

BRUNO SÉRGIO BAHIA LOPES

**EFEITO OSTEOGÊNICO DO COMPÓSITO PRODUZIDO COM
CERÂMICA DE BETA TRICÁLCIO FOSFATO, POLÍMEROS [PCL
E PLGA] E β -CICLODEXTRINA, ASSOCIADO À DOXICICLINA,
NO MODELO DE REPARO ÓSSEO ALVEOLAR EM RATOS**

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2019**

Bruno Sérgio Bahia Lopes

EFEITO OSTEOGÊNICO DO COMPÓSITO PRODUZIDO COM CERÂMICA DE BETA TRICÁLCIO FOSFATO, POLÍMEROS [PCL E PLGA] E β -CICLODEXTRINA, ASSOCIADO À DOXICICLINA, NO MODELO DE REPARO ÓSSEO ALVEOLAR EM RATOS

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Odontologia – área de concentração em Clínica Odontológica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Esperanza C. Segura

Co-Orientador: Carlos Alberto Tagliati

Belo Horizonte

2019

L864e Lopes, Bruno Sérgio Bahia.
2019 Efeito osteogênico do compósito produzido com cerâmica
T de beta tricálcio fosfato, polímeros [PCL e PLGA] e β -
ciclodextrina, associado à doxiciclina, no modelo de reparo
ósseo alveolar em ratos / Bruno Sérgio Bahia Lopes. -- 2019.

124 f. : il.

Orientadora: Maria Esperanza Cortés Segura.
Coorientador: Carlos Alberto Tagliati.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de Minas
Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Regeneração óssea. 2. Osteogênese. 3. Resinas
compostas. 4. Polímeros. 5. Doxiciclina. I. Segura, Maria
Esperanza Cortés. II. Tagliati, Carlos Alberto. III.
Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de
Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

EFEITO OSTEOGÊNICO DO COMPÓSITO PRODUZIDO COM CERÂMICA DE BETA TRICÁLCIO FOSFATO, POLÍMEROS [PCL E PLGA] E β -CICLODEXTRINA, ASSOCIADO À DOXICICLINA, NO MODELO DE REPARO ÓSSEO ALVEOLAR EM RATOS.

BRUNO SÉRGIO BAHIA LOPES

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, como requisito para obtenção do grau de Mestre, área de concentração Clínica Odontológica.

Aprovada em 16 de dezembro de 2019, pela banca constituída pelos membros:

Maria Esperanza Cortes S.
Prof(a). Maria Esperanza Cortes Segura - Orientadora
FO-UFMG

Carlos Alberto Tagliati
Prof(a). Carlos Alberto Tagliati - Coorientador
FF-UFMG

Martinho Campolina Rebelo Horta
Prof(a). Martinho Campolina Rebelo Horta
PUCMG

Sergio Monteiro Lima Junior
Prof(a). Sergio Monteiro Lima Junior
UFMG

Bele Horizonte, 16 de dezembro de 2019.

Dedico este trabalho aos meus pais, em especial à minha mãe, pelo amor, carinho e incentivo que nunca faltaram.

Ao meu irmão Rafael, pela força e companheirismo.

À Marcela, pelo amor, pela compreensão e cumplicidade. Por estar ao meu lado sempre e entender minhas eventuais ausências durante este tempo.

Muito especialmente dedico esta conquista aos meus avós, Marcos e Maria Carmen, que mesmo não estando mais entre nós, sempre serão parte fundamental, grande exemplo de caráter, de união e de família. Vocês nunca serão esquecidos.

AGRADECIMENTOS

À Deus e à Nossa Senhora da Conceição Aparecida, meus mais sinceros agradecimentos, por sempre estarem junto de mim, me guiando em todos os momentos.

À minha Orientadora, Profa. Dra. Maria Esperanza, pela dedicação e empenho para a realização desse projeto, não se eximindo de esforços para que os resultados acontecessem, o meu muitíssimo obrigado.

Ao Prof. Carlos Alberto Tagliati, por ter aberto as portas do seu laboratório, nos fornecendo todo apoio e condições para realização do projeto.

À Profa. Soraia Macari, pelo valoroso auxílio com a imuno-histoquímica.

Aos amigos do Laboratório de Biomateriais e Microbiologia da Faculdade de Odontologia da UFMG, Richard, Caio, Isabella, Gisele e Alexa, fica o meu sincero agradecimento pela amizade e ajuda de sempre.

Aos grandes e, essenciais, amigos contemporâneos da pós-graduação, que levarei para vida, Gabriel, Natália Gomes, Natália Teixeira, Elbert, Léo, Daniel, Alejandra, Patrícia, Diandra, André e Amanda.

À Larissa Souza, grande amiga, parte fundamental e indispensável para realização dos experimentos e manutenção dos animais. Sem ela, nada disso seria possível.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Bucal da FOUFG, Dani, Mara e, em especial, ao amigo Domênico, pela fundamental ajuda com a confecção das lâminas. Sempre disponível e com toda boa vontade. Agradeço de coração.

À Mariana Saturnino pela grande e valorosa ajuda com a análise das lâminas.

Ao Professor Leonardo Lanza, por toda ajuda com o experimento.

Ao Eduardo (CAPI-ICB) pela disponibilidade e boa vontade para com a aquisição das imagens das lâminas escaneadas.

Aos Professores Luiz César e Alexandre Drummond, pelo amizade, incentivo e exemplo de sempre.

Ao meu primo/irmão Lucas Lopes, por todo suporte com a informática, sempre disponível e com toda boa vontade em ajudar.

Aos amigos dos Cursos de Cirurgia Oral Menor, Prof. João Marcelo, Prof. Fernanda Boos, Bruno Parpinelli, Rose e Grazi pelo convívio semanal sempre tão agradável e que renova nossas forças para seguir em frente.

À todos os amigos que torceram por mim e que me incentivaram. Sozinho não chegamos a lugar nenhum.

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e muita FÉ em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.”

Ayrton Senna da Silva

RESUMO

A avaliação da influência da Doxiciclina, e seu comportamento osteogênico, quando adicionada ao compósito produzido com cerâmica de beta tricálcio-fosfato associado a polímeros (PCL e PLGA) e β -ciclodextrina, implantada em alvéolos de ratos, foi realizada imediatamente após a exodontia. O osso neoformado foi caracterizado de forma qualitativa (histologicamente) e quantitativa (histomorfometricamente), sendo os animais divididos em 04 grupos: Grupo 01 (Coágulo Sanguíneo – Controle), Grupo 02 (β TCP – Controle), Grupo 03 (β TCP/PCL/PLGA – Controle) e Grupo 04 (β TCP/PCL/PLGA/DOX/ β CD – Teste). O defeito no osso alveolar, pós exodontia do primeiro molar superior esquerdo foi preparado. Uma única loja cirúrgica foi criada, e preenchida com o material correspondente a cada grupo. Após os tempos pré-determinados, T1 (14 dias) e T2 (28 dias) procedeu-se com as análises propostas. A análise histológica mostrou, para todos os grupos, a presença de osso neoformado em ambos os tempos, sendo que em T1, o Grupo 04 – Teste, obteve a maior área de osso neoformado, quando comparado aos outros grupos. O Grupo 04 -Teste, manteve o volume praticamente estável entre os tempos, podendo-se observar um ligeiro aumento, porém com trabéculas bem mais maduras e estruturadas em T2. Quando da observação do infiltrado inflamatório, notou-se que o mesmo era de predominância mononuclear, compatível com o processo de reparo, para todos os grupos, sendo que para o grupo β TCP/PCL/PLGA/DOX/ β CD, esse infiltrado se mostrou ligeiramente diminuído. A análise histomorfométrica confirmou os achados histológicos qualitativos, sendo que para o tempo de 14 dias o Grupo Teste apresentou a maior área aferida de osso neoformado (47%), quando comparado ao Grupo 01 (36%), Grupo 02 (33%) e Grupo 03 (31%) , não havendo diferença estatística entre os tempos, quando comparados no mesmo grupo e nem entre os grupos, quando comparados grupos diferentes ($p > 0,05$). A imunomarcagem para osteoclastos (TRAP) mostrou, ainda, uma menor quantidade dessas células no Grupo 04 – Teste com 28 dias, quando comparado ao mesmo grupo com 14 dias, evidenciado o efeito antiosteoclastogênico de DOX. Concluiu-se, portanto, que a Doxiciclina utilizada no sistema de liberação controlada de fármacos foi capaz de aumentar a qualidade e a velocidade de neo-formação óssea para este modelo experimental, especialmente nas fases iniciais críticas do reparo ósseo (T1 – 14 dias), quando associada ao compósito biocerâmica/polímeros, sendo seu uso promissor para aplicações clínicas relacionadas à manutenção do rebordo ósseo alveolar.

Palavras-chaves: Regeneração Óssea, biocerâmicas, polímeros biodegradáveis, compósitos, doxiciclina

ABSTRACT

The evaluation of the osteogenic potential, in an animal bony model after tooth extraction, it was made for a composite containing calcium phosphate bioceramics, biodegradable polymers, and an antimicrobial agent, doxycycline, of the tetracycline class. The newly formed bone was qualitatively characterized (histologically) and quantitative (histomorphometrically). The animals were divided into 04 groups: Group 01 (Blood Clot – Control), Group 02 (β TCP – Control), Group 03 (β TCP/PCL/PLGA – Control) and Group 04 (β TCP/PCL/PLGA/DOX/ β CD – Test). After left upper molar extraction, and alveolar bone defect was prepared. A single surgical store was created, and filled with the material corresponding to each group. After predetermined times, T1 (14 days) and T2 (28 days) proceeded with the proposed analysis. Histological analysis showed, for all groups, the presence of neoformed bone at both times, and at T1, Group 04 – Test, obtained the largest área of the neoformed bone when compared to the other groups. Group 04 – Test, kept the volume practically stable between times, and a slight increase can be observed, but with much more mature and structured trabeculated bone in T2. When observing the inflammatory infiltrate, it was noted that it was predominantly mononuclear, compatible with the repair process, for all groups, and the β TCP/PCL/PLGA/DOX/ β CD group, this infiltrate was slightly decreased. The histomorphometric analysis confirmed the qualitative histological findings. For the 14 days time, the Test Group presented the largest measured área of newly formed bone (47%), when compared to Group 01 (36%), Group 2 (33%) and Group 03 (31%), with no statistical difference between the times compared into the same groups or between groups, when compared different groups ($p < 0,05$). The osteoclast immunostaining (TRAP) also showed a smaller amount of these cells in Group 04 – Test with 28 days, when compared with the same group with 14 days, evidencing the antiosteoclastogenic effect of DOX. It was concluded, therefore, that Doxycycline used in the controlled drug delivery system was able to increase the quality and speed of bone neo-formation for this experimental model, especially in the critical early stages of bone repair (T1 – 14 days). This composite has promising use for clinical applications related to the maintenance of the alveolar bone ridge.

Key words: bone regeneration, bioceramics, biodegradable polymers, composite and doxycycline.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Apresentação laboratorial da biocerâmica de β TCP	36
Figura 02 – Representação da estrutura química de PCL	38
Figura 03 – Apresentação laboratorial da Policaprolactona (PCL)	39
Figura 04 – Representação da estrutura química de PLGA	40
Figura 05 – Apresentação laboratorial do PLGA	41
Figura 06 – Aspecto macroscópico do compósito β TCP/PCL/PLGA	43
Figura 07 – Representação da estrutura química da Doxíciclina	45
Figura 08 – Esquema comparativo entre sistema de liberação controlada de fármacos e o sistema tradicional de administração	49
Figura 09 – Representação da estrutura química molecular da β -Ciclodextrina.....	52
Figura 10 – Esquema de encapsulamento de drogas por ciclodextrinas	53
Figura 11 - MEV do compósito BCP/PCL/PLGA/ β CD/DOX	56
Figura 12 - Apresentação clínica do compósito β TCP/PCL/PLGA/DOX/ β CD ...	60
Figura 13 – Esquema representativo para confecção do defeito ósseo alveolar	64
Figura 14 – Sequência do procedimento cirúrgico experimental	65
Figura 15 – Esquema da execução da histomorfometria	68
Figura 16 – Representação esquemática da área eleita para análise histológica	71
Figura 17 – Análise histológica Grupo 01 – 14 dias	74
Figura 18 – Análise histológica Grupo 01 – 28 dias	75
Figura 19 – Análise histológica Grupo 02 – 14 dias	78
Figura 20 – Análise histológica Grupo 02 – 28 dias	79
Figura 21 – Análise histológica Grupo 03 – 14 dias	82
Figura 22 – Análise histológica Grupo 03 – 28 dias	83
Figura 23 – Análise histológica Grupo 04 – 14 dias	86
Figura 24 – Análise histológica Grupo 04 – 28 dias	87
Figura 25 – Grupo 01 – Coloração Tricrômio de Masson	88

Figura 26 – Grupo 02 – Coloração Tricrômio de Masson	89
Figura 27 – Grupo 03 – Coloração Tricrômio de Masson	90
Figura 28 – Grupo 04 – Coloração Tricrômio de Masson	91
Figura 29 – Marcação por TRAP, comparação entre Grupo 01 e Grupo 04.....	93
Figura 30 – Esquema comparativo das marcações por grupo, entre os diferentes tempos	94
Figura 31 -Esquema representativo da área eleita para histomorfometria	95

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01 – Distribuição da área aferida de osso neoformado (μm^2), em cada tempo analisado	97
Gráfico 02 - Distribuição da área aferida de osso neoformado (μm^2) para cada tratamento, desconsiderando-se o tempo	98
Gráfico 03 - Distribuição da área aferida de osso neoformado (μm^2) para cada tratamento, considerando os diferentes tempos operatórios	99
Gráfico 04 – Interação entre os tratamentos e os tempos	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Análise semi-quantitativa para contagem celular das células osteoclásticas marcadas por TRAP, de acordo com a média de cada grupo	92
Tabela 02 - Medidas descritivas para a área aferida de osso neoformado em μm^2	96
Tabela 03 - Comparação dos tratamentos fixando os tempos	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Percentual

°C – Grau Celsius

β – Beta

μm – Micrômetro

g/mol – Gramas por molar

mL – Mililitro

mg – Miligrama

mm – Milímetro

BC – Biocerâmica(s)

BMPs – Proteínas morfo-genéticas

TCs – Tetraciclinas

DOX – Doxiciclina

PCL – Policaprolactona

PLGA – Poli (Ácido lático co glicólico)

