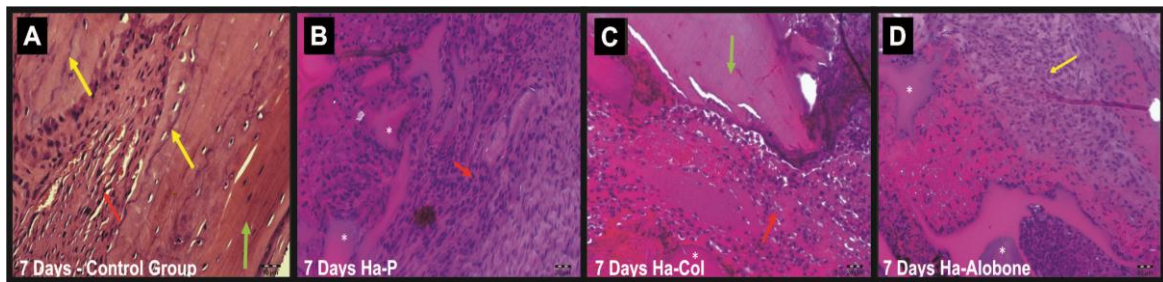


Figure 11. Control Group, 7 days: In (A) early bone formation (yellow arrows) and organized collagen tissue (red arrow). The pre-existing mature bone had lamellae characteristics (green arrow). (Images HE 400X). **HaP, 7 days:** In (B) dense inflammatory infiltrate with neutrophils and macrophages. The biomaterial was dispersed in the connective tissue (asterisks). Granulation tissue was present (red arrow). **HaCol, 7 days:** In (C) dense inflammatory infiltrate with neutrophils and macrophages. The biomaterial appeared in the conjunctive tissue (asterisk). The presence of granulation tissue (red arrow) was observed. Note the pre-existing mature bone tissue (green arrow). **HaAlobone®, 7 days:** In (D) dense inflammatory infiltrate with neutrophils and macrophages. The biomaterial (*) was dispersed in the connective tissue. Granulation tissue (yellow arrow) was observed.

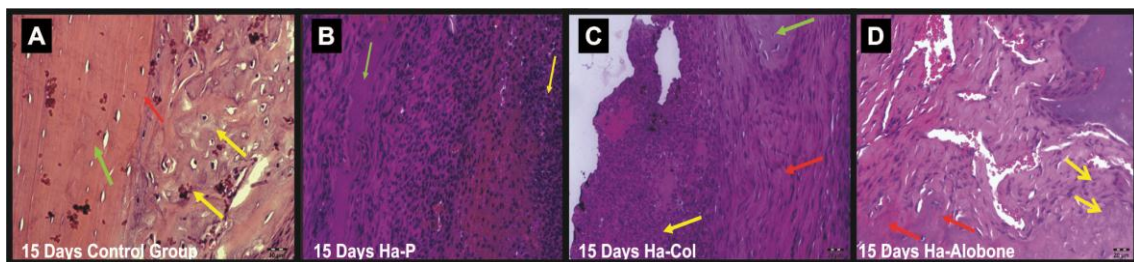


Figure 12. Control Group, 15 days: In (A), extensive bone formation (yellow arrows). The pre-existing mature bone had characteristics of lamellae (green arrow) and cement lines (red arrow). There were no signs of inflammation. (Images HE 400X). **HaP, 15 days:** In (B) inflammatory infiltrate and granulation tissue (yellow arrow). There was the formation of osteoid (green arrow). **HaCol, 15 days:** In (C) granulation tissue (yellow arrow). Organized collagenous tissue was present (red arrow). New bone formation appeared amid the organized collagen (green arrow). **HaAlobone®, 15 days.** In (D) a clear decrease in the inflammatory infiltrate and increased deposition of collagen fibers in the granulation tissue. Signs of new bone formation (red arrows) and the formation of osteoid (yellow arrows).

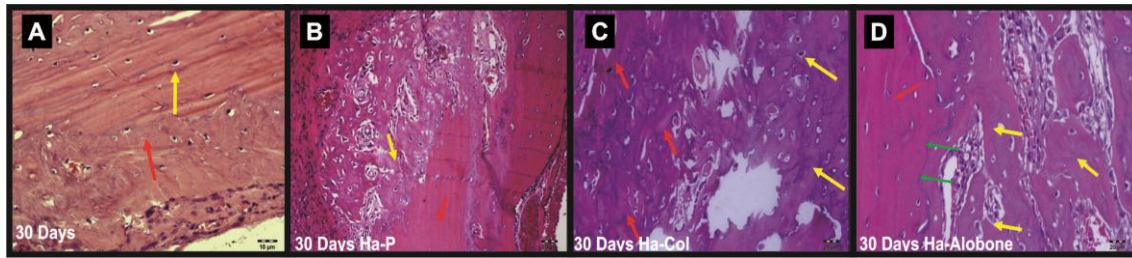


Figure 13. Control Group, 30 days: In (A) perfect inter-relationship between mature bone or pre-existing bone (yellow arrow) and the newly formed bone (red arrow). No sign of inflammation was observed. (Images HE 400X). **HaP, 30 days:** In (B) clear new bone formation with a predominance of osteoblasts (yellow arrow). The pre-existing old bone showed typical lamellae (red arrow). There were no signs of inflammation. **HaCol, 30 days:** In (C) large area of new bone formation. The presence of larger areas of calcification (red arrows) and areas of less calcification (yellow arrows). No further inflammatory process was observed. **HaAlobone® 30 days:** In (D) the absence of inflammatory infiltrate. Newly formed bone (yellow arrows) predominated. The pre-existing old bone (red arrow) showed cement lines (green arrows) in contact with the new bone. Osteoblasts and osteocytes were the predominant cells.

Radiographic findings:

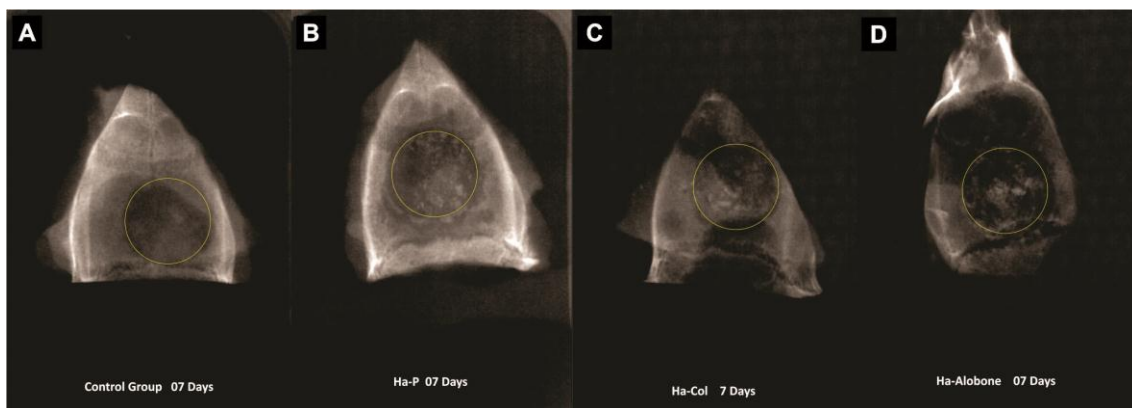


Figure 14. Control Group, 7 days: In (A) a radiolucent area, but there was early new bone formation on the margins of the critical defect. As no material was used in this group, it was not observed. **HaP, 7 days:** In (B) the material was dispersed in the area of the critical defect and there were radiolucent areas, which were typical of inflammation. **HaCol, 7 days:** In (C) radiolucent image in the area of the critical defect. The biomaterial was dispersed. **HaAlobone®, 7 days:** In (D) dispersed material in the critical defect and even in adjacent areas. Extensive radiolucent areas were present, which corresponded to the granulation tissue.

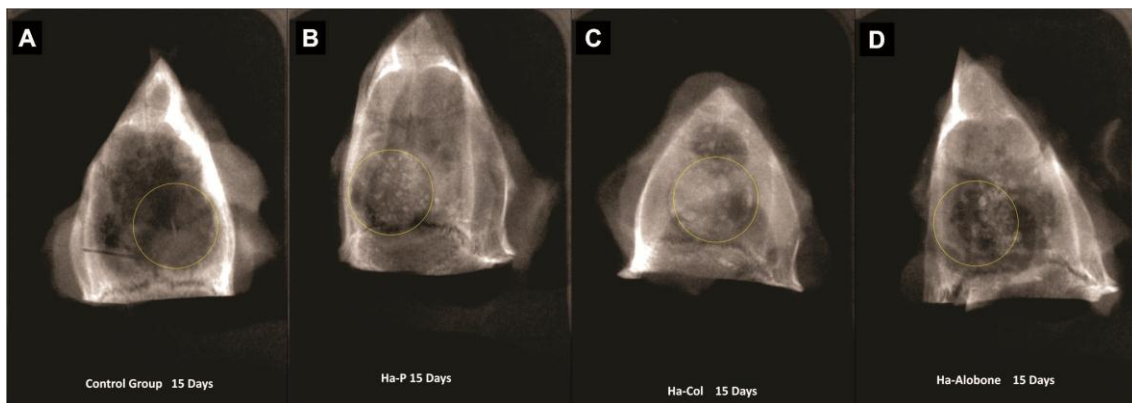


Figure 15. Control Group, 15 days: In (A), there was extensive new bone formation from the margins of the critical defect. However, there were still areas with radiolucent images. **HaP, 15 days:** In (B) new bone formation within the critical defect, but with radiolucent areas and dispersed material. **HaCol, 15 days:** In (C) radiolucent areas, but the formation new bone was present. The material remained dispersed inside and outside the critical defect. **HaAlobone®, 15 days:** In (D) a decrease in the radiolucent area compared to what was observed at seven days. New bone formation was present on the margins of the critical defect. Material was dispersed in the critical defect.

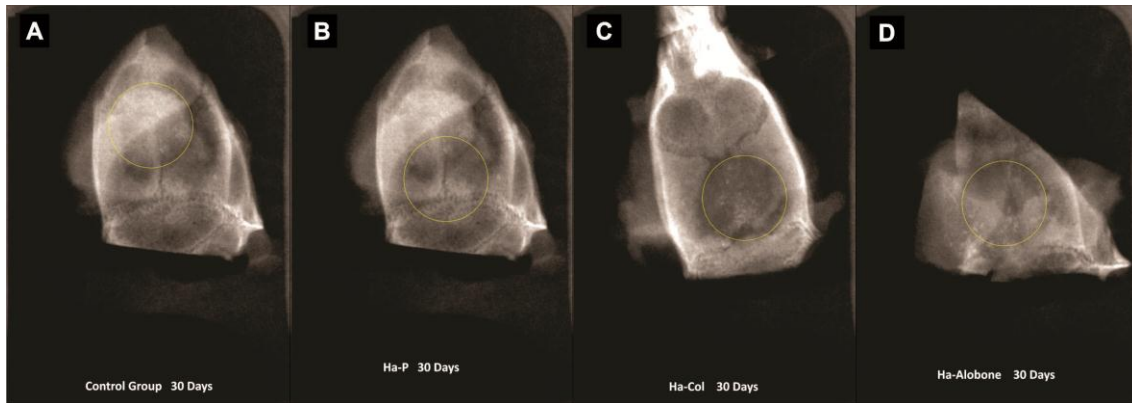


Figure 16. Control Group, 30 days: In (A), there was extensive new bone formation from the margins of the defect. No radiolucent areas were observed. **16 HaP, 30 days:** In (B) new bone formation within the critical defect, but with radiolucent areas. Little dispersed material. **HaCol, 30 days:** In (C) radiolucent areas, but there was evident new bone formation. A small portion of the material remained dispersed within the critical defect. **HaAlobone® 30 days:** In (D), there was a decrease in the radiolucent area. New bone formation was present on the margins of the critical defect, but there was still dispersed material in the defect.

Discussion:

Hydroxyapatite is the main inorganic calcium phosphate mineral component in bones and teeth. This research used a porous hydroxyapatite (Pha), which is a material with faster resorption and is more osteoconductive than dense Ha (Dha) (10, 11). It has been used in many experimental and clinical trials as material for artificial bone grafts. In the case of Pha, extracellular fluid induces disintegration of the ceramic granules, allowing the gradual growth of bone tissue into the spaces among them without the interposition of fibrous tissue (12). The synthetic biomaterial used in our research was also a nanocrystalline hydroxyapatite (nHAp) with a particle size smaller than 50 nm. According to Sun, Zhou and Lee (13), nHAp can be combined with various types of bioactive polymers to generate highly porous biocomposite materials that are used for osteoconduction. The benefits of synthetic grafts include their availability, sterility and reduced morbidity (14).

The aim of this study was to evaluate the reaction of tissues to two types of synthetic hydroxyapatites (HaP and HaCol), which were produced by UEPG, and to compare them to a third type, which was the standard (HaAlobone®). In our study there was no significant difference between pure hydroxyapatite (HaP) and hydroxyapatite with collagen (HaCol) in relation to inflammatory response, biocompatibility, new bone formation and the biodegradability of the material deployed in a critical defect in the calvaria of rats. In conjunction with previous reports about in vivo bone regeneration (15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22) the results of the present study have shown that the histological response could be used as a preliminary source of information regarding the biocompatibility and biodegradability of material implanted in the calvaria of rats.

The implantation of biomaterials in the critical calvarial defect of rats has been widely accepted as an important test to assess biocompatibility, biodegradability and osseous healing. An 8mm diameter calvaria osteotomy defect has been suggested as being suitable to assess specific biomaterial for bone regeneration, and it constitutes a critical-size defect in the rat (23). Defects of a size that will not heal during the lifetime of the animal are termed critical size defects (CSDs). In fact, animal models, and more specifically rodent models, have been extensively used and have contributed greatly to the development and establishment of a wide range of translational approaches designed to regenerate bone tissue. (24, 25).

With regard to inflammatory response and bone formation, our research results showed no significant differences between the groups when they were compared in each of the periods that were assessed. The differences were significant for values between seven and 30 days. This behavior was observed in all the groups. At seven days there was an increase in the values for inflammation in all groups. Neutrophils and macrophages were present in all the groups and biomaterial was dispersed in the area of the critical defect. Granulation tissue was present in all the groups. At 15 days this granulation tissue allowed the formation of collagen fibers inside the tissue, which started the osteoid formation process. New blood vessels also appeared. Macrophages, multinucleated giant cells and osteoblasts predominated in this period

At thirty days there was a significant decrease in the inflammatory response in all the groups compared to the situation at seven days. New bone formation was evident and extensive. Bone regeneration mainly depends on the activity of pre-osteoblastic cells and various mechanisms that regulate their proliferation and differentiation. The establishment of a blood vessel network by vasculogenesis and angiogenesis is essential for cellular gaseous exchange, nutrient supply and waste product removal during new tissue formation (26).

Wang, Gerstenfeld and Glimcher (27) and Alexander (28) noted that in the calvaria of mice there was little evidence that ossification occurred through the classical sequence of endochondral mineralization, which is perceived as an intra-membranous type of calcification where, in the presence of granulation tissue, stem cells begin a process of regeneration to differentiate into osteogenic cells. In our study, at seven days all the groups presented granulation tissue. This tissue dwindled and finally disappeared as the presence of collagen fibers and osteoid tissue intensified. Al-Hezaimi et al. (22) evaluated the potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) to regenerate bone in an established rat calvarium model in real time. The evidence of new bone formation (NBF) treated with BMSCs appeared as early as two weeks. Similarly, in our study the new formation of bone tissue in the critical defect of calvaria in rats also began around 15 post-operative days. Calcification increased with time, and at 30 days there was extensive formation of bone within the defect. The results of an experimental study also found that by the 14th day of cellular differentiation, calcium and phosphate deposition has started, thereby forming new mineralized tissues. At the same time, the authors observed that there was a synergistic relationship between osteocytes and osteoblasts in producing biochemical signals to stimulate the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) – (29). In fact, osteoblasts, differentiated from MSCs, secrete the organic bone matrix and induce mineralization (30).

In critical defects produced in rat calvaria, one of the original sources of MSCs is the periosteum that remains around the defect (32). Dimitriou, Tsiridis and, Giannoudis (31) indicated that during fracture healing, potential sources of stem cells include bone marrow, granulation tissue, the deep layer of the periosteum, the endosteum, and the surroundings soft tissues. Furthermore, perivascular mesenchymal stem cells that exist in blood vessel walls contribute to fracture or can the healing of osseous damage. During this form of osseous repair, initially, the haematoma is formed and then inflammation occurs. The major factors at this initial phase inflammatory include cytokines, platelets, bone morphogenetic proteins (BMPs) and mesenchymal stem cells (MSCs).

This form of healing of bone tissue has been associated with the presence of macrophages, which, together with fibroblast cells, are typical components of granulation tissue (9). Inflammatory monocytes and tissue-resident macrophages are key regulators of tissue repair, regeneration, and fibrosis (33). In our study, the biodegradability of material was evident (verified through histopathological data and radiographic images) and it was attributed in part to macrophages activities, which fused to form multinucleated giant cells. At 30 days very little material was still present inside the critical bone defect. In relation to macrophages, Loi et al. (30) found that there was a population of bone-specific resident

macrophages named osteomacs residing in the periosteum and endosteum, which participated in the regulation of fracture healing. Osteomacs were specifically associated with sites of intramembranous bone deposition.

With regard to the radiographic findings of this study, Pryor et al. (34) found that radiographic evaluations of the healing process of critical-size calvaria osteotomy defects had the potential advantage of being less costly and time consuming than the “gold standard” protocol of histologic analysis; however, their validity has not been fully explored. When no/limited and partial bone fill occurred, the radiographic analysis tended to overestimate bone fill, and underestimate bone fill when complete closure of the defect sites was observed in the histologic analysis. The authors (34) concluded that radiographic evaluations of bone fill in rat calvaria osteotomy defects yielded a low level of accuracy. The evaluation of bone formation in animal models aimed at treatment recommendations for clinical application should not be solely based on radiographic analysis, but should be confirmed using histologic observations. In our study, the radiographic images of critical-size calvaria osteotomy defects showed an appropriate agreement between the histologic and radiographic visual analysis (by using scores of 0, 1 and 2, Pryor et al., 34), especially in the first post-operative week, when there was extensive radiolucent images in the bone defect area and much bone formation (radiopaque images) at 30 days. The use of radiographs in our study was also useful to detect the presence and distribution of biomaterials inside the critical defect at the studied times. The implanted biomaterial did not completely disappear at 30 post-operative days. During this period there was much new bone formation, but some of the material still remained inside the critical defect. This occurred in all the experimental groups. On the other hand, multiple methodologies, including histological analysis, electron microscopy and radiological techniques, have reported relevant and complementary data, with proven adequacy, in the assessment of bone repair/regeneration process (25, 35 and 36).

Conclusion:

Based on the results of this study, it can be concluded that the pure hydroxyapatite and hydroxyapatite with collagen that were produced at the State University of Ponta Grossa (UEPG) and were tested in Critical-Sized Rat Calvarial Defects showed biodegradability, biocompatibility and promoting a new bone formation. There were no significant differences between both the biomaterials that were tested regarding biocompatibility and biodegradability. Compared with the standard hydroxyapatite (HaAlobone®) the two type of

hydroxyapatite produced by UEPG did not show significant differences in terms of in vivo biological behavior.

Bibliography:

1. Yoshikawa H., Myoui A (2005) Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. *J Artif Organs*. 8(3):131-6.
2. Orlovskii, V.P., Komlev V.S., Barinov, M (2002). Hydroxyapatite and Hydroxyapatite-Based Ceramics. *Inorganic Materials*, 38 (10), 973–984
3. Nishikawa, T; Masuno, K.; Tominaga, K.; Koyama, Y.; Yamada, T.; Takakuda, K.; Kikuchi, M.; Tanaka, J.; Tanaka, A. (2005) Bone Repair Analysis in a Novel Biodegradable Hydroxyapatite/Collagen Composite Implanted in Bone. *Implant Dentistry*, 14(3), 252-260
4. Conz, MB; Campos, CN; Serrão, SD; Soares, GA.,Vidigal, GM Caracterização físicoquímica de 12 biomateriais utilizados como enxertos ósseos na Implantodontia (2010) *Rev Implantnews*, 7(4), 541-6.
5. Kosachan N, Jaroenworarluck A, Jiemsirilers S, Jinawath S, Stevens R. (2015) Hydroxyapatite nanoparticles formed under a wet mechanochemical method. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 17.
6. Silva, C.C., Pinheiro, A.G, Miranda MAR, Góes JC, Sombra, ASB (2003) Structural properties of hydroxyapatite obtained by mechanosynthesis. *Solid State Sciences*, 5, 553–558
7. Mezdari, T.J; Tomaz V.A; Amaral V.L.L. (2004) Anestesia e analgesia em animais de laboratório. in: *Animais de laboratório: cuidados na iniciação experimental*. Florianópolis: Editora da UFSC,101-30.
8. Mendonça, RG, Freitas, A.C, Ramalho, LP Farias, JG, Ribeiro MM. (2007) Avaliação Histológica do Processo de Reparo Ósseo Após Implantação de BMPs. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.*,7(3):291-296
9. Tommila, M, Jokinen, J., Wilson, T., Forsback, A., Saukko, P., Tenttinen, R, Ekholm, E. (2008) Bioactive glass-derived hydroxyapatite-coating promotes granulation tissue growth in subcutaneous cellulose implants in rats. *Acta Biomaterialia*. 4 (2), 354–361
10. Dong, J., Kojima, H., Uemura, T., Kikuchi, M., Tateishi, T., Tanaka J. (2001) *In vivo* evaluation of a novel porous hydroxyapatite to sustain osteogenesis of transplanted bone marrow-derived osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res* 57: 208–216
11. Kwon, B, Kim,J., Kim, Y.H., Lee, MH, Baek, HS., Lee, DH, Kim, H.L., Seo HJ., Lee MH, Kwon, S., Koo, MA., Park, JC. (2013) Biological Advantages of Porous Hydroxyapatite Scaffold Made by Solid Freeform Fabrication for Bone Tissue Regeneration. *Artificial Organs*, 37(7), 663-670
12. Andrade JC, Camilli JA, Kawachi EY, Bertran CA.(2002), Behavior of dense and porous hydroxyapatite implants and tissue response in rat femoral defects. *J Biomed Mater Res*. 62(1):30-6.
13. Sun, F., Zhou, H., Lee, J. (2011). Various preparation methods of highly porous hydroxyapatite/polymer nanoscale biocomposites for bone regeneration. *Acta Biomaterialia* 7, 3813–3828
14. Moore WR, Graves SE, Bain GI. (2001) Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg.*; 71(6):354-61.

15. Marden LJ, Hollinger JO, Chaudhari A, Turek T, Schaub RG, Ron E. (1994) Recombinant human bone morphogenetic protein-2 is superior to demineralized bone matrix in repairing craniotomy defects in rats. *J Biomed Mater Res* ;28:1127-1138
16. Winn SR, Schmitt JM, Buck D, Hu Y, Grainger D, Hollinger JO. (1999) Tissue-engineered bone biomimetic to regenerate calvarial critical-sized defects in athymic rats. *J Biomed Mater Res*; 45:414-421.
17. Dupoirieux L, Pourquier D, Picot MC, Neves M. (2001) Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. *Int J Oral Maxillofac Surg*; 30:58-62.
18. Verna C, Bosch C, Dalstra M, Wikesjö UME, Trombelli, L. (2002), Healing patterns in calvarial bone defects following guided bone regeneration in rats: A micro-CT scan analysis. *J Clin Periodontol*; 29:865-870.
19. Blum J S, Barry M A, Mikos A G and Jansen J A (2003) *In vivo* evaluation of gene therapy vectors in ex vivo derived marrow stromal cells for bone regeneration in a rat critical-size calvarial defect model *Hum. Gene Ther.* 14, 1689–701
20. Hong S J, Kim C S, Han D K, Cho I H, Jung U W, Choi S H, Kim C K and Cho KS (2006) The effect of a fibrin-fibronectin/beta-tricalcium phosphate/recombinant human bone morphogenetic protein-2 system on bone formation in rat calvarial defects. *Biomaterials* 27, 3810–6
21. Silva AC, Oliveira MR, Amaral LF, Ferreira S, Garcia IR Jr, Mariano RC (2016) Effect of Doxycycline in Gel Form in Regeneration Bone: Histomorphometric and Tomographic Study in Rats Calvary (2015) *Journal of Periodontology*; 87(1):74-82
22. Al-Hezaimi K, Ramalingam S, Al-Askar M, ArRejaie AS, Nooh N, Jawad F, Aldahmash A, Atteya M, Wang CY. (2016). Real-time-guided bone regeneration around standardized critical size calvarial defects using bone marrow-derived mesenchymal stem cells and collagen membrane with and without using tricalcium phosphate: an *in vivo* micro-computed tomographic and histologic experiment in rats. *International Journal of Oral Science* 8, 7–15
23. Spicer, P.P. Kretlow, JD, Young, S, Jansen, JA, Kasper, K, Mikos, AG (2012) Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nature Protocols*, 7(10), 1918-29
24. Schmitz JP, Hollinger JO. (1986) The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res.* 205:299-308
25. Gomes, P.S.; Fernandes, M.H (2011) Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim.* 45(1):14-24
26. Black CRM, Goriainov, V. Gibbs, D., Kanczler, J, Tare1, RS, Oreffo, R (2015) Bone Tissue Engineering. *Curr Mol Bio Rep* 1:132–140
27. Wang, J., Yang, R., Gerstenfeld, L.C, Glimcher, MJ (2015) Characterization of Demineralized Bone Matrix-Induced Osteogenesis in Rat Calvarial Bone Defects: III. Gene and Protein Expression
28. Alexander, K.A., Chang, M., Maylin, E., Kohler, T., Muller, R., Wu, A., Rooijen, N.V., Sweet, MJ., Hume, DA., Raggatt, L., Pettit, A.R. (2011). Osteal Macrophages Promote In Vivo Intramembranous Bone Healing in a Mouse Tibial Injury Model. *Journal of Bone and Mineral Research.*, 26(7), 1517-1532
29. Birmingham E, Niebur GL, McHugh PE *et al.* (2012) Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *Eur Cell Mater*2; **23**: 13–27.
30. Loi, F. Córdova, L.A. Pajarinen, J, Lin, T,H, Goodman, SB. (2016) Inflammation, fracture and bone repair. *Bone.* 86, 119–130