CD - Ciclodextrina

βCD – Beta-ciclodextrina

BCP – Fosfato de cálcio bifásico

βTCP – Beta Tricálcio-Fosfato

HA – Hidroxiapatita

CTMs – Células-tronco mesenquimais

IL6 – Interleucina 6

IL1 – Interleucina 1

MEC – Matriz Extracelular

TGFbeta – Estimulador de proliferação celular

FGF – Fator de crescimento de fibroblasto

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

SLF – Sistema de Liberação de Fármaco

MEV – Microscópio Eletrônico de Varredura

MTT – Ensaio de Metabolização

BCIP/NBT – Ensaio de atividade de Fosfatase Alcalina

T – Tempo

CEUA – Comitê Experimentação com Uso de Animais

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

pH – Potencial Hidrogeniônico

HE – Hematoxilina e Eosina

TM – Tricrômio de Masson

TO – Tecido ósseo

TC – Tecido conjuntivo

BTCP – Grupo Biocerâmica

BPPL – Grupo β TCP/PCL/PLGA

BPPLDO – Grupo β TCP/PCL/PLGA/DOX/ β CD

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	Tecido ósseo	22
2.2	Alternativas para regeneração óssea	27
2.2.1	Enxertos ósseos	27
2.3	Compósitos	30
2.4	Biomateriais	32
2.4.1	Biocerâmicas de fosfato de cálcio	33
2.4.2	Polímeros	36
2.4.2.1	Policaprolactona (PCL)	36
2.4.2.2	Poli (Ácido lático co glicólico) (PLGA)	39
2.4.3	Compósitos (biocerâmica e polímeros)	41
2.4.4	Doxiciclina (DOX)	43
2.5	Sistema de liberação de fármacos	46
2.5.1	Sistema de encapsulamento de drogas	49
2.5.2	Ciclodextrinas	50
2.5.3	Polímeros e sistema de liberação de drogas	53
2.5.4	Compósito β TCP/PCL/PLGA/DOX/ β CD	55
3	OBJETIVOS	57
3.1	Objetivo geral	57
3.2	Objetivos específicos	57
4	METODOLOGIA	58
4.1	Materiais	58
4.2	Preparo dos compósitos	58
4.2.1	Preparo do compósito de inclusão	58

4.2.2 Preparo do composto β TCP/PCL/PLGA/DOX/ β CD	59
4.3 Cálculo amostral	60
4.4 Aspectos éticos	62
4.5 Procedimento cirúrgico experimental	62
4.6 Testes de biocompatibilidade	66
4.6.1 Análise histológica	66
4.6.2 Análise histomorfométrica	67
4.6.3 Análise histológica das amostras submetidas a marcação por TRAP	68
4.7 Análise estatística dos dados	69
5 RESULTADOS	70
5.1 Análises histológicas	70
5.1.1 Coloração por hematoxilina-eosina (HE)	71
5.1.1.1 Coágulo 14 dias	72
5.1.1.2 Coágulo 28 dias	73
5.1.1.3 Biocerâmica 14 dias	75
5.1.1.4 Biocerâmica 28 dias	76
5.1.1.5 Biocerâmica + Polímeros – 14 dias	79
5.1.1.6 Biocerâmica + Polímeros – 28 dias	80
5.1.1.7 Grupo experimental DOX 5% - 14 dias	83
5.1.1.8 Grupo experimental DOX 5% - 28 dias	84
5.1.2 Coloração por Tricrômio de Masson	87
5.1.2.1 Grupo Coágulo	88
5.1.2.2 Grupo Biocerâmica	89
5.1.2.3 Grupo Biocerâmica + Polímeros	89
5.1.2.4 Grupo Experimental DOX 5%	90
5.2 Marcação para TRAP	91
5.3 Análise histomorfométrica	95
6 DISCUSSÃO	101

7 CONCLUSÕES	107
REFERÊNCIAS	109
ANEXOS	125

1 INTRODUÇÃO

As perdas ósseas alveolares causadas por exodontias, periodontite avançada, infecção endodôntica, traumas, processos patológicos, defeitos congênitos, reabsorção fisiológica normal, bem como a combinação de todos esses fatores podem causar o comprometimento do rebordo alveolar (ALVIN *et al.* 2004).

Após a exodontia, coágulo sanguíneo é formado no interior do alvéolo dentário, associado a intenso processo inflamatório, que são os estímulos para posterior neo-formação óssea. O osso é um tecido duro que acumula duas funções principais: suporte estrutural e metabolismo de cálcio, não admitindo, porém, carga excessiva. Na região anterior da maxila o osso alveolar é rapidamente remodelado, ocorrendo perda de 25% de volume no primeiro ano, e 40 a 60% da espessura nos três anos após a extração. Nas regiões posteriores, o índice de perda óssea inicial é geralmente maior do que nas regiões anteriores, porém o volume inicial de reabsorção posterior é o dobro da anterior e, mesmo com perda de 50%, ainda há um volume adequado para instalação de implantes. (PERRI DE CARVALHO *et al.* 2002).

Por esta razão, diferentes técnicas têm sido empregadas com o intuito de preservar ou melhorar a dimensão e o contorno do rebordo pós-exodontia, incluindo-se o uso de implantes, de materiais de enxerto ou membranas (DOUGLASS *et al.* 2005; IRINAKIS *et al.* 2007; ARAÚJO *et al.* 2009).

Embora o tecido ósseo tenha uma considerável capacidade de regeneração, ainda existem muitas situações em que este processo se apresenta de forma limitada, constituindo um desafio para os procedimentos ósseos reconstrutivos. Dentre as alternativas disponíveis para os procedimentos cirúrgicos ligados à reconstrução de tecidos e órgãos estão o autotransplante (enxerto autógeno), o aloenxerto (transplante entre indivíduos geneticamente diferentes, de uma mesma espécie), o xenoenxerto (enxerto cirúrgico de tecido de uma espécie para outra distinta) e os biomateriais (LEGEROS, 2008).

Biomateriais são estruturas de suporte formadas de materiais biocompatíveis. São substâncias de origem natural ou sintética, usadas de forma temporária ou permanente para tratar, restaurar e/ou substituir algum órgão ou

função do corpo humano (GALETTI *et al.*, 1982). O uso clínico de biomateriais osteocompatíveis e bioativos (material que induz uma resposta biológica específica, sendo o oposto de bioinerte) (LEGEROS, 2008), tem importantes aplicações na reparação e reconstrução óssea. Existem várias técnicas e materiais usados na preparação de reparo ósseo, porém deve-se avaliar o comportamento desse material quanto à estabilidade em ambiente fisiológico e resistência mecânica (ORÉFICE, 2006). Quando uma perda significativa de tecido ocorre como resultado de trauma ou da extirpação de processos patológicos, uma abordagem alternativa para cura total é a utilização de recursos provenientes da engenharia de tecidos (LANGER; VACANTI, 1993; IKADA *et al.*, 2006).

As biocerâmicas (BC) têm apresentado utilidade em reconstruções de grandes perdas ósseas faciais e ortopédicas, mostrando condições satisfatórias em relação à resistência mecânica e módulo de elasticidade do tecido ósseo neoformado em função da osteocondução (processo no qual é provido um arcabouço micro e macroscópico para possibilitar a migração de elementos celulares envolvidos na formação óssea: células mesenquimais, osteoblastos, osteoclastos e vasculatura) (FITCH *et al.*, 1997) e osteoindução (processo de recrutamento de células mesenquimais circundantes que diferenciarão em células formadoras de cartilagem e osso, sob a influência de BMPs (URIST, 1980; STEVENSON, 1999), onde a bioação (capacidade do material de induzir a deposição de cristais de apatita sobre sua superfície (LEGEROS, 2008)) envolvida é a osteogênese (formação óssea sem a indicação de origem celular, ou seja, o osso neoformado pode se originar de células vivas do enxerto ou de células derivadas do hospedeiro) (STEVENSON, 1999). Dentre elas, as cerâmicas de fosfato de cálcio são reconhecidamente biocompatíveis e possuem propriedades bioativas. Apresentam constituição química inorgânica semelhante à do osso natural, o que as torna substitutos ósseos promissores nos campos ortopédico e maxilofacial (FELLAH *et al.*, 2007).

Uma abordagem para melhorar as propriedades mecânicas (como por exemplo, resiliência e elasticidade), químicas e biológicas de biomateriais é a produção de compósitos orgânico-inorgânico, que é a associação de diferentes materiais para uma finalidade comum, buscando otimização de propriedades (LEGEROS, 2008).

Por isso, como maneira de tentar melhorar as propriedades mecânicas e biológicas, as cerâmicas e vidros tem sido associados com polímeros, formando um compósito, pois sua degradação é controlável e favorece a formação de uma microarquitetura porosa e interconectada induzindo a neoformação óssea (BYUN *et al.* 2014).

Os polímeros biodegradáveis, além de também servirem como arcabouço para osteocondução, são amplamente empregados como sistemas de liberação controlada de fármacos. Vários produtos e processos foram desenvolvidos, com o intuito de se obter sistemas de liberação controlada, objetivando controlar a velocidade de liberação do fármaco, mantendo seu nível terapêutico por um período de tempo maior, e também dirigir sua ação a um local específico (ADERIBIGDE *et al.* 2015; LEE *et al.* 2008). Tais características promoveriam redução de efeitos adversos e tóxicos, além da redução do número de administrações e maior adesão do paciente ao tratamento (LIMA *et al.*, 1999).

O sucesso da utilização de um biomaterial pode estar comprometido por vários fatores locais que dependem das características do material, da manipulação durante o processo cirúrgico e da resposta do hospedeiro ao material implantado. Dentre os diversos antibióticos utilizados clinicamente, as tetraciclina (TCs), nomeadamente a Doxíciclina, apresentam, como efeito primário, um espectro antimicrobiano apropriado para o tratamento de infecções ósseas e uma eficácia clínica comprovada. Além do efeito anti-infeccioso, este fármaco parece exercer efeitos diretos no microambiente ósseo que, aparentemente, se traduzem por um efeito benéfico nos processos de regeneração tecidual (CHAUDHARY; AVIOLI, 1994).

Assim, este estudo tem como finalidade avaliar a influência da Doxíciclina, e seu comportamento osteogênico, quando adicionada ao compósito produzido com cerâmica de beta tricálcio fosfato associado a polímeros (PCL e PLGA) e β -ciclodextrina, em alvéolos de ratos com defeitos ósseos padronizados e não críticos, imediatamente após a exodontia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Tecido ósseo

O tecido ósseo pode ser dividido em quatro componentes microestruturais: células, matriz orgânica, matriz inorgânica e fatores sinalizadores solúveis (BUCKWALTER *et al.*, 1996).

Este tecido é constituído de 70% de componentes inorgânicos e 30% de componentes orgânicos. Na parte orgânica encontramos 2% de células e 98% de matriz extracelular, onde o colágeno protéico fibroso representa 95% do total, enquanto os 5% restantes são preenchidos por polissacarídeos, lipídeos e fosfolipídios (BUCKWALTER *et al.*, 1996).

Entre os componentes inorgânicos encontramos o cálcio e o fosfato, que formam a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e outros elementos como magnésio, sódio, potássio e, em menor concentração, zinco, manganês, flúor e molibdênio. Nesta parte estão depositados 99% do cálcio, 85% do fósforo e 66% do magnésio encontrados no organismo humano (SEEMAN, 2008).

Além de sua função de suporte e proteção, o tecido ósseo funciona como reservatório de minerais, e sua complexa fisiologia é controlada por fatores hormonais, forças mecânicas, fatores de crescimento e citocinas (TENCATE, 1994).

As etapas do desenvolvimento ósseo são reguladas por uma hierarquia de programas genéticos, endócrinos e mecânicos (BRACHVOGEL *et al.*, 2003).

Células ósseas são organizadas em uma rede de interconexão que se estende dos osteócitos enclausurados na matriz até os osteoblastos presentes na superfície óssea. O tecido ósseo exhibe propriedades de memória de curto e longo prazo, semelhante às células nervosas (TURNER *et al.*, 2002).

Os principais fenótipos celulares associados ao osso são o osteócito, o osteoblasto e o osteoclasto. Suas origens, funções e localizações estão listadas no quadro a seguir.

Macroscopicamente o tecido ósseo é composto por osso cortical, correspondente a 80% de seu peso total no organismo humano, mas ocupa apenas 50% da área, sendo encontrado principalmente na diáfise dos ossos longos. O restante da área é ocupada pelo osso esponjoso, que corresponde

aos demais 20% do peso. Quanto ao metabolismo, o osso esponjoso é oito vezes mais ativo, apresentando maior remodelação (TURNER *et al.*, 2002).

Composição celular óssea e suas características.

Tipo Celular	Origem	Localização	Função
Osteócitos	Diferenciação de osteoblastos	Matriz extracelular	Secreção de fatores de crescimento
Osteoblastos	Células Mesenquimais	Maioria no periósteo	- Formação óssea - Regulação do Metabolismo ósseo - Mineralização da matriz óssea
Osteoclastos	Precursores mononucleados provenientes da medula óssea	Locais de maior atividade óssea: fratura, tumores, metástases	Reabsorção óssea.

Fonte: TURNER *et al.*, 2002.

Os principais fenótipos celulares associados ao osso são o osteócito, o osteoblasto e o osteoclasto. O osteócito fica dentro da matriz extracelular, após esta ter sido por ele depositada sob a forma de osteoblasto. O osteoblasto é responsável pela formação óssea tanto do tecido osteoide, como da mineralização com a formação de cristais de HA. O osteoclasto é o responsável pela reabsorção óssea e é encontrado nos locais de maior atividade óssea, como em processos patológicos como fraturas, tumores ósseos primários e metástases de outros tumores nos ossos. O osteoblasto tem origem primária em uma célula mononuclear de linhagem sanguínea chamada células-tronco mesenquimais (CTMs), e o osteoclasto é derivado de um monócito macrófago, sendo que serão diferenciados de suas células de origem durante toda vida. O tecido ósseo encontra-se em contínuo processo de deposição e reabsorção, regulado por uma série de hormônios e outros elementos (MARINHO, 1995).

Os osteoblastos são as células responsáveis pela síntese, deposição e mineralização da matriz extracelular óssea. Essas células iniciam e controlam a mineralização do tecido ósseo, sendo que todas as outras células osteogênicas contribuem individualmente para o remodelamento ósseo (LANGER, 2000).

Num estado fisiológico normal, existe um acoplamento entre reabsorção e formação relacionadas com a remodelagem óssea. Entretanto, em várias doenças metabólicas que podem acometer os ossos, como por exemplo, nas osteoporoses há um relativo excesso de destruição óssea comparada com sua respectiva formação, ocorrem anormalidades nesta coordenação. Isso é comumente causado pelo desequilíbrio entre os processos de reabsorção e neoformação óssea (MUNDY, 1991).