31. Dimitriou, R., Tsiridis, E., Giannoudis, P.V. (2005) Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury, Int. J. Care Injured* (2005) 36, 1392—1404
32. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. 1998, *Clin Orthop* 355S:7—21.
33. Wynn, TA.; Vannella, KM. (2016) Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity*. 44 (3)450—462
34. Pryor, ME., Yang, J., Polimeni, G., Koo, KT, Hartman, MJ., Gross, H, Agelan, A., Joanne M. Manns, JM, Wikesjö, UF, (2005) Analysis of Rat Calvaria Defects Implanted With a Platelet-Rich Plasma Preparation: Radiographic Observations. *J Periodontol*, 76, 1287-1292
35. Notodihardjo, FZ, Kakudo, N., Kushida, S., Suzuki, K., Kusumoto, K. (2012) Bone regeneration with BMP-2 and hydroxyapatite in critical-size calvarial defects in rats. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 40, 287-291
36. Kim, S.M., Fan, H., Cho, YJ, Young, ME, Park, JH, Kim, BN, Lee, BC, Lee, SK. (2015) Electron beam effect on biomaterials I: focusing on bone graft materials. *Biomaterials Research* , 19:10-20

6 DISCUSSÃO

Esta pesquisa avaliou através de experimentos *in vivo* dois novos biomateriais de substituição óssea - hidroxiapatita pura e hidroxiapatita com colágeno - visando determinar a sua biocompatibilidade em tecidos moles e a sua capacidade de possibilitar a neoformação óssea em defeitos críticos em calvária de ratas.

Em experiências com animais, demonstrou-se que a osseocondução é uma das características das hidroxiapatitas, sintéticas ou não, porosas ou densas e, no caso das porosas, a estrutura de poros interligados (*'osteoconductive porous scaffold'*) também facilita a engenharia de tecidos, permitindo que ocorra o alojamento, no interior desses poros, de células ósseas, de agentes osteotrópicos e de vasos intercomunicantes (Yoshikawa, Myoui⁴⁹ 2005).

A primeira hidroxiapatita utilizada nesta pesquisa foi de natureza totalmente sintética (HaP), obtida pela 'via úmida' – *Wet chemical methods* ou *precipitation method* (Eslami et al.⁵⁰ 2010, Kramer, Podurgiel Wei⁵¹ 2014), na qual se combinou H_3PO_4 com $Ca(OH)_2$, na razão molar Ca/P de 1,67, em meio aquoso (Rigo, Gehrke, Carbonari⁵² 2007). Este pó cristalino resultante – *hidroxiapatita nanocristalina* - composto de partículas estequiométricas foi denominado neste trabalho de hidroxiapatita pura (HaP) [Materiais e Métodos - Figuras 1, 2 e 3]. As hidroxiapatitas nanoparticuladas obtidas por 'via úmida', denominadas de *nanoparticles obtained by wet chemical precipitation* (Kong, Boey⁵³ 2002, Manuel, Ferraz, Monteiro⁵⁴ 2003, Cao, Zhang, Huang⁵⁵ 2005), se apresentam inicialmente como um material sintético não-homogêneo (muito aglomerado) que pode ser dispersado e melhorado por ação ultrassônica (*'Deagglomeration'*) (Xiao et al.⁵⁶ 2005). Com relação ao tamanho das partículas, Zakaria et al.⁵⁷ (2013), afirmaram que o desempenho frágil e a pobre capacidade de bioreabsorção das hidroxiapatitas de tamanho macro (macropartículas) fizeram com que se desenvolvessem as hidroxiapatitas sob a forma de nanopartículas (*nanophase* < 100 nanômetros de diâmetro), tornando-se hoje a sua utilização quase um imperativo.

A segunda hidroxiapatita desta pesquisa foi designada como *hidroxiapatita com colágeno* (HaCol), em razão da mistura de hidroxiapatita pura com o colágeno bovino. Este composto de hidroxiapatita pura mais colágeno (HaCol) foi solubilizado em água pelo método de ultrassom por 1 hora e seguidamente liofilizado [Materiais e

Métodos- Figuras 4 e 5]. Autores como Antebi et al.⁵⁸ (2013) assinalaram que a incorporação do colágeno (Tipo I) à hidroxiapatita pura obedece ao fato de que os polímeros naturais como a gelatina, o alginato e a quitosana podem minimizar tanto a inflamação crônica como a toxicidade do biomaterial. Além disso, o colágeno é um polímero natural de alta biocompatibilidade, pouco irritante ao organismo e facilmente biodegradável (Zhao et al.³² 2015). De acordo com Sarkar e Lee⁵⁹ (2015), o colágeno pertence ao grupo dos grandes polímeros, de elevado peso molecular e rapidamente biodegradável e a sua degradação pode estimular os mecanismos fisiológicos de reparo ósseo.

O terceiro biomaterial, hidroxiapatita comercial *Alobone*®, [Materiais e Métodos - Figuras 6, 7 e 8], foi incluído nesta pesquisa como elemento de comparação por tratar-se de uma hidroxiapatita pura, porosa e totalmente sintética (Conz, Granjeiro, Soares³³ 2005, Conz, et al.³¹ 2010). A opção de utilizar o *Alobone*® obedece à facilidade da sua aquisição no mercado brasileiro e à sua grande semelhança com o material produzido pela UEPG. Outros materiais importados como o BioOss® - *Anorganic bovine bone* - *Bio-Oss*, (Piatelli et al., 1999), por exemplo, não são sintéticos, mas de origem bovina.

O *Alobone*® vem sendo utilizado em humanos mesmo apresentando escassa bibliografia (Conz, et al.³¹ 2010, Bassols Machado et al.³⁶ 2012, Dias et al.³⁷ 2014, Almeida Mourão et al.³⁵ 2015) e algumas pesquisas *in vivo* (Freitas Costa et al.⁶⁰ 2009, Conz, Granjeiro, Soares⁶¹ 2011) que, no entanto, vêm atestando sua biocompatibilidade e avaliando sua utilização clínica. O *Alobone*® possui certificado de boas práticas de fabricação (BPF – ANVISA) e Autorização de Funcionamento (AFE – ANVISA) desde o ano 2010, contudo, esta pesquisa poderá contribuir para um melhor entendimento deste biomaterial que, pela sua utilização rotineira, afeta diretamente a população.

As três amostras de hidroxiapatitas foram caracterizadas por difratometria de raios X (DRX); microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) e EDS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy) [Materiais e Métodos – Figuras 1 a 8].

Diversas pesquisas *in vivo* demonstraram que a hidroxiapatita é um material de substituição óssea que apresenta vantagens como biocompatibilidade, não imunogenicidade e demorada biodegradação (Heymann, Guicheux, Rousell⁶² 2001).

De acordo com Brand et al.⁶³ (2010), as hidroxiapatitas nanocristalinas (*nanocrystalline hydroxyapatite*), cujas partículas variam geralmente de 50 a 100 nanômetros, apresentam lenta biodegradação e a despeito de não apresentarem propriedades osseoindutoras são, entretanto, osseocondutoras. Um material é osseocondutor quando exibe a capacidade de promover o crescimento ósseo quando implantado como arcabouços nas proximidades de osso viável ou de células diferenciadas formadoras de osso (Hing et al.⁶⁴ 1997).

O biomaterial sintético utilizado em nossa pesquisa (*HaP UEPG*) constitui-se numa hidroxiapatita nanocristalina (*Nanocrystalline hydroxyapatite – nHAp*) com um tamanho médio de partícula menor do que 50 nanômetros (Zhou, Lee⁶⁵ 2011). De acordo com Wang, Liao e Gogh⁶⁶ (2015), a estabilidade mecânica de um biomaterial é adequada quando sintetizado na forma de nanopartículas com um tamanho menor do que 100 nm e que inclui três formas típicas: 20 ± 5 , 40 ± 10 e 80 ± 12 nm de diâmetro.

A medida da partícula do biomaterial comercial *Alobone*® oscila entre 250 a 1000 μm (Freitas Costa et al.⁶⁰ 2009, Conz et al.³¹ 2010), o que significa que é um material macroporoso. Nesse sentido, autores como Kawachi et al.³ (2000) e Wang, Liao e Gogh⁶⁶ (2015) identificaram que um biomaterial já é considerado *macroporoso* quando apresenta partículas entre 50 a 250 micrômetros. Lan Levengood et al.⁶⁷ (2010), destacaram que a medida inicial do diâmetro de uma hidroxiapatita sintética considerada porosa estaria acima de 100 micrômetros (*'macropore size >100 μm '*).

Em nossa pesquisa, realizada em conjuntivo subcutâneo de dorso de ratas, mesmo com as diversidades de tamanho de partículas, não se verificou diferenças significativas entre as hidroxiapatitas (nanoparticuladas e não-nanoparticuladas) no que diz respeito à biocompatibilidade. Em 30 dias de pós-operatório as hidroxiapatitas nanoparticuladas produzidas pela UEPG e as não-nanoparticuladas *HaAlobone*®, mostraram-se biocompatíveis. Este resultado está de acordo com pesquisas *in vitro* de Eggli, Muller e Schenk⁶⁸ (1988) que enfatizaram que a porosidade da biocerâmica (micro ou macro), as impurezas das fases de tratamento e o tamanho dos cristais de hidroxiapatita podem influenciar o comportamento da degradação do material, mas não a qualidade da ligação com o tecido orgânico. Nesse sentido, Conz, Granjeiro e Soares⁶¹ (2011) descobriram *in vivo* que

hidroxiapatitas sintéticas com cristalinidade baixa (28%) e alta (70%) não apresentaram diferenças na intensidade da reparação óssea. Concluíram que as diferentes características dos grânulos de hidroxiapatita sintética não são capazes de afetar a formação óssea em defeitos de tamanho crítico em calvária de ratos. Contudo, Lan Levengood et al.⁶⁷ (2010) demonstraram em mandíbula de porcos a importância fundamental da utilização da hidroxiapatita microporosa (*microscale* 0.5 - 10 μm) para a obtenção de uma neoformação óssea de alta qualidade. Os autores enfatizaram dois aspectos: 1) a falta de pesquisas clínicas com materiais microporosos e 2) a possibilidade de utilizar como arcabouço (*scaffold*) os biomateriais microporosos e os macroporosos ao mesmo tempo evitando os 'espaços mortos' (*'with no "dead space"'*).

Nossa primeira pesquisa, em dorso de 45 ratas, procurou analisar as respostas biológicas após a implantação de três hidroxiapatitas (HaP; HaCol e HaAlobone®) em três grupos de 15 animais. Autores como Black et al.⁶⁹ (2015) assinalam que a natureza *ectópica* da pesquisa de biomateriais em conjuntivo subcutâneo de dorso de ratos impõe limites a este modelo quanto à verificação do crescimento ósseo, que somente poderá ser obtida no meio-ambiente natural ósseo como calvária e fêmur. No decorrer desta *Discussão* estarão evidenciadas as diferenças das respostas celulares e teciduais entre os dois locais de implantação *in vivo*.

Os resultados desta pesquisa, em conjuntivo subcutâneo de dorso de ratas (Figura 10 – Artigo 1), mostraram que aos 7 dias todos os grupos apresentaram resposta inflamatória inicial de tipo aguda com grande presença de neutrófilos (PMNs) e apresentando exsudato em alguns casos. A necrose tecidual esteve ausente em todos os grupos. Apenas no grupo controle – *lado controle* - não se verificou resposta inflamatória, visto que, em 7 dias, as células inflamatórias não foram mais percebidas e a regeneração tecidual já estava em andamento. O tecido de granulação, que esteve presente em todos os grupos experimentais, se organiza a partir do hematoma e do coágulo de fibrina; este bloqueia a perda de sangue, repara a parede lesada dos vasos e permite a revascularização (Desmoulière et al.⁷⁰ 1995).

Aos 15 dias, em todos os grupos houve grande diminuição da resposta inflamatória. As células predominantes nos grupos experimentais eram os

macrófagos. O tecido conjuntivo apresentava-se com feixes de fibras colágenas ainda dispersos e novas formações de vasos eram evidentes. Nesta fase do reparo tecidual, ocorre uma contração do tecido de granulação por ação de ‘miofibroblastos’ (Majno et al.⁷¹ 1971).

Aos 30 dias, verificou-se ausência do infiltrado característico de células inflamatórias. Não obstante, ainda era percebida a presença de macrófagos e poucas células gigantes multinucleadas. O tecido conjuntivo apresentou densos feixes de fibras colágenas já organizadas e grande presença de fibroblastos. Em todos os grupos experimentais verificou-se encapsulamento do biomaterial, sob a forma de um conjuntivo fibroso não inflamatório, enquanto que no *lado controle* do dorso dos animais a regeneração tecidual no local da ferida cirúrgica foi completa e integral. Resultados: figuras 11 (7 dias); 12 (15 dias) e 13 (30 dias) – Artigo 1.

Estes resultados, em 30 dias do pós-operatório, demonstram a biocompatibilidade dos três biomateriais que fizeram parte desta pesquisa (HaP; HaCol e HaAlobone®). Anderson⁷² (2001) definiu a biocompatibilidade como a “*habilidade de um biomaterial para desempenhar uma função específica em uma aplicação específica sem provocar qualquer resposta imune*”. Vários autores, em coincidência com o que foi observado em nossa pesquisa, obtiveram resultados positivos de biocompatibilidade em conjuntivo subcutâneo de ratos quando submetidos a implantes de biocerâmicas como a hidroxiapatita num período que oscila entre 21 e 90 dias (Ducheyne, Qiu⁷³ 1999, Ge et al.⁷⁴ 2004, Legrand et al.⁷⁵ 2005, Sawyer, Hennessy, Bellis⁷⁶ 2005, Anderson, Rodriguez, Chang⁷⁷ 2008, Zaazou et al.³⁹ 2013, Batur et al.⁷⁸ 2013, Jaiwal et al.⁷⁹ 2013, Rupeks et al.⁸⁰ 2016).

Christo et al.⁸¹ (2015) relataram que biomateriais implantados subcutaneamente em conjuntivo de animais desencadeiam a *imunidade inata* por parte do hospedeiro, o que resulta numa reação de corpo estranho – *Foreign Body Response (FBR)* - na qual, no local da injúria, monócitos do sangue se diferenciam em macrófagos teciduais do tipo (‘M1’), secretores de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-8 e do Fator de Necrose Tumoral Alfa (*TNFα*). Recentemente Sadtler et al.⁸² (2016), demonstraram que a *imunidade adaptativa* ou *adquirida* irá iniciar-se em semanas ou meses após a implantação *in vivo* do biomaterial em conjuntivo subcutâneo de ratos. As células predominantes na *imunidade adaptativa*

são os linfócitos B (que produzem imunoglobulinas) e os linfócitos T (que secretam citocinas). Em nossa pesquisa, com pós-operatório de 30 dias, os resultados mostraram predominantemente a presença de células que correspondem apenas à imunidade inata.

Kastellorizios, Tipnis e Burgess⁸³ (2015) e Moore e Kyriakides⁸⁴ (2015) identificaram que a sequência de eventos após a implantação de biomaterias em áreas conjuntivas subcutâneas de animais se inicia com a adsorção de proteínas da superfície do biomaterial, depois, com a infiltração local de células inflamatórias, a fusão de macrófagos para formar células gigantes visando a degradação do material, a ativação de fibroblastos e a formação de uma cápsula fibrosa não inflamatória – *non inflammatory connective tissue capsule*. Em pesquisa *in vivo*, autores como Anderson, Rodriguez e Chang⁷⁷ (2008) demonstraram que a origem da *cápsula fibrosa* que se forma em torno do biomaterial implantado obedece à atividade de citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-13 produzidas por células como mastócitos e macrófagos tipo 'M2' (de reparo tecidual) que ativam os fibroblastos para a deposição de colágeno.

Ge et al.⁷⁴ (2004); Legrand et al.⁷⁵ (2005) e Khashaba et al.⁸⁵ (2011) demonstraram que uma cápsula fibrosa delgada é sinônimo de biocompatibilidade. Contrariamente, um material não pode ser considerado biocompatível quando persistir à sua volta uma reação inflamatória e uma cápsula fibrosa grossa ou espessa. De acordo com Moraes, Papadimitrakopoulos e Burgess⁸⁶ (2010), a *cápsula fibrosa não inflamatória* deve possuir tipicamente uma espessura entre 50–200 µm. A nossa pesquisa *in vivo*, aos 30 dias do pós-operatório, demonstrou a presença de *cápsulas fibrosas* finas ou delgadas ao redor das três hidroxiapatitas testadas (HaP; HaCol e HaAlobone®), isto se torna evidente quando se compara com a espessura alargada das cápsulas fibrosas observadas aos 15 dias. (Figuras 11, 12 e 13 – Artigo 1).

Por fim, o modelo de roedores, especificamente o que envolve o conjuntivo submucoso de dorso de ratos, tomado como modelo para a presente pesquisa, é bastante utilizado e aceito para determinar a biocompatibilidade e a não toxicidade de diferentes materiais, particularmente de hidroxiapatitas sintéticas (An et al.⁸⁷ 2000, Yin et al.⁸⁸ 2003, Hasegawa⁸⁹ 2007, Cruz et al.¹⁵ 2008, Laschke et al.⁹⁰ 2009,

Batur et al.⁷⁸ 2013, Jaiwal et al.⁷⁹ 2013, Saghiri et al.⁹¹ 2013, Zaazou et al.³⁹ 2013, Rupeks et al.⁸⁰ 2016).

Pode-se concluir que os resultados da nossa pesquisa, que envolve a formação de tecido de granulação de tipo corpo estranho, seguida do desenvolvimento de uma cápsula fibrosa não infamatória em torno dos biomateriais e, ainda, o não desencadeamento de respostas imunes, demonstraram a biocompatibilidade *in vivo* das hidroxiapatitas testadas. Os dados que emergem daquelas publicações estão em consonância com os resultados histomorfométricos em conjuntivo subcutâneo de dorso de ratas obtidos na presente pesquisa.

A nossa segunda pesquisa envolveu a análise das alterações biológicas em calvária de ratas nas quais se produziu um defeito crítico previamente à colocação dos biomateriais. Em três grupos de 15 animais, foram colocados três tipos de materiais experimentais: Ha-pura, Ha-Col e Ha-Alobone®. O quarto grupo de 15 animais serviu como controle. Neste grupo não se utilizou biomateriais, apenas se conformou os defeitos ósseos críticos em calvária seguido da colocação de membrana de colágeno (*Helitape*®). Saliente-se que em todos os animais nos quais se implantou biomateriais procedeu-se também à colocação de membrana de colágeno (Brunel et al.⁴¹ 1996, Al-Qutub et al.⁹² 2016, Wang et al.⁴² 2016).

Na primeira semana (7 dias) do pós-operatório, observou-se aumento dos escores de inflamação em todos os grupos (Figura 10 – Artigo 2). Houve presença de infiltrado inflamatório com predomínio de neutrófilos e macrófagos, em menor número nos grupos testados. Os biomateriais apareceram dispersos na área do defeito crítico. A presença de grande quantidade de biomaterial foi verificada também na análise dos achados radiográficos. Histologicamente, em todos os grupos experimentais, foi constatada a presença do tecido de granulação – que em modelo de calvária de animais inicia sua formação entre o 3º e o 5º dias após a implantação do biomaterial - numa reação de tipo corpo estranho (Anderson⁷² 2001). O hematoma, oriundo do rompimento de vasos sanguíneos e da lesão no periósteo, é substituído pelo tecido de granulação e este tecido é posteriormente suprido por uma matriz extracelular (ECM) depositada principalmente por fibroblastos (Ratner, Bryant⁹³ 2004).

Aos 15 dias, verificou-se uma diminuição da resposta inflamatória em todos os grupos. Observou-se, neste período, grande formação de tecido colágeno

substituindo o tecido de granulação e o desenvolvimento de vasos neoformados. Os macrófagos e osteoblastos eram as células predominantes. Neste tempo de 15 dias, já se verificou a presença de osteoide e algumas pequenas áreas de neoformação óssea. O grupo controle, no qual apenas se colocou membrana de colágeno, observou-se uma diminuição ainda maior da inflamação e neoformação óssea.

Aos 30 dias, observou-se praticamente uma ausência da resposta inflamatória no local afetado – defeito crítico em calvária de ratas - em todos os grupos, especialmente quando comparado ao período de 7 dias. Verificaram-se áreas de extensa neoformação óssea. Houve predominância de osteoblastos, osteócitos e macrófagos em menor quantidade. O tecido ósseo secundário ou maduro apresentou lamelas características e linhas cementantes (*cement line*) que o diferenciavam do osso neoformado, classicamente definido como tecido ósseo primário. No aspecto radiográfico, em 30 dias, a nossa pesquisa confirmou uma marcada biodegradação das hidroxiapatitas. Nos grupos experimentais houve drástica diminuição da quantidade de biomaterial disperso no local do defeito crítico.

O implante de biomateriais em defeitos críticos em calvária de ratos tem sido amplamente aceito como um teste importante para aceder ao entendimento, não apenas da biocompatibilidade e da biodegradabilidade, mas do processo de reparo e da neoformação do tecido ósseo (Pryor et al.⁹⁴ 2005, Messori, Nagata, Mariano⁹⁵ 2008, Umoh et al.⁹⁶ 2009, Cooper et al.⁹⁷ 2010, Gomes e Fernandes⁹⁸ 2011, Spicer et al.⁹⁹ 2012, Song et al.¹⁰⁰ 2014, Almeida et al.¹⁰¹ 2014, Peric et al.¹⁰² 2015).

O clássico trabalho de Schmitz e Hollinger⁴³ (1986) demonstrou que o defeito por osteotomia, realizado com broca trefina com um diâmetro de 8 milímetros em calvária de ratos, é adequado para pesquisas com biomateriais. Nestas proporções extremas, os defeitos ósseos não irão regenerar durante a vida normal do animal e podem ser denominados então de ‘defeitos de tamanho crítico’ – *Critical Size Defects* – CSDs - (Cooper et al.⁹⁷ 2010). Contrariamente, um defeito ósseo *in vivo* denominado não crítico - *Non-critical size defect* - teria a sua regeneração processada espontaneamente (Peric et al.¹⁰² 2015).

Em nossa pesquisa, foi adotado o modelo de defeito crítico em calvária de ratas de 8 mm (Schmitz, Hollinger⁴³ 1986) para a implantação de biomateriais e, a seguir, utilizou-se membrana de colágeno (Brunel et al.⁴¹ 1996). Autores como Zhang et al.¹⁰³ (2013) opinaram de que no futuro irá diminuir o uso das

membranas biológicas como são usadas hoje: criando procedimentos cirúrgicos específicos (*ad hoc*), provavelmente obstruindo a cicatrização e aumentando o desconforto do paciente. As próprias membranas já se apresentam como osseocondutores e podem impregnar-se de substâncias antimicrobianas como o metronidazol visando evitar a contaminação e, sobretudo, recebem cada vez mais incorporações de fatores bioativos e de crescimento. A próxima geração de membranas certamente deverá combinar biomoléculas funcionais projetadas para aumentar o sucesso da terapia mediante RTG.

Não obstante, a importância da membrana na regeneração óssea em calvária de ratos foi estudada por autores como Al-Qutub et al.⁹² (2016), com biomateriais como fosfato de cálcio mais *BMPs* (implantados com e sem membrana de colágeno). Especificamente estudaram a regeneração óssea em defeitos críticos em calvária de trinta ratas Wistar. Os resultados confirmaram que, comparativamente, onde esteve presente a membrana de colágeno verificou-se significativo aumento da porcentagem de neoformação óssea nos defeitos ósseos.

Wang et al.⁴² (2016) relataram que as membranas de colágeno apresentam propriedades como rápida integração ao tecido receptor, rápida vascularização e biodegradação, propriedades hemostáticas, fraca imunogenicidade, adesão osteoblástica e alta capacidade de promover cicatrização de tecidos. Assim, ao adotar o princípio da Regeneração Tecidual Guiada (Melcher¹⁰⁴ 1976), a membrana impede migrações de células, como as epiteliais, para o local da ferida cirúrgica. Esta condição de barreira física da membrana favorece a neoformação óssea. Brunel et al.⁴¹ (1996) já demonstraram o papel facilitador das membranas de colágeno colocadas sobre a dura-máter para a neoformação óssea em defeitos produzidos em calvária de ratos. Mardas, Kostopoulos e Karring¹⁰⁵ (2002) também demonstraram em calvária de ratos a eficácia da membrana não reabsorvível de PTFE (politetrafluoretileno) para a regeneração óssea. Lee et al.¹⁰⁶ (2015) utilizaram uma membrana de celulose (*bacterial cellulose (BC) membranes*), obtida a partir da bactéria gram negativa *Acetobacter xylinum*, sobre defeitos críticos em calvária de ratos e compararam com membrana de colágeno reabsorvível. Em ambos os casos observou-se ampla neoformação óssea.