Durante o período de reparo ósseo alveolar, inevitavelmente ocorre uma reabsorção óssea fisiológica levando à uma diminuição na altura e espessura do rebordo/alvéolo envolvidos, sendo essa perda mais pronunciada na região vestibular, quando comparada às paredes palatinas e linguais do rebordo alveolar, caracterizando a perda óssea alveolar em diferentes magnitudes. Na região anterior da maxila o osso alveolar é rapidamente remodelado, ocorrendo perda de 25% de volume no primeiro ano, e 40 a 60% da espessura nos três anos após a extração. Nas regiões posteriores, o índice de perda óssea inicial é geralmente maior do que nas regiões anteriores, porém o volume inicial de reabsorção posterior é o dobro da anterior e, mesmo com perda de 50%, ainda há um volume adequado para instalação de implantes. (SCHROPP *et al.*, 2003; PERRI DE CARVALHO *et al.*, 2002)

Os eventos relacionados com a formação óssea incluem atração dos precursores de osteoblastos para o sítio do defeito ósseo, a partir de um processo de quimiotaxia, e estimulação da proliferação e maturação destes precursores, os quais são capazes de sintetizar as proteínas ósseas, ou seja, colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, fosfatase alcalina, proteoglicanos e outros componentes estruturais. Além disso, ocorre a síntese de fatores regulatórios de crescimento, os quais são armazenados dentro da matriz óssea por curto período de tempo, quando então, acontece a mineralização dessa estrutura (MUNDY, 1991)

A interação entre elas controla a atividade e a intensidade deste remodelamento. Essa interação de contato célula-célula pode ser mediada por moléculas da família das integrinas ou pode ser mediada pela liberação de polipeptídeos que funcionam conectando-se a receptores específicos. Entre os fatores polipeptídicos conhecidos, uma família de citocinas pleiotrópicas que partilham um sinal comum, desempenha um papel chave no remodelamento ósseo. Desta família fazem parte entre outras, a IL6 e a IL1 (GEORGES *et al.*, 2009).

A reparação tecidual óssea é um processo complexo que envolve respostas locais e sistêmicas. Frequentemente, essa reparação é mais lenta em relação à separação de tecidos moles, devido a diferente morfologia e composição entre os tecidos. O tecido ósseo possui uma enorme capacidade de regeneração na maioria dos casos, o que possibilita a restauração de sua arquitetura e função original. No entanto, existem algumas condições que dificultam essa capacidade de regeneração e a completa reparação pode não ocorrer, caso não haja um bom suprimento sanguíneo, estabilidade mecânica ou ocorra alta proliferação de outros tecidos locais (PINHEIRO; LIMEIRA JUNIOR; GERBI, 2003).

Quando lesões ou defeitos ósseos ocorrem nas mais variadas situações clínicas, a construção tecidual, que devolve a integralidade funcional e mecânica, constitui-se num passo necessário para a reabilitação do paciente. A maior parte dessas lesões, em virtude do seu potencial de regeneração espontânea, repara-se adequadamente pelo emprego de terapias conservadoras ou técnicas cirúrgicas convencionais. No entanto, procedimentos de enxertia e substituição óssea são frequentemente necessários, especialmente em ortopedia e em intervenções bucomaxilofaciais, quando da existência de defeitos ósseos extensos decorrentes de traumas, procedimentos cirúrgicos e deformidades ósseas congênitas (CANCEDDA, 2003).

Estratégias de engenharia tecidual vem sendo desenvolvidas afim de aperfeiçoar a indução da remodelação óssea utilizando matrizes tridimensionais (compósitos) biodegradáveis adequadas em relação à estrutura mecânica, proliferação e viabilidade das células, quando colonizadas em compósitos. O sucesso clínico das estratégias em engenharia de tecidos depende da existência de uma fonte de células para a geração de osteoblastos funcionais. Na estratégia

da bioengenharia de tecido ósseo, o transplante autógeno de células é um dos mais prósperos conceitos em desenvolvimento. Esta técnica elimina a morbidade do sítio de doadores em intervenções que envolvem enxertia autógena. Além de suprimir reações de imunogenicidade inerentes a procedimentos que utilizam enxertos alógenos, assim como evita o risco de insucessos que permeia regimes terapêuticos à base de implantes alopáticos na reconstrução das estruturas envolvidas (VACANTI *et al.*, 1998).

A engenharia de tecido é baseada na criação de um novo tecido, semelhante ao tecido perdido, através da regeneração induzida ou da persuasão do organismo na sua própria cura através do endereçamento, ao local específico, de promotores de regeneração, tais como: células, moléculas sinalizadoras, sinais mecânicos e uma estrutura de suporte (WILLIANS, 2006). Para regenerar o tecido ou órgão lesado, a engenharia de tecidos utiliza três ferramentas básicas: células, matrizes tridimensionais (3D) e fatores de crescimento. A definição mais ampla dessa técnica incluiria, entre seus objetivos, o desenvolvimento e a manipulação de implantes artificiais, de tecidos gerados em laboratório e/ou células e moléculas capazes de substituir ou estimular funcionalmente partes defeituosas ou lesadas (IKADA *et al.*, 2006; TABATA *et al.*, 2006).

Na engenharia de tecidos, as células colonizam a matriz 3D e são as responsáveis pela síntese de matriz extracelular (MEC) do novo tecido, enquanto a matriz 3D é responsável por fornecer um meio ambiente favorável à execução adequada das funções celulares. A maioria das células isoladas de órgãos é dependente de ancoragem. Assim, a presença de um material que possa agir como plataforma de adesão e promoção do crescimento celular é essencial. Biomateriais são normalmente associados aos materiais colocados em contato com o tecido humano com o objetivo de recompor alguma parte danificada. Este tipo de material se diferencia de outros materiais por conter uma combinação de propriedades mecânicas, químicas, físicas e biológicas que tornará viável a sua utilização no corpo humano (ORÉFICE, 2006).

A osteogênese é um processo complexo, que envolve a ação de fatores locais e sistêmicos, estimulando a formação, tais como fatores de crescimento, hormônios e vitaminas. Porém, a quantidade e qualidade de osso neo-formado sob condições experimentais é influenciada pela espécie animal, idade,

localização anatômica, envolvimento cortical (mono-cortical ou bi-cortical), presença de periósteo e estabilidade do enxerto. Condições completamente ideais de experimentação ainda precisam ser descritas, porém (ALKAN *et al.*, 2002).

Nesse sentido torna-se necessário estabelecer condições para que o tecido ósseo possa se regenerar em situações clínicas consideradas inóspitas, como em locais que apresentem suprimentos sanguíneos comprometidos, em áreas de difícil consolidação, em regiões que possuem defeitos com dimensões críticas e no levantamento de seio maxilar onde o tecido esteja completamente ausente. Para a maioria dessas aplicações, uma fonte celular é imprescindível (BOYAN *et al.*, 2003).

2.2. Alternativas para regeneração óssea

2.2.1. Enxertos ósseos

O enxerto ósseo representa um procedimento padrão frequentemente utilizado na regeneração óssea, sendo empregado nas mais diversas especialidades médicas como, ortopedia, oncologia, cirurgia plástica e, na área odontológica, na implantodontia e na cirurgia bucomaxilofacial. Na ortopedia os enxertos ósseos são utilizados, por exemplo, para estimular a cicatrização óssea em cirurgias e traumas de grandes proporções, não uniões, fusões articulares, necrose avascular e na reconstrução de membros. Na odontologia, é muito utilizado em cirurgias reconstitutivas dos maxilares prévia a colocação de implantes dentários de Titânio, regeneração periodontal e reconstrução do rebordo alveolar, por exemplo, também, em fissuras lábio-palatinas congênitas (DE LONG JR, 2007; FINKEMEIER, 2002; JENSEN, 2012).

O material de enxertia, ideal para reconstrução óssea, deve apresentar as seguintes características (BLOCK, 2006):

- Esterelizável;
- Integridade estrutural para manter o espaço como arcabouço durante a instalação do enxerto (Propriedade conhecida como *Osteocondução*), consolidação, maturação e o completo reparo ósseo;

- Capacidade de ser reabsorvido, reformulado e substituído por osso natural viável;

- O material deve ser de fácil manipulação e colocação no leito receptor, minimizando assim a duração do procedimento cirúrgico e maximizando o potencial de sucesso do procedimento.

Os enxertos ósseos podem ser classificados em relação as propriedades biológicas que apresentam quando instalados no leito receptor. Essas propriedades são a *Osteocondução*, a *Osteoindução* e a *Osteogênese* (DINOPOULOS, 2012).

A osteocondução é a capacidade do enxerto auxiliar a cicatrização através do seu arcabouço micro e macroscópico, permitindo a infiltração vascular e a migração interna de elementos celulares envolvidos na formação do osso, como células mesenquimais indiferenciadas, osteoblastos, osteoclastos, entre outros. Normalmente, a osteocondução é mais eficiente quando outras propriedades, como a osteoindução e a osteogênese estão presentes no mesmo material, não deixando, porém, de existir isoladamente. A osteocondução parece ser otimizada em dispositivos que imitam não só a estrutura física do osso, mas também a composição química do mesmo (GIANNOUDIS, 2005).

A osteoindução foi primeiramente demonstrada por Urist, em meados dos anos 1960, que evidenciou a notável capacidade do osso induzir a osteogênese em sítios ectópicos. Observou-se, assim, que o tecido ósseo poderia apresentar componentes que teriam a capacidade de serem isolados e, dessa maneira, servirem como indutores de crescimento em outros locais. Desde então, o tecido ósseo passou a ser observado como um composto fisiológico complexo, contendo minerais, proteínas e elementos celulares com propriedades únicas. Este processo de osteoindução é aquele pelo qual as células mesenquimais indiferenciadas (pluripotentes) e células osteoprogenitoras do leito receptor são induzidas a diferenciarem-se em osteoblastos após a exposição às proteínas e células provenientes do enxerto. Essa cascata de eventos celulares é mediada por inúmeros fatores de diferenciação e crescimento, destacando-se a superfamília do fator de transformação do crescimento (TGF-beta) e as proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) (DIMITRIOU, 2005).

A osteogênese é a formação de novo osso a partir de células mesenquimais indiferenciadas e células osteoprogenitoras vivas, provenientes

do enxerto ou oriundas do próprio leito receptor, no hospedeiro. Essas células tem um papel importante como precursoras de osteoblastos e são responsáveis por metade do equilíbrio homeostático e anabólico, além de regular a osteoclastogênese através da expressão da proteína ligante RANK-L. Diferentes conjuntos de mediadores moleculares interagem com células locais e circulantes para coordenar a cascata de cicatrização: estimuladores de inflamação (IL-1 e IL-6), estimuladores de proliferação (TGF-beta), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Os efeitos destas moléculas sobre a proliferação e diferenciação de células indiferenciadas já foram bem demonstrados e descritos *in vitro* (BIELBY, 2007).

Os enxertos ósseos se dividem em quatro categorias principais: autógenos, alógenos, xenógenos e aloplásticos, sendo que o osso autógeno é considerado o *padrão ouro* na regeneração óssea, devido ao seu potencial osteogênico, de osteoindução e osteocondução. O transplante de osso autógeno consiste de matriz óssea, células autólogas e fatores de crescimento armazenados na matriz e transportados com o implante (Meinel *et al.* 2005). No entanto, o procedimento de coleta requer um segundo sítio operatório, no qual podem ocorrer complicações, além de a quantidade de osso coletada ser relativamente limitada. Para o sucesso do enxerto no leito receptor, é necessário que a região ofereça irrigação sanguínea adequada, ausência de processos infecciosos e inflamatórios e proporcione estabilidade física ao material do enxerto (FELLAH *et al.*, 2007).

Já os xenoenxertos, em especial o osso bovino, também conhecido como osso mineral natural liofilizado, são amplamente utilizados, consistindo de um arcabouço ósseo inerte de estrutura tridimensional semelhante à matriz óssea mineralizada (SCHWARZ *et al.*, 2007). Essa matriz óssea mineral bovina desproteinizada tem sido amplamente utilizada com o intuito de preservar as dimensões da crista alveolar após procedimentos de exodontias tão bem como os defeitos ósseos angulares nos dentes e em procedimentos de elevação de seios maxilares (CARMANGNOLA *et al.* 2003; ARTZI *et al.* 2000, 2004; NEVINS *et al.* 2006).

Na tentativa de se encontrar um substituto ósseo ideal, diversos materiais aloplásticos têm sido pesquisados. Estes devem apresentar boas propriedades

físico-químicas, como biocompatibilidade, reabsorbilidade, degradação controlada, substituição simultânea por novo osso formado, osteocondução e integridade mecânica, a fim de suportar a cicatrização após os procedimentos e regeneração óssea guiada (SCHWARZ *et al.*, 2007).

É importante ressaltar que os materiais osteocondutores não tem capacidade de induzir a citodiferenciação de osteoblastos, mas sim conduzindo e orientando novas células originadas por proliferação das osteoprogenitoras, provenientes das margens dos defeitos, a promoverem a neoformação de tecido ósseo (COOK *et al.*, 1996).

Dentre as vantagens relacionadas aos materiais aloplásticos, podem-se destacar a disponibilidade comercial em grande quantidade, facilidade de manipulação, além da possibilidade de uma integração física e/ou química no meio inserido (SANTOS, 2002).

2.3. Compósitos

Os compósitos são uma associação de materiais para uma finalidade comum, buscando otimização de propriedades e têm sido usados no estímulo da formação de tecido ósseo e osteointegração (LEGEROS, 2008). A regeneração do tecido ósseo feita por compósitos cerâmicos mostrou-se como uma excelente alternativa em técnicas terapêuticas recentes. Além disso, o desenvolvimento de compósitos artificiais para reconstrução óssea oferece diversas vantagens distintas para estudos com células (ARINZEH *et al.*, 2005; UEMURA *et al.*, 2003).

Estes compósitos devem possuir unidades moleculares que possibilitem modificações e taxa controlada de biodegradação, não desenvolver toxicidade tóxica ou sistêmica, possuir propriedades para promover ou inibir interação célula-matriz e célula-célula, apresentar respostas imunes à inflamação. Além disso, deve ser um material de fácil produção, purificação ou aquisição e apresentar compatibilidade com substâncias químicas e soluções aquosas em condições fisiológicas (HOLMES, 1986).