É preciso enfatizar nesta *Discussão* que em nossa pesquisa nos animais nos quais se utilizou apenas membranas de colágeno, sem biomateriais (Grupo Controle), a ossificação – formação de tecido ósseo primário – foi extensiva e completa, o que pode caracterizar uma regeneração (*restitutio ad integrum*) do tecido afetado. Onde foram colocados biomateriais - e considerando o grande potencial dispersivo destes como se observou em algumas radiografias - a membrana biológica, além de promover a neoformação óssea, pode ter auxiliado na permanência *in loco* do biomaterial.

Completada a angiogênese, torna-se crucial a presença, no local da lesão óssea, de células-tronco adultas - CTAs - (Almada¹⁰⁷ 2013) que podem ser de três subpopulações: hematopoiéticas, endoteliais e mesenquimais. As células-tronco mesenquimais de diferenciação multipotencial foram identificadas a partir da medula óssea e, em seguida, encontradas em vários tecidos incluindo cordão umbilical, tecido adiposo e sangue periférico (Wu et al.¹⁰⁸ 2015).

Os defeitos críticos em calvária de ratos servem como um modelo para a neoformação óssea de tipo *intramembranosa* (Spicer et al.⁹⁹ 2012). Nesse sentido, Wang e Glimcher¹⁰⁹ (1999) e Lin et al.¹¹⁰ (2012) constataram que em lesões de calvária de ratos existe pouca evidência de que a ossificação ocorra por meio da clássica sequência *endocondral* de mineralização, contrariamente, apresentaram uma calcificação de tipo *intramembranosa*, na qual, a partir do tecido de granulação, as células-tronco mesenquimais iniciam um processo de reparo tecidual que pode seguir duas vertentes: regeneração ou cicatrização. Com relação à ossificação intramembranosa, Bielby, Jones e McGonagle¹¹¹ (2007) afirmaram que esta é a forma mais pura, rápida e direta de neoformação óssea, uma vez que não requer o desenvolvimento de um tecido cartilaginoso intermediário que se observa nos discos epifisários. A ossificação intramembranosa é própria dos ossos curtos ou laminares como a calvária.

De acordo com Hutmacher e Sittering¹¹² (2003) e Black et al.⁶⁹ (2015) nos defeitos ósseos críticos produzidos em animais, uma das fontes de origem das células-tronco mesenquimais (MSCs) é o perióstio que remanesce em torno do defeito e, quando se trata de calvária, envolve também o endóstio em contato com a dura-máter. Autores como Dimitriou, Tsiridis e Giannoudis¹¹³ (2005) assinalaram que durante o reparo de uma fratura óssea, as fontes potenciais de células-tronco

mesenquimais são a medula óssea, a camada profunda do periósteo, o endósteo e o tecido de granulação.

Einhorn¹¹⁴ (1998) utilizou o modelo de fratura experimental em calvária de ratos visando replicar a caracterização histológica do reparo e da ossificação intramembranosa que ocorre a partir do periósteo e do tecido de granulação. Demonstrou que nestes casos os eventos de ossificação abrangem um período de 28 dias. Esta pesquisa de Einhorn¹¹⁴ (1998) foi a que justificou a extensão do nosso trabalho em animais por um período de 30 dias. Saliente-se que, em nossa pesquisa, composta de 60 ratas Wistar, não houve nenhuma ocorrência de morte das mesmas e, conforme demonstrado por Cooper et al.⁹⁷ (2010) e Spicer et al.⁹⁹ (2012), uma das razões é que a dura-máter nas cirurgias foi deixada sem lesões e sem sangramento.

Aos 7 dias do pós-operatório, em nossa pesquisa, todos os grupos experimentais apresentaram tecido de granulação (Figura 11 – Artigo 2). No entendimento de Wynn e Vanella¹¹⁵ (2016), o tecido de granulação, impregnado de novos capilares, estroma proteico, macrófagos, fibroblastos e hemácias, representa a própria fonte das respostas para originar a Fase de Maturação ou Remodelação que envolve a proliferação de fibroblastos e a deposição de colágeno de Tipo I, em alguns casos, recebendo o nome de *osteoide*, uma complexa matriz de proteínas sintetizadas, principalmente, por osteoblastos e fibroblastos.

Grzesik e Narayanan¹¹⁶ (2002) e Al-Hezaimi et al.¹¹⁷ (2016), utilizando o modelo de calvária de ratos, demonstraram o potencial osteogênico das células do osso derivadas de células-tronco mesenquimais e confirmaram a formação de novo osso em duas semanas. De maneira semelhante, em nossa pesquisa, a neoformação do tecido ósseo em defeito crítico de calvária de ratas iniciou-se também em torno de 15 dias do pós-operatório (Figura 12 – Artigo 2).

A calcificação foi aumentando com o tempo e, em 30 dias, observou-se extensa formação de tecido ósseo novo no interior do defeito crítico. (Figura 13 – Artigo 2). Resultados: figuras 11 (7 dias); 12 (15 dias) e 13 (30 dias) – Artigo 2.

Os resultados da nossa pesquisa demonstraram que todos os biomateriais avaliados promoveram reparo tecidual adequado e neoformação óssea na área do defeito crítico. Não houve diferença significativa entre os materiais produzidos pela UEPG, hidroxiapatita pura (HaP) e hidroxiapatita com colágeno (HaCol), no que se

refere à biocompatibilidade, neoformação óssea e biodegradação do material implantado. Resultados semelhantes foram obtidos por Vozzi et al.¹¹⁸ (2014), em pesquisas *in vitro*, utilizando hidroxiapatita mais colágeno. Cuzmar et al.¹¹⁹ (2015), comprovaram *in vivo* que a incorporação de colágeno tipo I, dentro de cimento de fosfato de cálcio, não apresentou efeito significativo para o aumento da neoformação óssea.

Saliente-se que os resultados da nossa pesquisa sobre biocompatibilidade e neoformação óssea estão de acordo com diversas publicações sobre a obtenção de regeneração óssea após implantação de biomateriais, a maioria de hidroxiapatita sintética, em defeitos críticos de calvária de ratos (Marden et al.¹²⁰ 1994, Winn et al.¹²¹ 1999, Dupoirieux et al.¹²² 2001, Verna et al.¹²³ 2002, Pryor et al.⁹⁴ 2005, Mendonça et al.⁴⁵ 2007, Umoh et al.⁹⁶ 2009, Cooper et al.⁹⁷ 2010, Ye et al.¹²⁴ 2011, Pelaez et al.¹²⁵ 2014, Almeida et al.¹⁰¹ 2014, Wu et al.¹⁰⁸ 2015, Al-Hezaimi et al.¹¹⁷ 2016, Silva et al.¹²⁶ 2016).

Resultados negativos sobre biocompatibilidade e neoformação óssea em calvária de ratos são raros. Autores como Fini et al.¹²⁷ (2001) identificaram falhas na neoformação óssea em calvária de ratos osteopênicos (modelo patológico) nos quais se implantou biocerâmicas. Saliente-se que as pesquisas sobre hidroxiapatitas e regeneração óssea, quando realizadas previamente *in vitro*, contribuem enormemente para que as experiências *in vivo* sejam realizadas com segurança, considerando a toxicidade que possam apresentar alguns biomateriais (Lin, Chang, Cheng¹²⁸ 2007, Kamitakahara, Saito, Ioku¹²⁹ 2012).

Quanto aos achados radiológicos desta pesquisa (que utilizou radiografias digitais) autores como Pryor et al.¹³⁰ (2005), Pryor et al.⁴⁶ (2006), Montjovent et al.¹³¹ (2007), Cooper et al.⁹⁷ (2010), Gomes e Fernandes⁹⁸ (2011), Spin-Neto et al.⁴⁷ 2012, Pelaez et al.¹²⁵ (2014), Kim et al.¹³² (2015) e Roh et al.⁴⁸ (2016), pesquisando sobre biomateriais como a hidroxiapatita sintética em calvária de ratos apontaram para o fato de que as avaliações radiográficas do processo de reparo tecidual de defeitos críticos produzidos por osteotomia em calvária de ratos (*'critical size defects'*) têm a vantagem de serem mais rápidas e menos onerosas do que o tradicional protocolo da análise histológica; contudo, a validade - interna e externa - do método radiográfico em calvária de ratos ainda não foi totalmente explorado. Os autores advertiram que, em animais, nos casos de preenchimento ósseo limitado e/ou

parcial do defeito, a análise radiográfica tende a superestimar a neoformação óssea e, contrariamente, subestimar o preenchimento nos casos em que houve fechamento total dos defeitos. Autores como Pryor et al.¹³⁰ (2005) e Pryor et al.⁴⁶ (2006), concluíram que a avaliação de neoformações ósseas em modelos de animais não deve assentar-se exclusivamente na análise radiográfica, mas, obrigatoriamente, deve ser confirmada por meio de observações histológicas.

Os resultados da análise das imagens radiográficas dos defeitos críticos em calvária de ratas, em nossa pesquisa (Figuras 14, 15 e 16), apresentaram relação de conformidade com os achados histológicos.

Para determinar a correlação foram utilizados os scores histológicos de Mendonça et al.⁴⁵. (2007) (0,1,2 e 3) e os scores radiográficos de 0, 1 e 2, estabelecidos por Pryor et al.⁴⁶ (2006). A análise estatística utilizou o Coeficiente de correlação de Spearman (ver Tabela 1).

Os resultados da correlação entre escores histológicos e escores radiográficos demonstram que houve uma *correlação negativa*. Isso significa que quando uma variável aumenta a outra diminui. Neste caso entende-se que a partir do momento que os escores de resposta inflamatória diminuem os escores de reparação tecidual com neoformação óssea radiográfica aumentam. Assim, com a redução da inflamação começa a ocorrer o aumento da formação óssea na região do defeito ósseo.

As imagens mais radiolúcidas e com grande presença de biomaterial no local do defeito correspondiam aos primeiros 7 dias da experiência *in vivo*, quando ainda existia intensa resposta inflamatória. Contrariamente, as imagens radiográficas mais radiopacas e com pouco biomaterial correspondiam aos últimos dias da experiência (30 dias) quando histologicamente já existia evidente neoformação óssea. Estes achados foram semelhantes entre os grupos experimentais. Os resultados radiográficos da nossa pesquisa são semelhantes aos obtidos em pesquisas de regeneração óssea em defeitos críticos em calvária de ratos realizados por Pryor et al.¹³⁰ (2005), Pryor et al.⁴⁶ (2006), Spin-Neto et al.⁴⁷ (2012), Pelaez et al.¹²⁵ (2014) e Roh et al.⁴⁸ (2016).

É possível concluir que os resultados da nossa pesquisa *in vivo* podem ser utilizados como recurso preliminar de informações sobre biocompatibilidade e

biodegradabilidade de novos biomateriais obtidos a partir da implantação de hidroxiapatita sintética em calvária de ratas.

Por fim, um dos aspectos de maior destaque desta *Discussão* envolve o papel desempenhado pelos macrófagos do tecido ósseo, designados como *Osteal Macrophages* - *OsteoMacs* (Wu et al.¹³³ 2013, Shuang et al.¹³⁶ 2017), que sofrem diferenciação a partir da medula óssea por via dos monócitos presentes no sangue circulante. Chang. et al.¹³⁴ (2008) e Kular et al.¹³⁵ (2012) assinalaram que os *OsteoMacs* são parte integrante do tecido ósseo e regulam a diferenciação e a própria atividade dos osteoblastos a partir de progenitores mesenquimais. São macrófagos distribuídos junto a outras células de revestimento do osso em regiões como endóstio e perióstio.

É preciso salientar que nos últimos oito anos as pesquisas em calvária de ratos nas quais se implantou biomateriais apontam necessariamente para a presença dos *OsteoMacs* (*‘short for Osteal Macrophages’*) no processo de reparo tecidual e de neoformação óssea (Shuang et al.¹³⁶ 2017).

Alexander et al.¹³⁷ (2011) demonstraram em modelo de ratos que os *osteomacs* (*Osteal Macrophages*) são capazes de promover *in vivo* o reparo ósseo dentro da ossificação intramembranosa. O desenvolvimento dos *osteomacs* é iniciado pelo Fator Estimulador de Colônia de Macrófagos (M-CSF ou CSF-1) e também pelo RANK-ligante o RANK-L que, expresso em osteoblastos, participa da ativação de osteoclastos, com subsequente reabsorção óssea. De forma antagônica ao RANK-L, a osteoprotegerina (OPG) resguarda o organismo da reabsorção óssea excessiva, ligando-se ao RANK-L e evitando a união deste ao receptor RANK, expresso em osteoclastos imaturos.