Os compósitos devem ainda ser osteocondutores, promotores e integradores no que se refere à capacidade do enxerto conduzir o desenvolvimento de novo tecido ósseo através de sua matriz de suporte, requerendo a presença de tecido

ósseo pré-existente como fonte de células osteoprogenitoras. Este compósito deve ser gradativamente reabsorvido e simultaneamente substituído pelo tecido ósseo neoformado. (SICCA *et al.*, 1990).

Considerado de forma integrada, tanto sob o aspecto da engenharia de materiais quanto ao tipo de tecido e reparo necessário, o primeiro passo para a reconstrução de um órgão ou tecido visa a seleção do suporte para as células. A seleção leva em consideração tanto o tipo e o local da lesão, como a sua extensão (BARBANTI, 2005). Esta estratégia permite que as células façam adesão ao suporte, proliferem e secretem matriz extracelular específica do tecido ósseo, até obter-se um substituto artificial com características morfo-funcionais do tecido original, que pode finalmente ser transplantado para tratar o defeito em causa. Para que uma estratégia deste tipo seja bem-sucedida, pelo menos três componentes fundamentais devem ser cuidadosamente estudados: o material de suporte (compósito), as células e o sistema de cultura *in vitro* (HUTMACHER, 2000). Ainda, a estabilidade e degradabilidade de compósitos nos fluidos corporais são aspectos importantes do comportamento de materiais para aplicações em Engenharia de Tecidos (PEREIRA *et al.*, 2005).

Quando células ósseas se aderem a um substrato sólido, o seu comportamento e função dependem das propriedades do biomaterial. As características superficiais e topografia, a superfície química e tratamento, bem como as características de degradação do biomaterial afetam a viabilidade celular, adesão e expansão, mas também influenciam a adsorção de moléculas biológicas secretadas das células ósseas que podem formar uma matriz extracelular que, por sua vez, ativam receptores da superfície celular e proteínas intracelulares envolvidas na transdução de sinais. Outro aspecto importante da implicação da interface célula-biomaterial na mecanotransdução óssea é a capacidade do biomaterial para adsorver biomoléculas secretadas pelas células ósseas ou de ser modificado de forma que estas biomoléculas farão parte da superfície do biomaterial (SIKAVITSAS, 2001).

2.4. Biomateriais

Os biomateriais são substâncias de origem natural ou sintética que são utilizadas, de forma transitória ou permanente, como um todo ou parte de um sistema que trata, restaura ou substitui algum tecido, órgão ou função do corpo humano (GALETTI, *et al.*, 1982). Atualmente, o uso de biomateriais tem se tornado uma prática bastante empregada em diversas especialidades médicas e vários fatores têm incentivado o desenvolvimento de novos materiais com propriedades mais aprimoradas e adequadas à aplicação do implante e que executem sua função com êxito pelo período de tempo desejado. Dentre esses fatores, podem ser citadas a necessidade de se reduzir o número de cirurgias de revisão destinadas a substituir implantes danificados, o aumento da expectativa de vida da população e o aumento do número de acidentes traumáticos que implicam na substituição total ou parcial de tecidos.

Existem diversos tipos de dispositivos que podem ser classificados em: bioinertes; biodegradáveis e não biodegradáveis; dispositivos injetáveis; bioadesivos e compósitos, dependendo do material envolvido na sua concepção. Os materiais bioabsorvíveis são projetados para, após certo período de tempo em contato com o tecido vivo, serem consumidos lentamente pelo organismo, dando lugar ao tecido recuperado. Os materiais bioativos permitem uma resposta biológica específica na interface com o tecido vivo, possibilitando a formação de uma ligação de natureza química entre o tecido e o próprio material. Neste caso, o tecido é capaz de interagir intimamente com o material, depositando-se diretamente sobre a superfície do mesmo sem a intervenção da camada de tecido fibroso (MEDLICOTT *et al.*, 1994).

Um biomaterial ideal deveria induzir uma rápida, previsível e controlada cicatrização dos tecidos hospedeiros (OLIVEIRA, 2004). Os biomateriais podem ser usados para implantação permanente no corpo humano ou como um suporte temporário de células e tecidos. Em ambos os casos, a superfície desses materiais deve prover sinais químicos e físicos que guiem a diferenciação e agrupamento de células para formarem os novos tecidos (DIENER, 2005). Segundo Tengvall e Lundström (1992) alguns pré-requisitos são desejáveis para que um biomaterial seja aplicado em tecidos duros (ossos e dentes) e moles (tecido conjuntivo e epitelial) como:

- Biocompatibilidade, que significa uma menor toxicidade intrínseca do material, baixa reatividade com macromoléculas, indução de resposta inflamatória ao longo do tempo e imunogenicidade;
- Biofuncionalidade, por exemplo, mecânica, que é diferente para osso, tecido mole ou próteses vasculares;
- Textura de superfície compatível com a adesão celular;
- Resistência à corrosão, para manter as propriedades mecânicas e impedir a degradação do material frente aos fluidos corporais, se for o objetivo do biomaterial;
- Bioadesividade, química, eletrostática e mecânica, com o intuito de promover uma ligação entre a órtese e o tecido adjacente, combinando um período apropriado de cicatrização, evitando uma encapsulação fibrosa do implante;
- Prevenir uma adesão bacteriana e/ou facilitar sua morte;
- Baixo custo e facilidade no processamento também são desejáveis.

O critério de seleção de biomateriais é baseado principalmente na aplicação a que se destinam. Em indicações ortopédicas e odontológicas, os materiais são componentes de implantes estruturais ou são usados para reparar defeitos ósseos. A escolha de um material para ser utilizado como biomaterial passa, necessariamente, pela análise de um conjunto de requisitos. Assim, um material apto a ingressar na classe de biomateriais deve apresentar biocompatibilidade e biofuncionalidade (PRADO DA SILVA, 1999; ELGALI, 2017).

2.4.1. Biocerâmicas de Fosfato de Cálcio

Dentre esses materiais, as cerâmicas de fosfato de cálcio apresentam propriedades biocompatíveis e bioativas, além de apresentarem uma constituição química inorgânica semelhante à do osso natural, tornando-as substitutos ósseos promissores nos campos ortopédico e maxilofacial (FELLAH *et al.*, 2007). As maiores diferenças entre elas são devidas a algumas propriedades, tais como a proporção cálcio/fosfato, cristalinidade, temperatura

de sinterização e outras características físicas. A hidroxiapatita (HA) $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ e o beta-tricálcio fosfato (β -TCP) $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ são cerâmicas fosfato de cálcio largamente utilizadas. Estes biomateriais são atóxicos e apresentam ótima atividade osteocondutiva se diferenciando não apenas na composição, mas também na taxa de degradação de suas partículas. As cerâmicas β -TCP (Figura 01) são constituídas praticamente de cálcio e fosfato e suas partículas são mais rapidamente reabsorvidas que as de hidroxiapatita, as quais podem permanecer por vários anos em meio ao osso neoformado (MANJUBALA *et al.*, 2002; DACULSI *et al.*, 2003). Diferentes estudos têm mostrado que a utilização de cerâmicas β -TCP em fase pura possibilita a preservação das dimensões dos alvéolos pós-exodontias, através da dissolução gradativa e completa de suas partículas com concomitante substituição por tecido ósseo neoformado (TRISI *et al.*, 2003; ARTZI *et al.*, 2004; ELIAZ e METOKI, 2017).

Os biomateriais utilizados para preenchimento de alvéolos dentários apresentam propriedade de osteocondução, ou seja, funcionam como substrato para a implantação de osteoblastos e deposição de matriz óssea, permitindo a formação de trabéculas ósseas em meio às partículas do material (BALLA *et al.*, 1991). O processo de neoformação óssea se inicia na periferia da área de enxerto, através da diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos e sua migração em direção ao biomaterial. As partículas dos biomateriais podem ser dissolvidas pela ação de macrófagos através de fagocitose e redução do pH nos fagolisossomos. Os íons cálcio e fosfato liberados do biomaterial estimulam a nucleação secundária de hidroxiapatita favorecendo a mineralização da matriz óssea (ORLI *et al.*, 1989). Assim, o tecido ósseo é formado e sofre processo de remodelação com participação de osteoblastos e osteoclastos.

Diversos estudos têm avaliado clínica e histologicamente os efeitos da implantação de cerâmicas de fosfato de cálcio em diferentes sítios anatômicos.

Embora a velocidade de neoformação óssea possa ser influenciada com a utilização de biomateriais para preenchimento, clinicamente, vários trabalhos mostram que o uso destes ou de membranas oclusivas em alvéolos frescos têm resultado em menores perdas teciduais nos sentidos ápico-coronários e vestibulo-linguais dos processos alveolares, quando comparados a controles

onde não foram realizadas quaisquer das técnicas regenerativas (IASELLA *et al.*, 2003; SERINO *et al.*, 2003). Por outro lado, alguns autores não verificaram diferenças clínicas significativas quando comparados a alvéolos ou defeitos ósseos preenchidos com coágulo sanguíneo apenas (CAMARGO *et al.*, 2000; TRISI *et al.*, 2003; ZUBILLAGA *et al.*, 2003). Além disso, exames histológicos de amostras de alvéolos frescos preenchidos com biomateriais mostraram, com frequência, remanescentes residuais de cerâmica não degradados ou reabsorvidos, mesmo após longos períodos de implantação (NORTON *et al.*, 2003; FROUM *et al.*, 2004; THOMPSON *et al.*, 2006; ARTZI *et al.*, 2000; FROUM *et al.*, 2002; CARMAGNOLA *et al.*, 2003).

Com o objetivo de se obter um melhor arcabouço para o ganho de volume ósseo e conseqüentemente, um melhor desempenho do que a hidroxiapatita (HA) e o β -TCP isolados, foram desenvolvidas cerâmicas de fosfato de cálcio bifásico (BCP), que consistem de uma mistura de HA e β -TCP (LEGEROS *et al.* 2003; DACULSI *et al.* 2003; MANJUBALA *et al.*, 2002). O conceito da BCP é baseado no ótimo equilíbrio entre a fase mais estável (HA) e a mais solúvel (β -TCP).

A formação óssea pode acontecer diretamente à superfície do material, obtendo-se uma forte adesão ao tecido ósseo. Por outro lado, a osteoindução é considerada como uma propriedade dos materiais que induzem a formação de tecido ósseo. No passado, essa propriedade foi descrita somente com relação a materiais que continham fatores proteicos osteoindutivos, como as proteínas morfogenéticas (BMPs). Em princípio, qualquer material cerâmico que é suficientemente biocompatível e biodegradável pode ser usado como um implante em tecido vivo. O material cerâmico é capaz de prover uma superfície de fosfato de cálcio, *in vitro* ou *in vivo*, apresentando essa estrutura de superfície específica. É desejável que o material cerâmico seja capaz de adsorver os agentes biologicamente ativos, como fatores de crescimento, BMP's, etc., *in vitro* ou *in vivo*. Exemplos de materiais cerâmicos incluem fosfato de cálcio, biovidros e materiais que contêm cálcio, fosfato e/ou biovidros. (RIPAMONTI; DUNEAS, 1996).

Entretanto, as hidroxiapatitas apresentam algumas limitações, como: 1) limitada capacidade de suportar carga de torção; 2) a pouco adequada tolerância de corte; e 3) uma reabsorção mínima quando as hidroxiapatitas puras,

policristalinas são usadas. Por essas razões, o seu uso em regiões esqueléticas submetidas a altos esforços é limitada, o que já não acontece da mesma forma com as octacálcio fosfato bifásicas micro/macroporosas. Com isso, tem-se uma grande utilização nos reparos e/ou reconstruções das perdas ósseas em geral em odontologia e medicina (RIPAMONTI; DUNEAS, 1996).

Figura 01 – Apresentação laboratorial da biocerâmica de β TCP, na granulometria de 80-100 *mesh*



(Fonte: Próprio autor)

2.4.2. Polímeros

2.4.2.1 Policaprolactona (PCL)

A policaprolactona (PCL) é um polímero biodegradável, biocompatível, hidrofóbico, da classe dos poliésteres alifáticos, aprovado para utilização em humanos (COOMBES *et al.*, 2004; SINHA *et al.*, 2004; GENTILE *et al.*, 2014), que tem sido estudado como polímero para sistemas de liberação de fármacos,

pois além de não ser tóxico, possui também alta permeabilidade a vários fármacos. É obtido pela polimerização por abertura do anel da ϵ -caprolactona (ROSA *et al.*, 2002).

A PCL (Figura 02 e 03) é um polímero semicristalino, que possui temperatura de transição vítrea $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e baixo ponto de fusão entre 59 e $64\text{ }^{\circ}\text{C}$, dependendo da natureza dos cristais do PCL. O peso molecular médio das amostras de PCL pode variar de 10000 a 42500, sendo classificado de acordo com o peso molecular. A PCL é solúvel à temperatura ambiente em clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono, benzeno, tolueno, ciclohexano e 2-nitropropano; é pouco solúvel em acetona, 2-butano, acetato de etil, dimetilformamida e acetonitrila; e é insolúvel em água, álcool e éter-dietil (SINHA *et al.*, 2004).

Dentre os polímeros utilizados, a PCL se destaca devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas e por ser um polímero semicristalino, possui degradação mais lenta quando comparado aos polímeros amorfos. Desse modo, é possível aumentar a eficácia de algumas substâncias em função do aumento da concentração das mesmas em sítios específicos e/ou a redução dos efeitos tóxicos em sítios não específicos (DAI *et al.*, 2009).

A PCL é um material mais resiliente que outros polímeros, com características melhores para reparação óssea por manter as propriedades físicas da matriz por pelo menos seis meses (CIAPETTI *et al.*, 2003; Taddei *et al.*, 2005). Shantz, Chim e Whiteman (2007) usaram uma matriz tridimensional de PCL com liberação controlada de fator 1 derivado de células tronco (SDF-1) para engenharia de tecidos. Teoh *et al.* (2007) desenvolveram uma matriz tridimensional de arquitetura única para mediar uma favorável adesão, proliferação e diferenciação celular. A matriz bioativa de PCL-20%TCP foi usada no tratamento de defeitos ósseos de tamanhos críticos na mandíbula de cachorros e os resultados foram melhorados com a adição de PRP (plasma rico em plaquetas) à matriz. A PCL é usada em combinação com outros polímeros para a manipulação da taxa de liberação de fármacos, bem como para melhorar sua resistência, habilidade e adesão (SINHA *et al.*, 2004).

O processo de biodegradação e bioreabsorção do PCL é descrito na literatura como sendo uma sucessão de eventos. Exposto aos fluidos aquosos

do corpo, inicialmente o material sofre hidratação. Com a presença das moléculas de água, o processo de degradação dá-se através da hidrólise das ligações ésteres, originando produtos na forma de oligômeros (monômeros) solúveis e não tóxicos. A degradação prossegue por um processo biologicamente ativo (por enzimas) ou pela clivagem hidrolítica passiva, sendo caracterizada pela perda de massa, diminuição de massa molar ponderal média e pela perda de suas propriedades mecânicas, como a resistência à tração e à compressão (CIAPETTI *et al.*, 2003).

O mecanismo da degradação *in vitro* dos polímeros bioreabsorvíveis tem sido avaliado nos últimos anos e demonstra ser um processo heterogêneo na extensão do material. Dentre os produtos da hidrólise das ligações ésteres, a presença de terminais ácidos catalisa a reação de degradação. É o chamado efeito autocatalítico dos PCL. O processo é homogêneo inicialmente, gerando oligômeros solúveis em água em toda a extensão do material. Os produtos presentes na superfície da matriz são difundidos para o meio, entretanto, a baixa taxa de difusão dos produtos da reação no interior do material gera um acúmulo de ácidos, fazendo com que estruturas densas tenham uma erosão inicial na superfície, mas apresentando uma degradação mais acentuada na parte central (SINHA *et al.*, 2004).

Figura 02 – Representação da estrutura química da cadeia polimérica de PCL

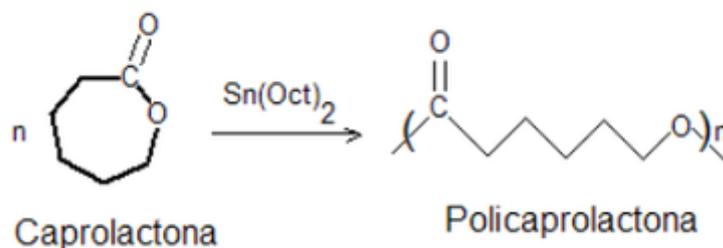
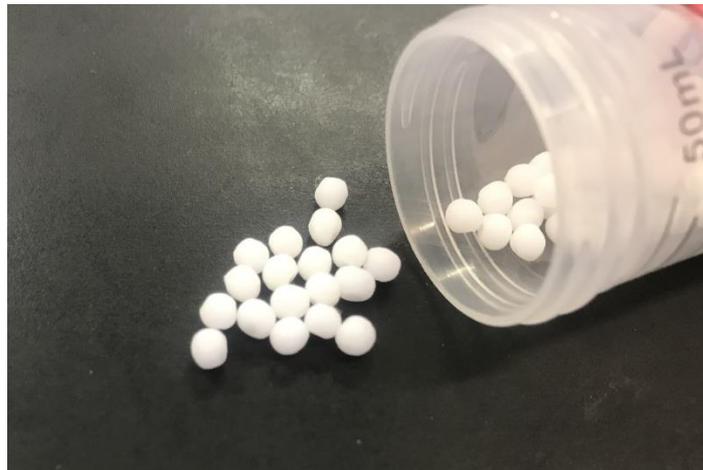


Figura 03 – Apresentação laboratorial, do aspecto macroscópico da Policaprolactona – PCL



(Fonte: Próprio autor)

2.4.2.2 Poli (Ácido lático co glicólico) PLGA

É um co-polímero derivado do ácido lático e glicólico (PLGA), e é sintetizado por uma reação de condensação, através da abertura do anel dos dímeros cíclicos. A polimerização geralmente ocorre por um período de duas a seis horas, sob temperatura em torno de 175°C, utilizando, como catalizador, principalmente, o cloreto estanoso. É considerado um bom material para aplicações biomédicas por sua biocompatibilidade, boa taxa de biodegradação e propriedades de superfície que permitem sua associação e interação biológica com tecidos e outros materiais (GENTILE *et al.*, 2014; LANA O *et al.*, 2013).

Pode-se dizer que quanto maior a proporção de ácido lático no PLGA, maior a hidrofobicidade do copolímero e menor será a velocidade de degradação. A biodegradação desse polímero ocorre por erosão, por meio de clivagem da cadeia polimérica por hidrólise, liberando o ácido lático e glicólico. Estes ácidos, por serem metabólitos naturais do organismo, são incorporados ao ciclo de Krebs e eliminados na forma de gás carbônico e água (JALIL *et al.*, 1990).

Vários fatores contribuem no tempo de degradação dos poliésteres, entre eles o tamanho e a forma do dispositivo, a cristalinidade e a massa molar do polímero (JALIL *et al.*, 1990).

Alguns produtos e processos foram desenvolvidos, com o intuito de se obter sistemas de liberação controlada, objetivando controlar a cinética de liberação do fármaco, mantendo seu nível terapêutico por um período de tempo maior, e também dirigir sua ação a um local específico. Os polímeros biodegradáveis são amplamente empregados como sistemas de liberação controlada de fármacos. Tais características poderiam levar a uma redução de efeitos adversos e tóxicos, além da redução do número de administrações e maior adesão do paciente ao tratamento (LIMA *et al.*, 1999). Alguns estudos mostram, inclusive a eficiência do uso do PLGA (Figura 04 e 05) como fator encapsulador de moléculas para sua disponibilização no tecido ósseo de forma controlada, através do seu tempo de biodegradação (QIAO *et al.*, 2015).

Blendas poliméricas são preparadas com o objetivo de controlar, principalmente, a taxa de degradação dos polímeros. Blendas poliméricas são a mistura de dois ou mais tipos de polímeros onde as propriedades físicas e mecânicas são melhoradas quando comparadas com os polímeros puros isolados. Neste contexto, foi preparada a blenda PLGA:PCL na razão estequiométrica 1:1 p:p para este estudo (CURRAN *et al.*, 2008; LAO *et al.*, 2008; LUCCHESI *et al.*, 2010).

Figura 04 – Representação da estrutura química da cadeia polimérica de Poli (Ácido lático co-glicólico) - PLGA

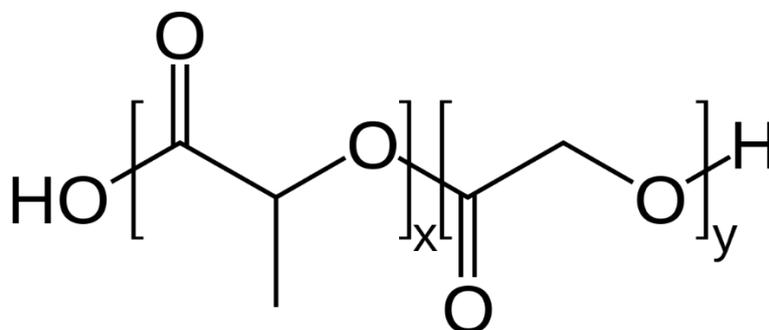


Figura 05 – Apresentação laboratorial do aspecto macroscópico do Poli (Ácido láctico co-glicólico) – PLGA



(Fonte: Próprio autor)

2.4.3. Compósito (Biocerâmica e Polímeros)

Apesar das propriedades de biocompatibilidade e bioatividade de algumas cerâmicas, suas aplicações como matrizes para o crescimento ósseo são limitadas por possuírem baixa tenacidade, ou seja, baixa capacidade de deformação plástica. Uma forma de melhorar as propriedades mecânicas de cerâmicas e vidros é aumentar a tenacidade através da sua combinação com polímeros biodegradáveis, formando um compósito. Agregando as propriedades biológicas das cerâmicas com as propriedades mecânicas dos polímeros, compósitos têm sido desenvolvidos, na busca de uma matriz ideal. Vários trabalhos mostram a bioatividade das matrizes em bases poliméricas e biocerâmicas (CIAPETTI *et al.*, 2003; KIM; KNOWLES; KIM, 2004; PATARO *et al.*, 2007).

A associação entre uma biocerâmica e polímeros biodegradáveis tem sido proposta como opção para ortopedia e recentes estudos realizados com estes biomateriais têm apontado seu enorme potencial para o uso em defeitos ósseos, promovendo a osteogênese ou neoformação óssea, e facilitando sua reposição

(PATARO *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2016). Os compósitos obtidos a partir de biocerâmicas e polímeros melhoraram as propriedades físicas dos dois materiais isoladamente, especialmente pelas características termoplásticas do polímero, diminuindo a fragilidade da cerâmica e permitindo sua utilização na prática clínica (PATARO *et al.*, 2007; SHIM *et al.*, 2013; SHI *et al.*, 2018)

A associação de cerâmicas de fosfato de cálcio com blendas poliméricas tem como finalidade oferecer uma estrutura mineral que disponibilize Cálcio (Ca) e Fósforo (P) para a neoformação óssea, e ainda de neutralizar os subprodutos ácidos da degradação polimérica. A hidroxiapatita (HA) quando presente na estrutura do compósito apresenta características osteocondutoras (CIAPETTI *et al.* 2003).

A associação de fármacos aos polímeros também tem sido proposta com o objetivo de otimizar a resposta biológica das células. Pataro *et al.* (2007), trabalharam com polímeros sintéticos associados com cerâmicas de fosfato de cálcio PLA/BCP e PLGA/BCP numa razão 1:3, incorporando tetraciclina a estes. Um ponto negativo foi a rápida degradação do compósito PLGA/BCP. Trajano *et al.* (2012), na tentativa de superar a rápida degradação do compósito com PLGA, optou por preparar um compósito com PCL/BCP (1:4 p:p) com incorporação de doxiciclina, num composto de inclusão com β -Ciclodextrina, e analisaram a viabilidade e proliferação, produção de fosfatase alcalina e colágeno de osteoblastos. Os autores observaram que as células cultivadas com o compósito PCL/BCP/Dox – β CD apresentaram uma maior viabilidade e proliferação, além de maior produção de fosfatase alcalina e colágeno comparando ao controle de células sem tratamento.

Muitos compósitos de polímero com BCP podem ser usados para conferir diferentes características e controlar suas propriedades como: biocompatibilidade; absorção de água para expor superfícies ou tecidos à liberação de fármacos tais como antibióticos, antiinflamatórios, hormônios e fatores de crescimento de tecidos; porcentagem de degradação e propriedades mecânicas, fazendo destes materiais desejáveis para aplicação médica (REIS *et al.*, 2007). O compósito polimérico e biocerâmico biodegradável atuam como arcabouços microscópicos que para a proliferação das células ósseas, facilitando a migração, adesão e diferenciação de células precursoras (Black, 1991). Kim, Knowles e Kim, (2004) estudaram compósitos formados por PCL em

uma matriz cerâmica de hidroxiapatita e tetraciclina (TC) em diferentes proporções de cerâmica, polímero e fármaco. Eles constataram que a cinética de liberação e as propriedades mecânicas são dependentes da razão entre os constituintes do compósito.

De acordo com estudos mais recentes, como o de Hwang *et al.* (2017) o compósito formado por biocerâmica e polímeros (Figura 06) se mostrou mais eficiente na manutenção tridimensional dos defeitos ósseos em defeitos criados em modelo animal, quando comparados apenas ao uso da biocerâmica, sendo considerado uma boa alternativa no uso para o reparo desse tipo defeito.

Figura 06 – Fotografia do aspecto macroscópico do biomaterial formado por β TCP/PCL/PLGA



(Fonte: Próprio autor).

2.4.4. Doxíciclina (DOX)

Fármaco do grupo das tetraciclina, a doxíciclina (DOX) (Figura 07) é um fármaco de propriedades bacteriostáticas, inibe a síntese proteica bacteriana, possui largo espectro e apresenta-se eficaz contra Gram-positivos e Gram-negativos, cocos, aeróbios e anaeróbios e possui a capacidade de interagir com tecidos dentários (GOLUB *et al.*, 1994).

Demonstrou-se, também, que a DOX aplicada localmente, onde se observa efeitos sistêmicos mínimos, apresentou efeitos benéficos sobre a

osteogênese em cães submetidos à lesão óssea induzida mecanicamente e reduziu a produção de colagenase por osteoblastos e osteoclastos após cirurgia dental. Ratificando outros estudos, demonstrou-se que são capazes de reduzir a perda óssea inflamatória e que esse efeito não está relacionado à sua atividade antimicrobiana, evitando, desta forma, o risco do surgimento de resistência bacteriana e minimizando os efeitos colaterais gastrintestinais geralmente associados com a administração prolongada de DOX. Além disso, a DOX pode inibir a degradação da cartilagem de forma que pode ser útil no tratamento da osteoartrite, forma comum de artrite associada com dor e incapacidade devido à degradação da cartilagem (BEZERRA *et al.*, 2002).

Antibióticos de tetraciclina, incluindo DOX, têm sido utilizados para tratar doenças de reabsorção óssea, em parte por causa de sua atividade para suprimir osteoclastogênese induzida pelo receptor ativador do fator nuclear Kappa B ligante (RANKL). Estudos anteriores relataram que a DOX é capaz de diminuir a perda óssea e aumentar a formação de osso (WILLIAMS *et al.*, 1996).

É fundamentalmente bacteriostática e acredita-se que ela exerça ação antimicrobiana pela inibição da síntese proteica. Age no metabolismo de bactérias impedindo sua nutrição, suscetibilidade adequada ao fármaco, desenvolvimento e reprodução. Sugere-se, ainda, ação na membrana citoplasmática bacteriana. Sua propriedade lipossolúvel facilita-lhe a difusão através da membrana celular dos microrganismos susceptíveis, permitindo que ela se ligue à subunidade 30S do ribossomo, inibindo a formação do complexo t-RNA-aminoacil-RNA-ribossomo e impedindo, conseqüentemente, a translação bacteriana. A DOX é ativa contra uma ampla variedade de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. É indicada em infecções causadas principalmente por microrganismos: *Rickettsia*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Plasmodium falciparum*, *Campylobacter* e outros, muitos destes componentes da classe causadora das doenças periodontais. (TOLEDO *et al.*, 2007).