Quanto à origem dos osteoclastos, Lampiasi, Russo e Zito¹³⁸ (2016) assinalaram que a linhagem de monócitos/macrófagos origina os osteoclastos (OCs) pela ação do Fator Estimulador de Colônia de Macrófagos (M-CSF) e do ligante ativador do receptor de fator nuclear kappa-B (RANKL), que induzem a diferenciação celular por meio de seus receptores, c-fms e RANK, respectivamente. Saliente-se que são os osteoblastos os que produzem M-CSF e RANKL. Os preosteoclastos, que emergem daquelas interações, são os que finalmente irão se diferenciar em osteoclastos.

De acordo com Loi¹³⁹ (2016) e Miron e Booshardt¹⁴⁰ (2016), existem no processo de reparo ósseo que se origina a partir do tecido de granulação, macrófagos ósseo-residentes identificados como *Osteomacs*, presentes em animais e em humanos, que demonstraram variações fenotípicas que ultrapassaram a clássica divisão polarizada dos macrófagos em M1 (pró-inflamatórios) e M2 (com atividades anti-inflamatórias e de reparo tecidual). Os *Osteomacs* foram observados no periósteo e no endósteo adjacentes ao local da injúria e participam ativamente da regulação do processo de reparo ósseo, particularmente pela interação com osteoblastos (na deposição de matriz óssea) e com osteoclastos (na remodelação de tecidos calcificados).

Em conclusão, em nossa pesquisa, de acordo com os resultados histomorfométricos da implantação de hidroxiapatitas sintéticas, o processo de reparo tecidual em calvária de ratas ocorreu, provavelmente, nos moldes da ossificação intramembranosa a partir do tecido de granulação com a participação de macrófagos ósseo-residentes (*Osteomacs*), desempenhando uma função pró-anabólica - '*pro-anabolic function*' - como o recrutamento de osteoblastos (Wu et al.¹³³, 2013) e resultando na promoção *in vivo* da neoformação óssea.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O escopo deste estudo consistiu em avaliar em animais de laboratório dois biomateriais de substituição óssea que foram desenvolvidas pelo departamento de Química da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Estes novos materiais sintéticos foram comparados a uma hidroxiapatita comercial, *Alobone®*, disponível no mercado brasileiro.

Os resultados em conjuntivo subcutâneo de dorso de ratas demonstraram que os três biomateriais testados apresentaram biocompatibilidade. No início do experimento a inflamação era intensa e com presença de tecido de granulação. A biocompatibilidade foi demonstrada pelo desenvolvimento de uma fina cápsula fibrosa não infamatória e pelo não desencadeamento de resposta imune. Esta pesquisa em dorso de ratas, no entanto, tem apresentado a limitação de que o material de substituição óssea foi testado em uma região *ectópica*, visto que envolve apenas tecidos moles subcutâneos, como o tecido conjuntivo.

Diante disto, a segunda pesquisa foi realizada em tecido duro (calvária de ratas), em uma região normal, *tópica* ou *ortotópica* (Wang et al.¹⁴¹ 2009) para o teste de biomateriais de substituição óssea. Verificaram-se em 30 dias evidentes áreas de neoformação óssea. No aspecto radiográfico confirmou-se uma marcada biodegradação dos biomateriais e sinais claros de reorganização do tecido ósseo. Estes resultados comprovam a capacidade bioativa e de osseocondução das hidroxiapatitas testadas.

Três aspectos de singular importância podem ser destacados a partir desta pesquisa. Em primeiro lugar observou-se uma correlação entre os resultados da análise das imagens radiográficas dos defeitos ósseos com os achados histológicos ou histomorfométricos em calvária de ratas (Pryor et al.¹³⁰ 2005). Assim, com a redução da inflamação começa a ocorrer o aumento da formação óssea na região do defeito ósseo, fenômeno detectado pelas radiografias digitais.

Em segundo lugar, em lesões ósseas em calvária de animais como os roedores a ocorrência da ossificação obedece ao tipo *intramembranoso* e nunca ao endocondral ou cartilaginoso (Lin et al.¹¹⁰ 2012). A partir das lesões provocadas no perióstio e no endóstio seguidas do aparecimento do tecido de granulação, as células-tronco mesenquimais (MSCs) sofrem diferenciação e iniciam um processo de

reparo por ossificação intramembranosa que pode seguir dois caminhos: regeneração ou cicatrização. Estes achados revelam um inusitado retorno à clássica embriologia do sistema ósseo.

Em terceiro lugar, as lesões ósseas em calvária de ratos reservam um papel importante aos macrófagos do tecido ósseo, *Osteal Macrophages* ou *OsteoMacs*, que estimulam a proliferação e a diferenciação dos osteoblastos responsáveis pelos eventos de ossificação (Miron, Bosshardt¹⁴⁰ 2016, Shuang et al.¹³⁶ 2017).

Cabe assinalar que um dos principais fatores que influenciam positivamente a cicatrização de feridas é a capacidade de recrutar células progenitoras mesenquimais (MSCs) para o local da ferida cirúrgica. É crucial também a presença no local de Fatores de Crescimento (como o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas - *PDGF*) e as Proteínas Morfogenéticas Ósseas (*BMPs*), entendidos como osseoindutores que, no entanto, deverão ter o suporte dos elementos osseocondutores como os biomateriais e as membranas.

É possível concluir que os resultados da nossa pesquisa *in vivo* podem ser utilizados como recurso preliminar de informações sobre biocompatibilidade e biodegradabilidade de novos biomateriais e também como modelo de osseocondução e neoformação óssea (Spicer et al.⁹⁹ 2012) que se observam a partir da implantação de hidroxiapatitas sintéticas em animais de laboratório.

Por fim, é preciso acompanhar os avanços das pesquisas com biomateriais implantados em seres humanos, como a realizada por Huber et al.¹⁴² (2006) que utilizaram com sucesso uma pasta de hidroxiapatita nanocristalina na reconstrução e osteossíntese de defeitos ósseos originados por fraturas. A resolução de casos clínicos que tratam de lesões cominutivas, defeitos ósseos severos e perdas ósseas alveolares, certamente irão se replicar no futuro mediante a utilização de diferentes substitutos ósseos, como as novas hidroxiapatitas sintéticas e bioativas, visando devolver aos pacientes a massa óssea trabecular perdida ao mesmo tempo em que os liberta de reações adversas como inflamação, osteofibroses e osteonecroses.

REFERÊNCIAS

1. Pires AL, Bierhalz ACK, Moraes AM. Biomateriais: Tipos, Aplicações e Mercado. *Quim Nova*. 2015; 38(7): 957-971.
2. Soares C. Síntese e Caracterização de Biocimentos Nanoestruturados para Aplicações Biomédicas. [Dissertação]. Joinville, SC: Universidade do Estado de Santa Catarina; 2006
3. Kawashi EY, Bertran CA, Reis RR, Alves OL. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Quim Nova*, 2000; 23(4)
4. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng*. 2012; 40(5):363-408.
5. Suaid FF, et al. Engenharia tecidual: um novo paradigma da regeneração periodontal. *Rev PerioNews*. 2009; 3(4):291-6
6. Henkel J, Woodruff MA, Epari DR, Steck R, Glatt V, Dickinson IC, Choong PFM, Schuetz MA, Hutmacher DW. Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions — A 21st Century Perspective. *Bone Res*. 2013; 1(3): 216–248.
7. Gutierrez M, Lopes MA, Hussain NS, et al. Substitutos ósseos: conceitos gerais e Estado Actual. *Arq Med*. 2006; 19(4):153-162.
8. Jensen SS, Bornstein MM, Dard M, Bosshardt DD, Buser D. Comparative study of biphasic calcium phosphates with different HA/TCP ratios in mandibular bone defects. A long-term histomorphometric study in minipigs. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009; 90(1):171-81.
9. Shi D, Jiang G, Wen X. In vitro bioactive behavior of hydroxyapatite-coated porous Al₂O₃. *J Biomed Mater Res. (Appl. Biomater)*. 2000; 53:457-66.
10. Dorozhkin SV. Calcium Orthophosphate-Based. *Bioceramics Mater*. 2013; 6: 3840-3942
11. De Jong W. F. The Mineral Substance in Bones. *Rec Trav Chim. Pays-Bas*, 1926; 45:445,49

12. Notodihardjo FZ, Kakudo N, Kushida S, Suzui K, Kusumoto K. Bone regeneration with BMP-Z and hydroxyapatite in critical-size calvarial defects in rats. *J Craniomaxillofac Surg*. 2012; 40:287-291
13. Donj J, Kojima H, Uemura T, Kikuchi M, Tateishi T, Tanaka J. In vivo evaluation of a novel porous hydroxyapatite to sustain osteogenesis of transplanted bone marrow-derived osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res*. 2001; 57(2):208-16
14. Cancian DC, Hochuli-Vieira E, Marcantonio RA, Garcia Júnior IR. Utilization of autogenous bone, bioactive glasses, and calcium phosphate cement in surgical mandibular bone defects in *Cebus paella* monkeys. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004; 19: 73-79
15. Cruz AC, Pochapski, MT, Tramonti R, Silva JZ, Antunes AC, Pilatti GL, Santos FA. Evaluation of physical-chemical properties and biocompatibility of a microrough and smooth bioactive glass particles *J Mater Sci Mater Med*. 2008; 19:2809-2817.
16. Xiong L, Zeng J, Yao A, Tu Q, Li J, Yan L, Tang Z. BMP2-loaded hollow hydroxyapatite microspheres exhibit enhanced osteoinduction and osteogenicity in large bone defects, *Int J Nanomedicine*, 2015;12(10):517-26.
17. Kokubo T, Kim HM, Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*, 2003; 24(13):2161-2175.
18. Rogero SO, Braga, FJC, Higa OZ. Cytotoxicity Test for Bioceramics of Calcium Phosphate. *Mater Sci Forum*, 1999; 299(300):44-47.
19. Li X, Van Blitterswijk CA, Feng Q, Cui F, Watari F. The effect of calcium phosphate microstructure on bone-related cells *in vitro*. *Biomaterials*. 2008; 29(23):3306–3316 .
20. Chen Y, Huang Z, Li X, Li S, Zhou Z, Zhang Y, Feng, QL, Yu B. In Vitro Biocompatibility and Osteoblast Differentiation of an Injectable Chitosan/Nano-Hydroxyapatite/Collagen Scaffold. *J Nanomaterials*, 2012; 401084, 1-6. E-pub.
21. Zhang LV, Liu W, Yue C, Zhang T, Li P, Xing Z, Chen Y. A tough graphene nanosheet/hydroxyapatite composite with improved *in vitro* biocompatibility. *Carbon*. 2013; 61: 105-115

22. Gregghi S, Campos JR. A. Estudo comparativo da biocompatibilidade de materiais cerâmicos diversos em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. *Rev Fac Odont Bauru*. 1994; 2(4), 73-81.
23. Santos FA, Pochapski MT, Martins MC, Zenóbio EG, Spolidorio LC, Marcantonio, E. Comparison of Biomaterial Implant in the Dental Socket: Histological Analysis in Dogs. *Clinl Implant Dent Relat Res*, 2008; 12(1):18-25.
24. Jin HH, Kim DH, Kim TW. In vivo evaluation of porous hydroxyapatite/chitosan–alginate composite scaffolds for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2012; 51(5): 1079-1085.
25. Hyeong-Ho J, Dong-Hyun K, Tae-Wan K, Keun-Koo S, Jin Sup J, Hong-Chae P, Seog-Young Y. In vivo evaluation of porous hydroxyapatite/chitosan–alginate composite scaffolds for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2012; 51: 1079– 1085.
26. Adam M, Ganz C, Xu W, Sarajian HR, Götz W, Gerber T. In vivo and in vitro investigations of a nanostructured coating material - a preclinical study. *Int J Nanomedicine*. 2014; 14 (9):975-84.
27. Puricelli E. Avaliação histológica de implantes de hidroxiapatita em defeito ósseo alveolar dentado em humano: relato de caso. *Rev Fac Odontol Porto Alegre*, 2002; 43(1):34-36.
28. Jensen SS, Terheyden H. Bone augmentation procedures in localized defects in the alveolar ridge: Clinical results with different bone grafts and bone-substitute materials. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009; 24(suppl):218–236.
29. Oguchi H, Iishikawa K, Mizoue K, Seto K, Eguchi G. Long-term histological evaluation of hydroxyapatite ceramics in humans. *Biomaterials*. 1995; 16(1):33-38.
30. Nishikawa T, Masuno K, Tominaga K, Koyama Y, Yamada T, Takakuda, K, Kikuchi M, Tanaka J, Tanaka A. Bone Repair Analysis in a Novel Biodegradable Hydroxyapatite/Collagen Composite Implanted in Bone. *Impl Dent*. 2005; 14(3):252-260.