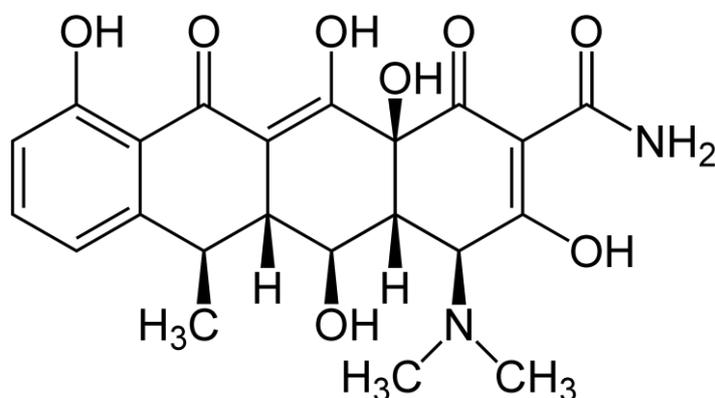
A doxiciclina, isômero estrutural da tetraciclina, vem sendo continuamente estudada, muito pelo seu conhecido efeito antibacteriano, anti-inflamatório, anti-colagênico. Esses efeitos, são comprovados em odontologia, por exemplo para o tratamento de periodontite e, mais recentemente, peri-implantite. Além disso, estudos recentes têm mostrado efetiva atividade osteogênica e anti-

osteoclastogênica, característica esta que a torna favorável para o uso em procedimentos ósseos reconstrutivos (KINUGAWA *et al.*, 2012; UDAGAWA *et al.*, 2013; YAGAN *et al.*, 2014).

Tetraciclinas tem sido investigadas extensivamente por décadas, para sua atividade antibiótica, anti-inflamatória além do seu efeito na inibição de enzimas que degradam o colágeno, responsáveis pela perda de tecido conjuntivo e reabsorção óssea (RAMAMURTHY *et al.*, 1974, PLEWIG *et al.*, 1975, GOLUB *et al.*, 1996). A Doxiciclina (DOX) tem sido usada como possível terapia para regeneração óssea (GOLUB *et al.*, 2008), sendo reportada como tendo efeitos positivos para tal processo de reparo. A Doxiciclina estimula a osteogênese e a apoptose de osteoclastos, além de inibir a reabsorção óssea inflamatória e a osteoclastogênese (BETTANY *et al.*, 2000, BEZERRA *et al.*, 2002). Porém, além de ter o tempo de $\frac{1}{2}$ vida encurtado, se usada localmente de forma isolada é rapidamente metabolizada, exercendo por muito pouco tempo seu efeito no sítio operatório, daí a razão de sua associação com outros materiais para a criação de um sistema de liberação controlada do fármaco.

A Doxiciclina, portanto, é um antibiótico com eficácia clínica documentada para o tratamento de infecções ósseas. Além disso, a DOX tem sido reportada como fator que melhora os processos de regeneração do tecido ósseo. (DASHTI *et al.*, 2010, LEE *et al.*, 2004).

Figura 07 – Representação da estrutura molecular da Doxiciclina (DOX)



2.5. Sistema de Liberação de Fármacos

A tecnologia de liberação controlada de fármacos representa uma das fronteiras da ciência, a qual envolve diferentes aspectos multidisciplinares e pode contribuir muito para o avanço da saúde humana. Sistema de liberação lenta, tardia ou retardada é um sistema onde o fármaco libera-se de forma mediata e com um tempo pré-fixado. Quando um fármaco é aplicado neste tipo de sistema, os níveis sanguíneos se mantêm dentro da faixa terapêutica durante um intervalo de tempo maior, assim é mais eficaz do que as formas convencionais (Figura 08). O nível de efeito descreve um platô ao longo do tempo na dose terapêutica que diminui lentamente. Os implantes representam os SLFs destinados à inserção em tecidos ou órgãos. Entre os anos 60 e 80, foram desenvolvidos os primeiros sistemas implantáveis para liberação de fármacos.

Os sistemas de liberação, frequentemente descritos como “*drug delivery systems*”, oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros de dosagem convencional (LANGER, 1990; MIRTH, 1987):

- 1 - Possibilita o controle e monitoramento dos níveis de fármaco no sítio de aplicação;
- 2 - Meio útil de liberar na cavidade oral um fármaco que não é absorvido no sistema gastrintestinal (por exemplo, clorexidina);
- 3 - Possibilita a obtenção de altas concentrações de fármaco no local a ser tratado até 100 vezes maiores, quando comparadas com os níveis plasmáticos após a administração sistêmica;
- 4 - Pode mascarar o sabor e odor desagradável de determinados fármacos e evitar o aparecimento de manchas nos dentes;
- 5 - Uso de agentes antimicrobianos que não permitem o uso sistêmico;
- 6 - Reduz o risco de resistência bacteriana em outras áreas do corpo;
- 7 - Maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco em concentrações terapêuticas a partir da degradação da matriz;
- 8 - Diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação;

9 - Natureza e composição dos veículos variada e não há predomínio de mecanismos de instabilidade e decomposição do fármaco (bio-inativação prematura);

10 - Administração segura (sem reações inflamatórias locais) e conveniente (menor número de doses);

11 - Direcionamento a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas;

12 - Tanto substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas podem ser incorporadas;

13 - Quando são usadas as matrizes biodegradáveis para a liberação de fármacos, eliminam a necessidade de retirar o dispositivo de liberação;

14 - Maior adesão do paciente ao tratamento.

Desde que cada fármaco possua uma faixa de ação terapêutica acima da qual ela é tóxica e abaixo da qual ela é ineficaz, os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas. Este fato é problemático se a dose efetiva estiver próxima à dose tóxica. Os SLFs têm o objetivo de prolongar e melhorar o controle da administração de fármacos, liberar a quantidade suficiente de fármaco no sítio alvo e manter a concentração do fármaco entre estes dois níveis por um tempo prolongado necessário para ser eficiente e preciso, utilizando-se de uma única dosagem (GHANDEHARI; FARREL, 2011). Para desenvolver diferentes formas de dosagem, materiais carreadores têm sido utilizados visando à proteção do princípio ativo e evitar a decomposição ou dissolução das moléculas de antibióticos e impedir efeitos indesejáveis das formulações.

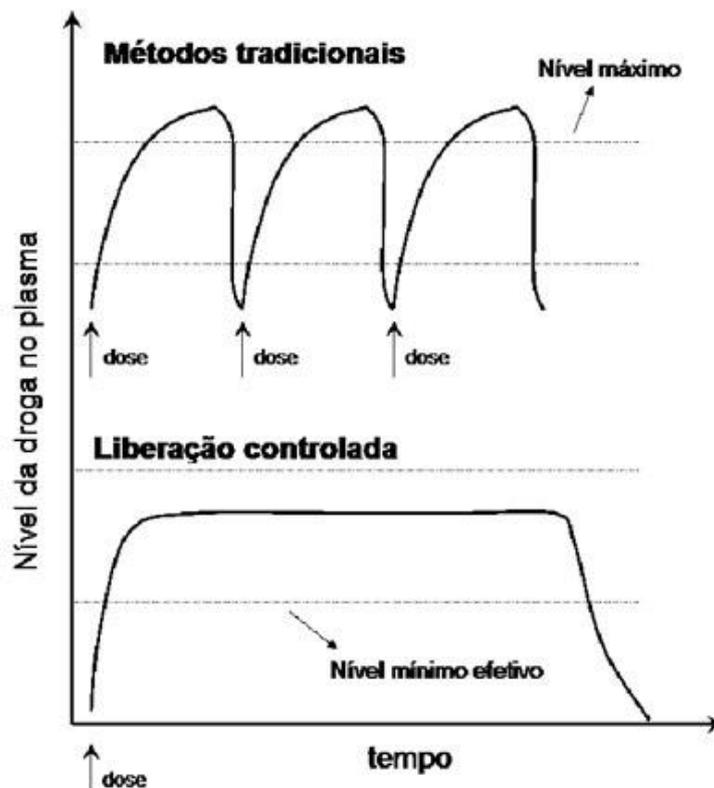
Ao longo da fase de desenvolvimento de produtos nanotecnológicos é indicado empregar o procedimento de liberação *in vitro* para selecionar excipientes para as formulações, proporcionando uma atividade terapêutica adequada. Pode-se considerar que os estudos de liberação proporcionam dados valiosos sobre as particularidades estruturais do veículo e a capacidade deste em liberar os fármacos (SATO *et al.*, 2007).

Assim como a liberação imediata, a liberação sustentada tem sido relatada para descrever o comportamento dos sistemas nanoestruturados. No caso dos produtos de aplicação tópica, ambas as características são interessantes: a liberação imediata pode ser útil para melhorar a penetração de uma substância e a liberação sustentada é importante para substâncias ativas

potencialmente irritantes em concentrações elevadas ou que devam suprir a pele por um período prolongado de tempo. A liberação do fármaco depende da dessorção do fármaco da superfície das partículas, da difusão do ativo através da matriz, da difusão através da parede polimérica, da erosão da matriz polimérica ou da combinação dos processos de difusão e erosão (JENNING, 2000).

É consenso na literatura atual, que ainda hoje a enxertia de osso autógeno continua sendo a melhor solução para a reabilitação de defeitos ósseos, porém com importantes limitações, também consensuais. Alternativamente, de acordo com alguns trabalhos, sistemas de entrega local de drogas, associados a biomateriais osteocondutivos tem sido estudado afim de se tornar importantes opções e/ou alternativas para os enxertos autógenos, corroborando com a proposta do presente estudo (MARTIN E BETTENCOURT, 2018; STRUB et al., 2018). O processo de reparo ósseo e o efeito de fármacos que modulam os fenômenos constituintes desse evento tem sido extensivamente estudado. Estas pesquisas proporcionaram alternativas medicamentosas no favorecimento do processo de reparo ósseo tecidual após a perda dentária. As ações anti-inflamatórias (GRIFFIN et al., 2010), anticolagenolíticas (GU et al., 2010; FARHAD et al., 2013; KUDALKAR et al., 2014) e neoformadora óssea (SHAHABOOEI et al., 2015) já são reconhecidas em DOX.

Figura 08 – Esquema comparativo entre o sistema de administração tradicional de fármacos e o sistema de liberação controlada



2.5.1. Sistema de encapsulamento de drogas

A inclusão molecular é um método para melhorar as propriedades de um fármaco já existente, com o objetivo de diminuir os efeitos colaterais, diminuir a concentração do medicamento e diminuir o número de aplicações de um determinado arsenal terapêutico e, dessa forma, obter maior adesão do paciente (RAJEWSKI; STELLA, 1996). Os principais sistemas transportadores usados para preparar estes sistemas são: as macromoléculas (albumina, anticorpos monoclonais, ciclodextrinas, dextrano, glicoproteínas), as células (eritrócitos, linfócitos) e as vesiculares (liposomas, nanocápsulas, nanoesferas, sistemas de emulsão múltiplos) (LANGER; PEPPAS, 2003).

Particularmente, a ciência e a tecnologia do encapsulamento constituem um dos exemplos de como a aplicação de uma técnica em determinado campo pode ser estendida a outros (FILHO, 2011). A encapsulação é bastante utilizada

nas indústrias alimentícia, têxtil, farmacêutica e cosmética por permitir a proteção de substâncias lábeis e voláteis, o controle da liberação do fármaco, contribuindo para a melhoria na biodisponibilidade e redução da dose terapêutica e toxicidade (RAMBHIA E MA, 2016)

Uma alternativa para mascarar propriedades físico-químicas, melhorar a interação fármaco/membrana e facilitar a absorção é fazer uso de polímeros para encapsulação de fármacos. A adsorção de polímeros aos fármacos é um fenômeno importante, pois pode alterar sua hidrofobicidade, facilitando sua redispersão em água, além de alterar o direcionamento a alvos específicos do organismo. Além disso, as ciclodextrinas podem ser empregadas em SLFs (CORTÉS, 1999).

Alguns estudos já demonstram a efetividade dos sistemas de liberação controlada de drogas, para uso local em tecido ósseo, inclusive com agentes antimicrobianos, evidenciando a importância da manutenção do fármaco em disponibilidade local por mais tempo. São citados como eficazes os sistemas de encapsulamento compostos por biocerâmicas, vidros bioativos e polímeros, além dos compósitos quando da associação destes. Para o carreamento de agentes antimicrobianos, como por exemplo as gentamicinas e as tetraciclina, são citados como mais eficazes agentes encapsuladores as biocerâmicas de cálcio fosfato, os polímeros e a β -ciclodextrina (MOURIÑO E BOCCACINI, 2009; RAMBHIA E MA, 2016).

2.5.2. Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CD's) são oligossacarídeos cíclicos compostos de unidades de dextroses (glicoses) com formato cone truncado. Estruturalmente (Figura 09), as CD's apresentam duas regiões distintas: uma cavidade hidrofóbica e a parte externa hidrofílica devido a presença das hidroxilas livres na parte externa das CD's. Esse arranjo estrutural das moléculas de glicose nas CD's possibilita a utilização desses compostos como hospedeiros na formação de compostos de inclusão. A presença de uma cavidade hidrofóbica e de grupos hidroxilas livres na parte externa da molécula permite a "dissolução" em meio

aquoso de compostos (hóspedes) de baixa solubilidade. Esse aspecto molecular tem possibilitado a utilização de ciclodextrinas em diferentes áreas da ciência e tecnologia, sendo o principal domínio de aplicação a indústria farmacêutica, em função da possibilidade de obtenção de novos fármacos com propriedades físicas e químicas diferentes.

As CD's naturais são: α , β e γ . Têm vinte e um grupos hidroxila e todos esses grupos podem ser considerados pontos iniciais para modificações estruturais, e vários grupos funcionais têm sido introduzidos em sua estrutura. Seus derivados sintéticos, como a hidroxipropil- β -ciclodextrina estão sendo estudados pela sua capacidade de formar compostos de inclusão com moléculas alojadas em sua estrutura (Figura 10) (UEKAMA; HIRAYAMA; IRIE, 1998; YUE *et al.*, 2004). O encapsulamento de uma substância nestas moléculas pode levar à mudança em propriedades da substância em questão: solubilidade, taxa de dissolução, estabilidade e biodisponibilidade (HIRAYAMA *et al.*, 2002).

Tomando por base o diâmetro de sua cavidade, a α -ciclodextrina tem um diâmetro pequeno para que possa incluir a maior parte dos princípios ativos, ao passo que a β -ciclodextrina e, melhor ainda, a gama-ciclodextrina sirvam a este propósito, uma vez que possuem cavidade de maior diâmetro quando comparadas à α -ciclodextrina. Em relação à solubilidade em água, a menos solúvel é a β -ciclodextrina. A gama-ciclodextrina seria a mais interessante para o uso farmacêutico, mas seu alto custo torna difícil sua utilização em escala industrial. (SZEJTLI, 1988; MASSON *et al.*, 1998; LOFTSSON; MASSON, 2001).

As principais vantagens do uso das CD's são: estrutura química bem definida, com locais de modificação ou conjugação química; a disponibilidade das CD's em diferentes tamanhos; são inócuas; possuem atividade farmacológica; aumento da solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade das moléculas hóspedes (fármacos); correção do odor e sabor desagradáveis do fármaco; redução da ação irritante do fármaco sobre as mucosas gástrica e intestinal, de efeitos adversos e de interações medicamentosas; a capacidade de formar compostos de inclusão, isto quer dizer, moléculas que resultam da soma de dois compostos, um dos quais (a molécula hóspede) está situado na cavidade da molécula sem significativamente modificar sua estrutura (RICCI; MARCHETTI, 2006).

As CD's podem formar complexos de inclusão com uma variedade notável de espécies iônicas e moleculares, dentre as quais muitos princípios ativos de importância fundamental na área farmacêutica. Os complexos de CD's por possuírem uma estrutura cristalina protegem a molécula hóspede, prevenindo a degradação natural dos princípios ativos e intensificando os seus efeitos. Estes complexos de inclusão apresentam propriedades novas e/ou melhoramento das já existentes (UEKAMA; HIRAYAMA; IRIE, 1998; SZEJTLI, 1988). Outra característica que as tornam extremamente interessantes é que elas podem formar um SLF e melhorar a liberação do fármaco (BORGMAN, 1986; Cortés, 1999). Ao encapsular temporariamente os princípios ativos, as CD's permitem a “liberação controlada” de seu conteúdo, desta forma contribuindo para a melhora da biodisponibilidade.

Figura 09 – Representação esquemática da molécula de β -Ciclodextrina

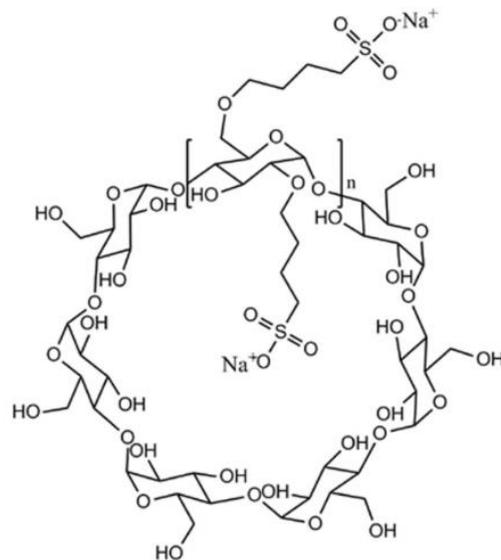
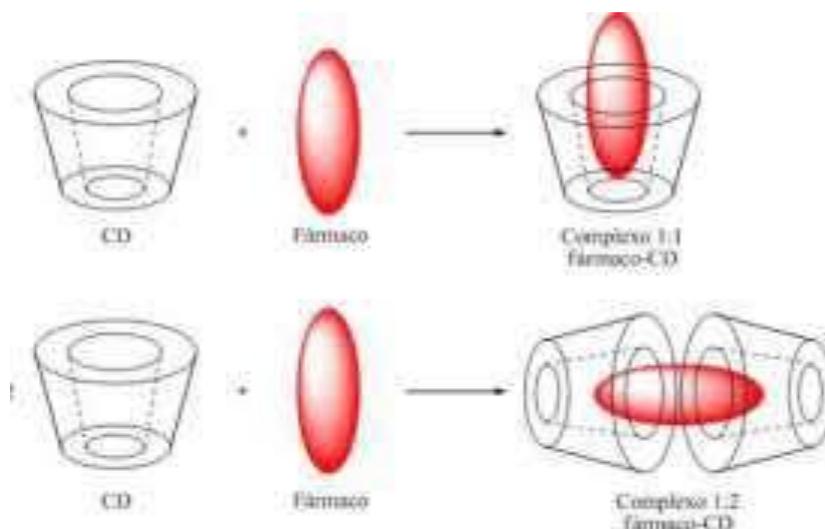


Figura 10 – Esquema de encapsulamento de drogas pelas ciclodextrinas



2.5.3. Polímeros e sistema de liberação de drogas

Cerca de 40% das moléculas farmacologicamente ativas são rejeitadas, devido, principalmente, à reduzida solubilidade e biodisponibilidade. Para contornar tais problemas, polímeros biodegradáveis, capazes de modular a liberação do fármaco, surgiram como alternativas eficazes (QIU; BAE, 2006). Matrizes poliméricas biodegradáveis são, em geral, biocompatíveis e se degradam *in vivo*, passando por processo de hidrólise e se decompondo em metabólitos, que podem ser excretados pelo corpo. Estes produtos de degradação não devem ser tóxicos e não causar resposta inflamatória. Outra característica importante é a degradação ocorrer em um razoável período de tempo, requerido pela aplicação. Se a matriz polimérica não degrada dentro do corpo, ela deve ser cirurgicamente removida, implicando em um alto custo e risco para o paciente. Neste sentido, a síntese de polímeros biodegradáveis contribuiu para a melhoria destes sistemas, visto que eles não requerem remoção cirúrgica e apresentam poucos efeitos colaterais (PEPPES, 1987; HIEP *et al.*, 2017).

Sistemas poliméricos de liberação de fármacos são largamente utilizados e não só permitem uma liberação lenta e gradual do ingrediente ativo, como também podem possibilitar o direcionamento a alvos específicos do organismo,

como sítios de inflamação ou tumor. Os SLFs do tipo polimérico são classificados de acordo com vários mecanismos. Podem ser fundamentados em sistemas matriciais, reservatórios, gastrorretensivos, entre outros. Os sistemas controlados por difusão são os mais comuns (PEPPES, 1987; PEZZINI, 2007).

A cada dia são propostos novos sistemas baseados em polímeros sintéticos ou naturais, em hidrogéis, em polímeros biodegradáveis ou não, em polímeros bioadesivos, entre outros. Exemplos de SLF baseados em polímeros são os adesivos, os implantes, os dispositivos médicos e as formas farmacêuticas sólidas matriciais ou reservatórios. Os polímeros são incorporados em tais formas farmacêuticas visando diferentes funções, como mascarar odor e sabor desagradáveis, proteger o fármaco de condições agressivas do meio ambiente (luz e umidade) e do microambiente fisiológico, auxiliar no processo produtivo e para modular a liberação do fármaco (ALLEN; GENNARO, 2007).

A associação de fármacos aos polímeros também tem sido proposta com o objetivo de otimizar a resposta biológica das células. Pataro *et al.* (2007), trabalharam com polímeros sintéticos associados com cerâmicas de fosfato de cálcio PLA/BCP e PLGA/BCP numa razão 1:3, incorporando tetraciclina a estes. Um ponto negativo foi a rápida degradação do compósito PLGA/BCP. Já Trajano 2012, na tentativa de superar a rápida degradação do compósito com PLGA, optou por preparar um compósito com PCL/BCP (1:4 p:p) com incorporação de doxiciclina e analisou a viabilidade e proliferação, produção de fosfatase alcalina e colágeno de osteoblastos. Os autores observaram que as células cultivadas com o compósito PCL/BCP/Dox apresentaram uma maior viabilidade e proliferação, além de maior produção de fosfatase alcalina e colágeno comparando ao controle de células sem tratamento.

Kim *et al.* (2004), estudaram compósitos formados por policaprolactona em uma matriz cerâmica de hidroxiapatita e tetraciclina em diferentes proporções de cerâmica, polímero e fármaco. Foi constatado que a cinética de liberação, bem como as propriedades mecânicas, são dependentes da razão entre os constituintes do compósito. Recentemente, a policaprolactona ganhou atenção especial por mostrar um excelente potencial para aplicações biomédicas, principalmente por sua facilidade de manipulação e potencial de encapsulamento de drogas (MONDAL, 2016)

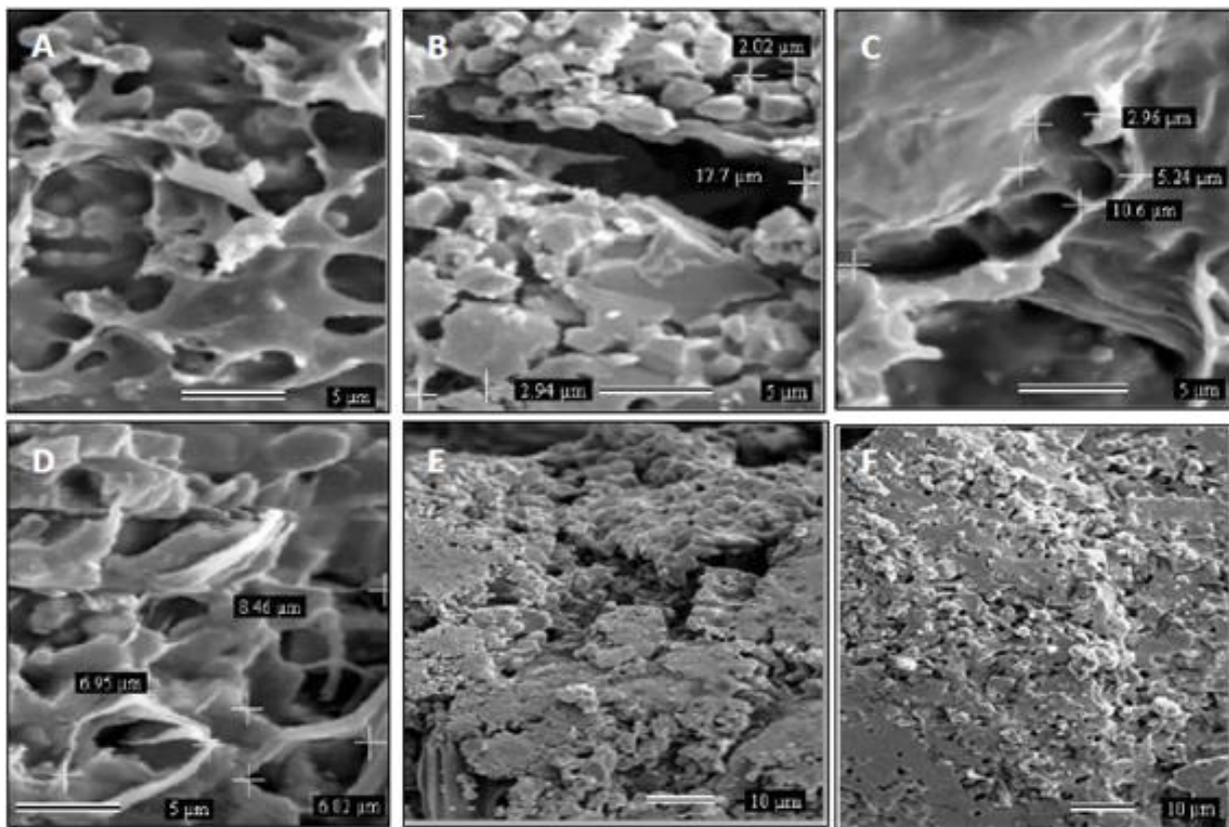
Um compósito de polímeros biodegradáveis com cerâmica de fosfato de cálcio carregado com drogas, além de suportar a reconstrução do tecido ósseo, e ser totalmente reabsorvida e substituída pelo osso neoformado, colabora com a possibilidade de uma superfície coberta com antimicrobianos em reduzir o risco de infecções em áreas cirúrgicas. (GOLLWITZER *et al.* 2003).

2.5.4. Compósito β TCP/PCL/PLGA/DOX/ β CD

O compósito contendo a biocerâmica de Beta Tricálcio Fosfato, a blenda polimérica composta por PCL/PLGA em proporção específica, associada a um composto de inclusão formado por β – Ciclodextrina e Doxíciclina, já foi descrito na literatura por Trajano *et al.* (2012), desde sua síntese detalhada, até sua caracterização físico-química.

Esses mesmos autores caracterizaram a superfície e estrutura do compósito em questão através do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), a qual mostrou interconectividade, da conformação e do tamanho de poros. O compósito apresentou microporos intercomunicantes na faixa de 1 μ m e 10 μ m (Figura 11 C, D), que aumentam o contato tecidual, a solubilidade, absorção de moléculas e a capacidade de trocas com os líquidos orgânicos. Também apresentam intermediários de 10 μ m a 50 μ m (Figura 11 B), que aumentam a adesão dos osteoblastos. Esta estrutura arquitetônica porosa torna esta biocerâmica um veículo condutor e liberador de fármacos e substâncias, sua topografia superficial permite atividade metabólica osteoblástica e expressão dos fenótipos (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos) adequados para as etapas dos fenômenos de neoformação tecidual.

Figura 11 - MEV do compósito β TCP/PCL/PLGA/ β CD/DOX/ β CD. A, B, C, D com aumento de 5x e E, F com aumento de 10x



(Trajano *et al.*, 2012).

O uso conjunto, portanto, de todos esses componentes para a formação do compósito em questão, visa aliar suas propriedades num único material: a capacidade de criação de arcabouço para migração celular e deposição de nova matriz óssea (osteocondução) da biocerâmica e dos polímeros, a criação de um sistema de liberação controlada de fármacos, que visa disponibilizar o princípio ativo localmente por mais tempo, dos polímeros e da ciclodextrina, a capacidade de proteção da degradação rápida da molécula de DOX dada também pela ciclodextrina e, por fim, a capacidade de criação de um ambiente favorável para a osteogênese dada pelas propriedades da Doxícilina.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a regeneração óssea estimulada pelo compósito de polímeros biodegradáveis ácido poli lático co-glicólico (PLGA) e policaprolactona (PCL) e cerâmica de beta tricálcio fosfato (β TCP) e β -ciclodextrina com incorporação de Doxiciclina (DOX), em defeitos alveolares na maxila de ratos.

3.2. Objetivos específicos

- a. Analisar a biocompatibilidade e a neoformação óssea em diferentes tempos operatórios;
- b. Analisar histologicamente a integração do compósito ao osso e se houve neoformação óssea;
- c. Descrever as características do infiltrado inflamatório de acordo com a presença ou não do antimicrobiano (comparação entre grupos);
- d. Analisar histomorfometricamente as reações teciduais ao compósito implantado em defeito ósseo em alvéolos de ratos;
- e. Analisar histoquimicamente (TRAP), o potencial osteoclastogênico do compósito testado;
- f. Analisar a influência da presença da DOX, relacionada ao aumento, ou não, da osteogênese em virtude de sua comprovada atividade na neoformação óssea.

4 METODOLOGIA

4.1. Materiais

Para a realização desse trabalho foi utilizada a biocerâmica Osteosynt® de fosfato de cálcio bifásico 80-100 *mesh* composta de 65% de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e 35% de fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ bifásica, micro porosa, foi gentilmente cedida pela empresa Einco Biomaterial Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil.