31. Conz MB, Campos CN, Serrão SD, Soares GA, Vidigal GM. Caracterização físicoquímica de 12 biomateriais utilizados como enxertos ósseos na Implantodontia. *Rev Implantnews*. 2010; 7(4):541-6.
32. Zhao H, Wu J, Zhu J, Xiao Z, He C, Shi H, Li X, Yang S, Xiao J. Research Advances in Tissue Engineering Materials for Sustained Release of Growth Factors. *BioMed Res Int*, 2015; 10:1-8.
33. Conz MB, Granjeiro JM, Soares GA. Physicochemical characterization of six commercial hydroxyapatites for medicaldental applications as bone graft. *J Appl Oral Sci*. 2005; 13(2): 136-40
34. Polimeni G, Xiropaidis A, Wikesjö U. Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontol 2000*. 2006; 41:30–47.
35. Almeida Mourão CF, Valiense H, Rodrigues Melo E, Mascarenhas NBFM, Maia, DCM. Obtenção da fibrina rica em plaquetas injetável (i-PRF) e sua polimerização com enxerto ósseo: nota técnica. *Rev Col Bras Cir*. 2015; 42(6): 421-423
36. Bassols Machado R, Maciel Vidigal Junior. G, Braga Noleri A, Barbosa da Silva, AR, Silva JC, Conz MB. (2012) Análise histomorfométrica de dois diferentes biomateriais instalados em alvéolos de coelhos. *ImplantNews*. 2012; 9:95-104
37. Dias, ECLCM, E.C., Cotrim, K, C.; Conz, M. B. Associação da regeneração óssea guiada (ROG) e hidroxiapatita sintética (HA) para resolver complicações no tratamento com implantes dentários: relato de caso clínico com análise histológica. *ImplantNews*. 2014; 11(4):469-73.
38. Mezdari TJ, Tomaz VA, Amaral VLL. Anestesia e analgesia em animais de laboratório. In: *Animais de laboratório: cuidados na iniciação experimental*. Florianópolis: Ed. UFSC; 2004. p.101-130.
39. Zaazou MH, Zaki DY, Mostafa AA, Mahmoud AA, Basha M, Khallaf M. In vivo biocompatibility evaluation of injectable nano-hydroxyapatite/ Poloxamer 407 based formulations. Part 1. *J app Sci Res*. 2013; 9, 5269-5276.
40. Hefti AF, Preshaw PM. Examiner alignment and assessment in clinical periodontal research. *Periodontol*. 2012; 59:41-60.

41. Brunel G, Piantoni P, Elharar F, Benqué R, Marin P, Zahedi Z. Regeneration of Rat Calvarial Defects Using a Bioabsorbable Membrane Technique: Influence of Collagen Cross-linking. *J Periodontol*. 1996; 67 (12): 1342-1348
42. Wang J, Wang L, Zhou Z, Lai H, Xu P, Liao L, Wei J. Biodegradable Polymer Membranes Applied in Guided Bone/Tissue Regeneration: a review. *Polymers*. 2016; 8(115):1-20
43. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. 1986; 205:299-308.
44. Carvalho LF, Neves AC, Ricardo LH, Rode SM, Martins AM. Tempo de descalcificação e preservação do núcleo celular de tecido mineralizado descalcificado com ácido nítrico a 5%, edta a 7% e biodec. *Periodontia*. 2008; 18(02): 71-76.
45. Mendonça, RG, Freitas, AC, Ramalho, LP Farias, JG, Ribeiro MM. Avaliação Histológica do Processo de Reparo Ósseo Após Implantação de BMPs. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*. 2007; 7(3):291-296.
46. Pryor ME, Susin C, Wikesjö UME. Validity of radiographic evaluations of bone formation in a rat calvaria osteotomy defect model. *J Clin Periodontol*. 2006; 33: 455–460.
47. Spin-Neto R, Coletti, FL, Freitas RM, Pavone C, Campana-Filho SP, Marcantonio RAC. Chitosan-based biomaterials used in critical-size bone defects: radiographic study in rat's calvaria. *Rev Odontol UNESP*, 2012; 41(5): 312-317
48. Roh J, Kim JY, Choi YM, Ha SM, Kim KN, Kim KM. Bone Regeneration Using a Mixture of Silicon-Substituted Coral HA and -TCP in a Rat Calvarial Bone Defect Model Materials. 2016; 9(2):97-104
49. Yoshikawa H, Myoui A. Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. *J Artif Organs*. 2005; 8(3):131-6.
50. Eslami H, Solati-Hashjin M, Tahriri M, Bakhshi F. Synthesis and characterization of nanocrystalline hydroxyapatite obtained by the wet chemical technique. *Mater Sci-Poland*. 2010; 28:1-10

51. Kramer E, Podurgiel J, Wei M. Control of hydroxyapatite nanoparticle morphology using wet synthesis techniques: Reactant addition rate effects. *Mater Letters*. 2014; 131(15):145–147.
52. Rigo EC, Gehrke AS, Carbonari M. Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação. *Rev Dental Press Periodontia Implantol.*, 2007; 1(3):39-50.
53. Kong LB, Ma J, Boey F. Nanosized hydroxyapatite powders derived from coprecipitation process. *J Mater Sci*. 2002; 37:1131
54. Manuel C, Ferraz M, Monteiro F. Synthesis of hydroxyapatite and tricalcium phosphate nanoparticles—preliminary studies. *Key Eng Mater*. 2003; 8:240.
55. Cao L, Zhang C, Huang J. Synthesis of hydroxyapatite nanoparticles in ultrasonic precipitation. *Ceramic Int*. 2005; 1: 1041.
56. Xiao F, Ye J, Wang YP, Rao P. Deagglomeration of HA during the precipitation synthesis *J Mater Sci*. 2005; 40:5439–5442.
57. Zakaria SM, Zein SHS, Othman R, Yang F, Jansen JA. Nanophase Hydroxyapatite as a Biomaterial in Advanced Hard Tissue Engineering: A Review. *Tissue Eng*. 2013; 19 (5): 431-441.
58. Antebi B, Cheng X, Harris JN, Gower LB, Chen XD, Ling J. Biomimetic Collagen–Hydroxyapatite Composite Fabricated via a Novel Perfusion-Flow Mineralization Technique. *Tissue Eng Part C Methods*. 2013; 19(7): 487–496.
59. Sarkar SK, Lee BT. Hard tissue regeneration using bone substitutes: an update on innovations in materials. *Korean J Int Med*. 2015; 30(3): 279-293.
60. Freitas Costa NM, Raposo Melo B, Tavares Brito R, Oliveira Fernandes GV, Gonçalves V, Carvalho Fonseca E, Conz M., Soares GA, Granjeiro JM. Quality and Intensity of the Tissue Response to Two Synthetic Granular Hydroxyapatite Implanted in Critical Defects of Rat Calvaria. *Materials Res*. 2009; 12:2, 245-251.
61. Conz MB, Granjeiro JM, Soares GA. Hydroxyapatite crystallinity does not affect the repair of critical size bone defects. *J Appl Oral Sci*. 2011; 9(4): 337–342.
62. Heymann D, Guicheux J, Rousell AV. Ultrastructural evidence in vitro of osteoclast-induced degradation of calcium phosphate ceramic by simultaneous resorption and phagocytosis mechanisms. *Histol Histopathol*. 2001; 16(1):37–44.

63. Brandt J, Henning S, Michler G, Hein W, Bernstein A, Schulz M. Nanocrystalline hydroxyapatite for bone repair: an animal study. *J Materials Sci: Materials in Medicine*. 2010; 21(1): 283–294.
64. Hing KA, Best SM, Tanner KE, Bonfield W, Revell PA. Biomechanical assessment of bone ingrowth in porous hydroxyapatite. *J Materials Sci: Materials in Medicine*. 1997; 8: 731-736.
65. Zhou H, Lee J. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2011; 7: 2769–2781.
66. Wang K, Liao K, Gogh K. How Sensitive Is the Elasticity of Hydroxyapatite-Nanoparticle-Reinforced Chitosan Composite to Changes in Particle Concentration and Crystallization Temperature? *J Funct Biomater*. 2015; 6,:986-998.
67. Lan Levengood, SK, Polak, SJ, Wheeler, MB, Maki, AJ, Clark, SG, Jamison RD, Johnson AJW. Multiscale osteointegration as a new paradigm for the design of calcium phosphate scaffolds for bone regeneration *Biomaterials*, 2010; 31(13): 3552-3563.
68. Eggli PS, Muller W, Schenk, RK. Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bone ingrowth and implant substitution. *Clin Orthopaedics Rel Res*. 1988; 232:127–138
69. Black CRM, Goriainov V, Gibbs D, Kanczler J, Tare1, RS, Oreffo R. Bone Tissue Engineering. *Curr Mol Bio Rep*. 2015; 1:132–140.
70. Desmoulière A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol*. 1995; 146(1): 56–66.
71. Majno G, Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR. Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle. *Sci*. 1971; 173:548–550
72. Anderson JM. Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Sci*. 2001; 31:81–110.
73. Ducheyne P, Qiu Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials*. 1999; 20:2287–2303.

74. Ge Z, Baguenard S, Lim LY, Wee A, Khor E. Hydroxyapatite–chitin materials as potential tissue engineered bone substitutes. *Biomaterials*. 2004; 25:1049–1058.
75. Legrand AP, Marinov, G, Pavlov S, Guidoin MF, Famery R, Bresson B, Zhang, Z, Guidoin R. Degenerative mineralization in the fibrous capsule of silicone breast implants. *J Mater Sci Mater Med*, 2005; 16(5): 477-485.
76. Sawyer A, Hennessy K, Bellis S. Regulation of mesenchymal stem cell attachment and spreading on hydroxyapatite by RGD peptides and adsorbed serum proteins. *Biomaterials*. 2005; 26:1467–1475.
77. Anderson JM, Rodriguez A, Chang D. Foreign Body Reaction To Biomaterials. *Semin Immunol*. 2008; 20(2): 86–100.
78. Batur YB, Acar G, Yalcin Y, Dindar S, Sancakli H, Erdemir U. The cytotoxic evaluation of mineral trioxide aggregate and bioaggregate in the subcutaneous connective tissue of rats. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013; 18(4):e745-51.
79. Jaiswal AK, Dhumal RV, Bellare JR, Vanage GR. In vivo biocompatibility evaluation of electrospun composite scaffolds by subcutaneous implantation in rat. *Drug Deliv. and Transl. Res*. 2013; 3:504–517.
80. Rupeks L, Filipenkov V, Knets I, Vitins V, Sokolova M, Stipniece L, Pilmane M. Mechanical Properties and Biocompatibility of a Biomaterial Based on Deproteinized Hydroxyapatite and Endodontic Cement Materials Science and Applied Chemistry. 2016; 33 (1): 31–35.
81. Christo SN, Diener KR, Bachhuka A, Vasilev K, Hayball JD. Innate Immunity and Biomaterials at the Nexus: Friends or Foes. *Biomed Res Int*. 2015; 342304. E-pub Jul 12.
82. Sadtler K, Singh A, Wolf M, Wang X, Pardoll D, Eliseeff J. Design, clinical translation and immunological response of biomaterials in regenerative medicine. *Nature Rev Materials*. 2016; 1:1-17.
83. Kastellorizios M, Tipnis N, Burgess DJ. Foreign Body Reaction to Subcutaneous Implants. *Adv Exp Med Biol*. 2015; 865:93-108.
84. Moore LB, Kyriakides TR. Molecular Characterization of Macrophage-Biomaterial Interactions. *Adv Exp Med Biol*. 2015; 865:109-22.
85. Khashaba RM, Moussa MM, Chutkan NB, Borke JL. The response of subcutaneous connective tissue to newly developed calcium phosphate-based root canal sealers. *Int Endod J*. 2011; 44 (4): 342–352.

86. Morais MJ, Papadimitrakopoulos F, Burgess DJ. Critical Variables in the In Vitro and In Vivo Performance of Parenteral Sustained Release Products. *The AAPS J*, 2010; 12:2, 188-196
87. An YH, Woolf SK, Friedman RJ. Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices. *Biomaterials*. 2000; 21:24, 2635–52.
88. Yin Y, Ye F, Cui J, Zhang F, Li X, Yao K. Preparation and characterization of macroporous chitosan–gelatin/ β -tricalcium phosphate composite scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2003; 67(3):844–55.
89. Hasegawa S, Neo M, Tamura J, Fujibayashi S, Takemoto M, Shikinami Y, Okazaki K, Nakamura T. In vivo evaluation of a porous hydroxyapatite/poly-DL-lactide composite for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2007; 15;81(4):930-8.
90. Laschke MV, Strohe A, Scheuer C, Eglin D, Verrier S, Alini M, Pohlemann M, Menger MD. In vivo biocompatibility and vascularization of biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2009; 5:1991–2001.
91. Saghiri MA, Tanideh' N, Garcia-Godoy, F, Lotfi M, Karamifar K, Amanat D. Subcutaneous Connective Tissue Reactions to Various Endodontic Biomaterials: An Animal Study. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospect*. 2013; 7(1):15-21.
92. Al-Qutub MN, Al-Omar NA, Ramalingam S, Javed F, Al-Kindi M, Ar-Rejaie A, Aldahmash A, Nooh NS, Wang HL, Al-Hezaimi, K. Guided Bone Regeneration Using Biphasic Calcium Phosphate With Adjunct Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 With and Without Collagen Membrane in Standardized Calvarial Defects in Rats: A Histologic and Biomechanical Analysis. *Int J Periodont Rest Dent*. 2016; 36:11-20.
93. Ratner BD, Bryant SJ. Biomaterials: Where We Have Been and Where We Are Going. *Ann Rev Biomed Eng*. 2004; 6: 41-75.
94. Pryor ME, Polimeni G, Koo KT, Hartman MJ, Gross H, April M, Safadi FF, Wikesjo U ME. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: histologic and histometric observations. *J Clin Periodontol*; 2005; 32: 966–972.

95. Messori MR, Nagata MJH, Mariano RC. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontal Res.* 2008; 43:217-223.
96. Umoh JU, Sampaio AV, Welch I, Pitelka V, Goldberg HA, Underhill M, Holdsworth DW. *In vivo* micro-CT analysis of bone remodeling in a rat calvarial defect model. *Phys Med Biol.* 2009; 54: 2147–2161.
97. Cooper GM, Mooney MP, Gosain AK, Campbell PG, Losee JE, Huard J. Testing the Critical Size in Calvarial Bone Defects: Revisiting the Concept of a Critical-Size Defect. *Plast Reconstr Surg.* 2010; 125(6):1686-1692.
98. Gomes PS, Fernandes MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim.* 2011; 45(1):14-24.
99. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc.* 2012; 7(10), 1918–1929.
100. Song JM, Shin SH, Kim YD, Lee JY, Baek YJ, Yoon SY, Kim HS. Comparative study of chitosan/fibroin–hydroxyapatite and collagen membranes for guided bone regeneration in rat calvarial defects: micro-computed tomography analysis. *Int J Oral Sci.* 2014; 6: 87–93.
101. Almeida RS, Ribeiro II, Silva MH, Rocha DNR, Miguel FB, Rosa FP. Avaliação da fase inicial do reparo ósseo após implantação de biomateriais. *Rev Ciênc Méd Biol.* 2014; 13(3): 331-336.
102. Peric M, Domic-Cule I, Grcevic D, Matijasic M, Verbanac D, Paul R, Grgurevic L, Trkulja V, Bagi CM, Vukicevic S. The rational use of animal models in the evaluation of novel bone regenerative therapies. *Bone.* 2015; 70: 73–86.
103. Zhang Y, Zhang X, Shi B, Miron RJ. Membranes for guided tissue and bone regeneration. *Ann Oral Maxillofac Surg.* 2013; 1(1):1-10.
104. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol.* 1976; 47:2256-60.
105. Mardas N, Kostopoulos L, Karring T. Bone and suture regeneration in calvarial defects by e-PTFE-membranes and demineralized bone matrix and the impact

- on calvarial growth: an experimental study in the rat. *J Craniofac Surg.* 2002; 13(3):453-62.
106. Lee SH, Lim YM, Jeong SI, An SJ, Kang SS, Jeong C, Huh JB. The effect of bacterial cellulose membrane compared with collagen membrane on guided bone regeneration. *J Adv Prosthodont.* 2015;7(6): 484–495.
 107. Almada BVP. Comparação entre fontes de células-tronco mesenquimais na indução da regeneração óssea. [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2013.
 108. Wu G, Pan M, Wang X, Wen J, Cao S, Li Z, Li Y, Qian C, Liu Z, Wu W, Zhu L, Guo J. Osteogenesis of peripheral blood mesenchymal stem cells in self assembling peptide nanofiber for healing critical size calvarial bony defect. *Sci Rep.* 2015; 5: 1-12.
 109. Wang J, Glimcher MJ. Characterization of matrix-induced osteogenesis in rat calvarial bone defects: II. Origins of bone-forming cells. *Calcif Tissue Int.* 1999; 65(6): 486-493.
 110. Lin CY, Chang YH, Kao CY, Lu CH, Li-Yu Sung LY, Yen TC, Lin KJ, Hu JC. Augmented healing of critical-size calvarial defects by baculovirus-engineered MSCs that persistently express growth factors. *Biomaterials*, 2012; 33(14): 3682–3692.
 111. Bielby R, Jones E, McGonagle D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. *Injury.* 2007; 38:I, 26-32.
 112. Hutmacher DW, Sittinger M. Periosteal cells in bone tissue engineering. *Tissue Eng.* 2003; 9(1):S45-64.
 113. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury Int J Care Injured.* 2005; 36: 1392-1404.
 114. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop.* 1988; 355 S: 7-21.
 115. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity*, 2016; 44(3):450–462.
 116. Grzesik WJ, Narayanan AS. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; 13: 474–484.

117. Al-Hezaimi K, Ramalingam S, Al-Askar M, ArRejaie AS, Nooh N, Jawad F, Aldahmash A, Atteya M, Wang CY. Real-time-guided bone regeneration around standardized critical size calvarial defects using bone marrow-derived mesenchymal stem cells and collagen membrane with and without using tricalcium phosphate: an *in vivo* micro-computed tomographic and histologic experiment in rats. *Int J Oral Sci.* 2016; 8:7–15.
118. Vozzi G, Corallo C, Carta S, Fortina M, Gattazzo F, Galletti N, Giordano N. Collagen-gelatin-genipin-hydroxyapatite composite scaffolds colonized by human primary osteoblasts are suitable for bone tissue engineering applications: In vitro evidences. *J Biomed Mater Res Part.* 2014; 102A:1415–1421.
119. Cuzmar E, Perez RA, Manzanares MC, Ginebra MP, Franch J. In Vivo Osteogenic Potential of Biomimetic Hydroxyapatite/Collagen Microspheres: Comparison with Injectable Cement Pastes. *PLoS ONE*; 2015; 10(7): 1-12.
120. Marden LJ, Hollinger JO, Chaudhari A, Turek T, Schaub RG, Ron E. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 is superior to demineralized bone matrix in repairing craniotomy defects in rats. *J Biomed Mater Res*; 1994; 28:1127-1138.
121. Winn SR, Schmitt JM, Buck D, Hu Y, Grainger D, Hollinger JO. Tissue-engineered bone biomimetic to regenerate calvarial critical-sized defects in athymic rats. *J Biomed Mater Res.* 1999; 45:414-421.
122. Dupoirieux L, Pourquier D, Picot MC, Neves M. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. *Int J Oral Maxillofac Surg*; 2001; 30:58-62.
123. Verna C, Bosch C, Dalstra M, Wikesjö UME, Trombelli, L. Healing patterns in calvarial bone defects following guided bone regeneration in rats: A micro-CT scan analysis. *J Clin Periodontol.* 2002; 29:865-870.
124. Ye JH, Xu YJ, Gao J, Yan SG, Zhao J, Tu Q, Zhang J, Duan XJ, Sommer C, Mostoslavsky G, Kaplan DL, Wu YN, Zhang CP, Wang L, Chen J. Critical-size calvarial bone defects healing in a mouse model with silk scaffolds and SATB2-modified iPSCs. *Biomaterials.* 2011; 32:5065-5076.
125. Pelaez M, Susin C, Lee J, Fiorini T, Bisch FC, Dixon DR, McPherson JC, Buxton AN, Wikesjö UME. Effect of rhBMP-2 dose on bone

- formation/maturation in a rat critical-size calvarial defect model. *J Clin Periodontol*. 2014; 41: 827–836.
126. Silva AC, Oliveira MR, Amaral LF, Ferreira S, Garcia Junior IR, Mariano RC. Effect of Doxycycline in Gel Form in Regeneration Bone: Histomorphometric and Tomographic Study in Rats Calvary. *J Periodontol*. 2016; 87(1):74-82
 127. Fini M, Giavaresi G, Torricelli P, Krajewski A, Ravaglioli A, Belmonte M, Biagini G, Giardino R. Biocompatibility and osseointegration in osteoporotic bone. *J Bone Joint Surg*, 2001; 83-B:139-43.
 128. Lin K, Chang J, Cheng R. *In vitro* hydroxyapatite forming ability and dissolution of tobermorite nanofibers. *Acta Biomaterialia*, 2007;.3(2):271–276.
 129. Kamitakahara M, Saito T, Ioku K. Synthesis and *in vitro* evaluation of hydroxyapatite with controlled morphology. *J Physics: Conference Series*. 2012; 339:1-5.
 130. Pryor ME, Yang J, Polimeni G, Koo KT, Hartman MJ, Gross H, Agelan A, Joanne M, Manns JM, Wikesjö UF. Analysis of Rat Calvaria Defects Implanted With a Platelet-Rich Plasma Preparation: Radiographic Observations. *J Periodontol*. 2005; 76:1287-1292.
 131. Montjovent MO, Mathieu LH, Schmoekel H, Mark S, Bourban PE, Zambelli PY, Laurent-Applegate, L.A, Pioletti, D. Repair of critical size defects in the rat cranium using ceramic-reinforced PLA scaffolds obtained by supercritical gas foaming. *J Biomed Mat Res*, 2007; 10:41-41.
 132. Kim SM, Fan H, Cho YJ, Eo MY, Park JH, Kim BN, Lee BC, Lee SK. Electron beam effect on biomaterials I: focusing on bone graft materials. *Biomaterials Res*, 2015; 19(10): 1-10.
 133. Wu AC, Raggatt LJ, Alexander, KA, Pettit A. Unraveling macrophage contributions to bone repair. *Int Bone Mineral Soc*. 2013; 373: 101-107.
 134. Chang MK, Raggatt LJ, Alexander KA, Kuliwaba JS, Fazzalari FL, Schroder K, Maylin EL, Ripoll VM, Hume D, Petit A. Osteal Tissue Macrophages Are Intercalated throughout Human and Mouse Bone Lining Tissues and Regulate Osteoblast Function In Vitro and In Vivo. *J Immunol*, 2008; 18(2):1232-1244.
 135. Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin Biochem*. 2012; 45: 863–873.

136. Shuang Y, Yizhen L, Zhang Y, Kobayashi M, Sculean A, Miron R. In vitro characterization of an osteoinductive biphasic calcium phosphate in combination with recombinant Bmp2. *Bmc. Oral Health*. 2017; 17(35), 1-12.
137. Alexander KA, Chang M, Maylin E, Kohler T, Muller R, Wu A, Rooijen NV, Sweet MJ, Hume DA, Raggatt L, Pettit AR. Osteal Macrophages Promote In Vivo Intramembranous Bone Healing in a Mouse Tibial Injury Model. *J Bone Mineral Res*. 2011; 26(7):1517-1532.
138. Lampiasi N, Russo R, Zito F. The Alternative Faces of Macrophage Generate Osteoclasts. *Biomed Res Int*. 2016; 9089610, 1-9. Epub 2016 Feb 8.
139. Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, Lin TH, Goodman SB. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone*. 2016; 86, 119–130.
140. Miron R, Bosshardt DD. OsteoMacs: Key players around bone biomaterials. *Biomaterials*. 2016; 82: 1–19.
141. Wang R, Zou Y, Yuan Z, Wang Y, Chen Y, Mao Y, Zhu ZA, Li H, Tang X, Lu J, Yi J. Autografts and Xenografts of Skin Fibroblasts Delivering BMP-2 Effectively Promote Orthotopic and Ectopic Osteogenesis. *Anat Rec*. 2009; 292(6):777–786.
142. Huber FX, Belyaev O, Hillmeier J, Kock HJ, Huber C, Meeder PJ, Berger I. First histological observations on the incorporation of a novel nanocrystalline hydroxyapatite paste OSTIM® in human cancellous bone. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2006; 7:50, 1-9.

**ANEXO A –
TERMO DE APROVAÇÃO DO PROJETO NA COMISSÃO DE ÉTICA**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 22/2012

Protocolo UEPG – 08258/2012

Título – “Análise histomorfométrica das respostas biológicas após utilização de hidroxiapatita pura -UEPG e hidroxiapatita-colágeno-UEPG em submucosa, calota craniana e defeitos ósseos ao redor de implantes: estudo em ratos”.

Interessado – Prof. Fabio Anibal Jara Goiris

Data de Entrada – 14/05/2012

Resultado: Aprovado

**Data/Prazo – Validade de dois anos para projetos de pesquisa.
10/07/2014**

Considerações

Prezado Professor,

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois anos, para a utilização de 170 ratos Wistar.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para 90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo.

Professor Dr. Giovani Marino Favero
Coordenador Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria - anexo a PROPESP
Fone: (042) 3220-3264