O copolímero biodegradável de ácido láctico e ácido glicólico (PLGA) (proporção molar de 50:50) de peso molecular de 60.000 g/mol, viscosidade de 0,39 dL/g em HFIP a 30 ° C, lote D01079 e policaprolactona (PCL) com peso molecular de 10.000 g/mol, viscosidade 1,01 dl/g em CHC13 a 30 ° C, o lote D02042 foi adquirido à Birmingham Polymers, Inc., Pelham, EUA.

A β -Ciclodextrina, de peso molecular 8mg/mol, lote 45H1058 foi adquirida junto a Sigma Chemical Co., St Luis, EUA.

O diclorometano (densidade 1.320-1.328 g/mL a 20° C, Quimex Produtos Químicos, São Paulo, SP, Brasil) foi utilizado como solvente no preparo dos compósitos.

Antibiótico de largo espectro (Doxiciclina -DOX, PA), foi adquirido junto a Araújo Manipulação S/A CNPJ 17.256.512/0094-15, em Belo Horizonte, MG, Brazil. Requisição 045371, registro 1973892.

4.2. Preparo dos compósitos

4.2.1. Preparo do composto de inclusão

Antes da preparação do compósito β TCP/PCL/PLGA/DOX/ β CD, foi preparado o composto de inclusão DOX/ β CD na razão molar 1:1 pelo processo de liofilização de soluções aquosas empregando-se o equipamento *Savant Modulo D-Freeze Dryer* da *Thermo-Electron Corporation*®, tomando como base

os métodos previamente descritos na literatura para inclusão em ciclodextrinas (Cortés *et al.*, 2001). Foram preparadas, inicialmente, soluções aquosas de cloridrato de DOX (PM: 480,99g/mol) deixadas sob agitação constante a 40° C durante meia hora e foram acrescentadas a estas soluções aquosas de β -ciclodextrina (PM: 1135g/mol) na massa indicada. A seguir, as soluções resultantes foram distribuídas em tubos Falcon de 15mL, congeladas em nitrogênio líquido e levadas à sublimação.

4.2.2. Preparo do composto β TCP/PCL/PLGA/DOX/ β CD

O compósito foi preparado utilizando-se PCL e PLGA e a biocerâmica de Beta Tricálcio Fosfato (β TCP) de granulometria 80-100 *Mesh* na razão 1:4, respectivamente. Em 10 ml de diclorometano foram adicionados 0,84 mg de DOX/ β CD. Esta massa de DOX/ β CD foi determinada para que a concentração de 5% de DOX fosse normalizada. Foram adicionados 300mg (50:50) de PCL e PLGA, sob agitação magnética, em béquer fechado, durante 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionadas 1200 mg de β TCP, permanecendo sob agitação a temperatura ambiente. Posteriormente, a fim de moldar a mistura obtida, esta foi colocada em moldes quadrados de silicone medindo 5x5x2mm, permanecendo por 48 horas. As amostras quadradas dos compósitos foram pastilhadas utilizando lâminas para microtomia, tendo as pastilhas espessura de 0,5mm de diâmetro (Figura 12).

Posteriormente as pastilhas obtidas foram esterilizadas utilizando o óxido de etileno (CURAR® - Centro de Esterilização Especializada Ltda., Belo Horizonte - MG).

O compósito β TCP/PCL/PLGA/DOX/ β CD serviu como grupo teste para todos os tempos experimentais, tendo como controles os grupos coágulo sanguíneo, β TCP em fase pura e o composto formado por PCL/PLGA/ β TCP, tendo o mesmo método de síntese acima citado, porém sem a inclusão de DOX.

De acordo com Trajano *et al.*, (2012), o compósito acima citado foi submetido a todos os testes de biocompatibilidade, atividade celular e

citotoxicidade, viabilizando assim, sua utilização para um estudo laboratorial *in vivo*, conforme segue:

- Ensaio de Metabolização – MTT;
- Ensaio da Atividade de Fosfatase Alcalina (BCIP/NBT);
- Ensaio da Produção de Colágeno (Sircol Red);
- Ensaio da produção de nódulos de mineralização por coloração pelo método Von Kossa;

Figura 12 – Apresentação clínica do compósito β TCP/PCL/PLGA/DOX/ β CD



(Fonte: Próprio autor)

4.3. Cálculo amostral

De acordo com a formulação apresentada descrita por Lawaga & Lameshow, 1991 e utilizada para cálculo amostral, em estudo de metodologia similar ao nosso (Kunert-Kell et al, 2014), cada grupo de estudo (para um nível de significância de 95%, poder de teste de 80%, desvio padrão descrito na literatura (12,1) e diferença a ser detectada entre os grupos (12), também de

acordo com a literatura) teria um valor “n” aproximado de 5,7 indivíduos (valor este arredondado para n=6). Segue:

Fórmula de Cálculo:

$Z\alpha$ = nível de significância de 95% (padrão);

$Z\beta$ = poder de teste 80 $n = [(Z\alpha + Z\beta)^2 \cdot s^2] / d^2$

Onde:

% (padrão);

s = desvio padrão da literatura;

d = diferença a ser detectada entre os grupos.

$n = [(1,96 + 0,84)^2 \cdot (12,1)^2] / (12)^2 = 5,7$ (aproximadamente 6,0)

Obs.:

Para cada “Grupo Experimental”, nos utilizamos de 02 tempos distintos, ou seja, 02 grupos separados. Por exemplo:

Grupo Teste:

T (14dias) n=6

T (28 dias) n=6

Total = 12 animais por Grupo experimental, considerando-se 03 grupos distintos, de acordo com os tempos de análise.

Afim de se confirmar a metodologia, consultou-se o estudo de Guimarães, 2017. Este estudo utilizou metodologia semelhante, e os mesmos parâmetros estatísticos. Porém, para o cálculo amostral aplicou-se a plataforma de cálculo do número amostral do Laboratório de Estatística e Epidemiologia do Instituto Dante Pazanezzi (disponível em www.lee.dante.br) as informações acima, obteve-se que para o nível de significância adotado e o poder de teste estimado em 85% o tamanho da amostra, pro grupo, seria de n=7.

Optou-se por empregar, neste estudo, o poder de teste de 80% para reduzir o número de animais que seriam utilizados, seguindo o princípio dos 3Rs (reduce, replacement, refinement).

Obteve-se, portanto, um n final de 44 animais, sendo 4 grupos experimentais, com dois tempos distintos de análise para cada grupo, estando o Grupo 01 – Coágulo, preenchido com 04 animais em cada tempo experimental.

4.4. Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG) com o número de protocolo 223/2018. Foram seguidas as normas ISO 10993-6.

4.5. Procedimento cirúrgico experimental (LANZA, 2018; GOMES, 2019)

Foram utilizados 44 ratos Wistar (*Rattus Novergicus*) com três meses de idade, pesando de 200 a 300g, provenientes do Biotério Central da UFMG (Aprovação pelo CEUA/UFMG, sob o protocolo 223/2018, validado até 19/08/2023). As condições de manutenção foram realizadas de acordo com os padrões de alimentação e temperatura *ad libitum* entre 23 e 25 ° C e ciclo claro / escuro de 12/12 horas.

Os animais foram divididos em três grupos experimentais:

- Grupo 01: Coágulo Sanguíneo;
- Grupo 02: β TCP, em fase pura;
- Grupo 03: β TCP/PCL/PLGA;
- Grupo 04: β TCP/PCL/PLGA/DOX/ β CD.

E subdivididos em 02 tempos experimentais distintos, sendo T(1) 14 dias e T(2) 28 dias.

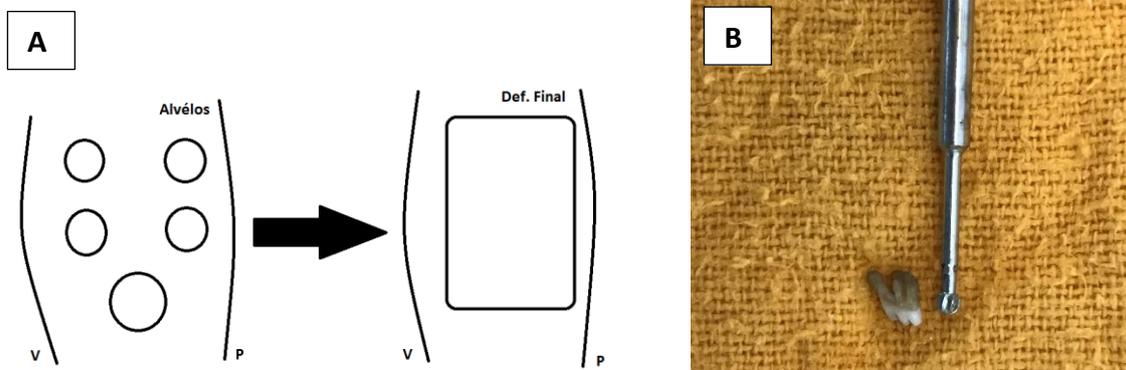
	T1 (14 dias)	T2 (28 dias)
Grupo 01 – Coágulo	(n) 4	(n) 4
Grupo 02 – βTCP	(n) 6	(n) 6
Grupo 03 - βTCP/PCL/PLGA	(n) 6	(n) 6
Grupo 04 - βTCP/PCL/PLGA/DOX/βCD	(n) 6	(n) 6

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia geral com injeção intraperitoneal de cetamina e xilazina. Foi administrado uma solução anestésica na proporção 2:1 (cloridrato de xilazina 2% (Xilazin - Syntec) e cloridrato de cetamina 10% (Cetamin - Syntec)), sendo o volume de 0,135 ml por 100 g de peso corporal.

A técnica cirúrgica consistiu em uma incisão sulcular no primeiro molar esquerdo, luxação e remoção do dente em questão. Após a extração do elemento dentário foi utilizado uma broca diamantada esférica de 2mm para remoção dos septos ósseos alveolares, sob irrigação com solução salina esterilizada para resfriamento, afim de padronizar os defeitos ósseos entre os animais (Figura 13):

- Lateralmente o defeito foi limitado pelas corticais ósseas vestibular e palatina;
- Distalmente o defeito foi limitado pela cortical óssea distal dos alvéolos distais;
- Mesialmente o defeito foi limitado pela cortical óssea mesial do alvéolo mesial;
- Em profundidade o defeito foi limitado por uma marcação na broca, feita de acordo com a média do tamanho radicular dos primeiros molares de ratos.

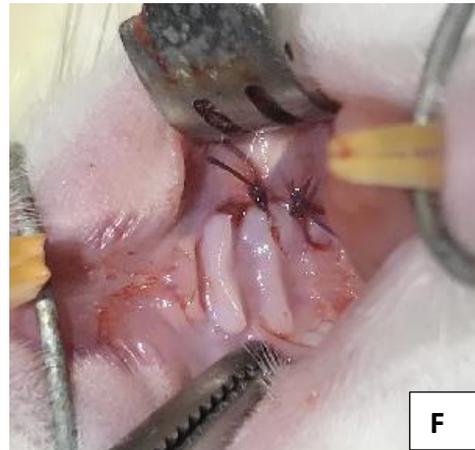
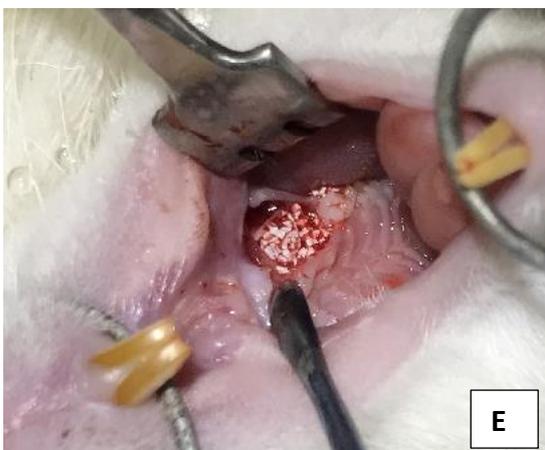
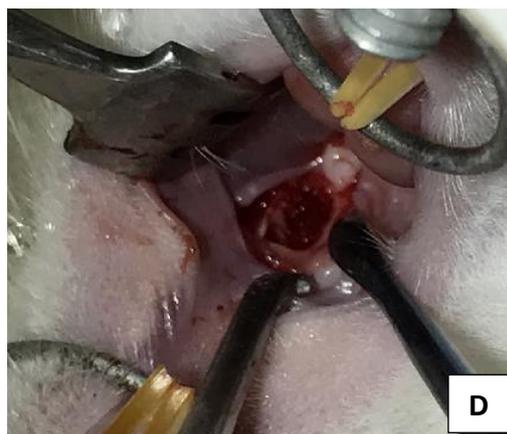
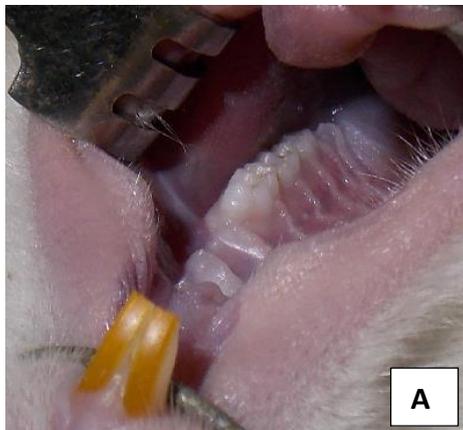
Figura 13 – Desenho esquemático da confecção do defeito alveolar, partindo dos cinco alvéolos remanescentes pós exodontia (A). Marcação na broca utilizada para confecção do defeito, evidenciando a profundidade de penetração de acordo com a média de comprimento da raiz do primeiro molar superior (B)



(Fonte: Próprio autor)

O compósito foi implantado de acordo com os grupos correspondentes e realizada a sutura com fio reabsorvível Vycril™ 6.0 por meio de pontos isolados (Figura 14). Os animais foram eutanasiados aos 14 (T1) e 28 dias (T2) após a cirurgia.

Figura 14 – Sequência cirúrgica: afastamento tecidual e exposição do campo operatório (A), demonstração da posição de luxação do primeiro molar superior esquerdo (B), incisão e descolamento dos tecidos (C), defeito ósseo já preparado (D), preenchimento com biomaterial (E) e sutura (F)



(Fonte: Próprio autor)

Para eutanásia, todos os animais foram anestesiados com as mesmas técnicas relatadas acima, sendo que a sobre dosagem do anestésico induziu a morte dos animais por parada cardiorrespiratória. A maxila foi, então, removida e fixada em solução de formaldeído a 10%, por 48 horas à temperatura ambiente.

4.6. Testes de biocompatibilidade

4.6.1. Análise histológica - qualitativa:

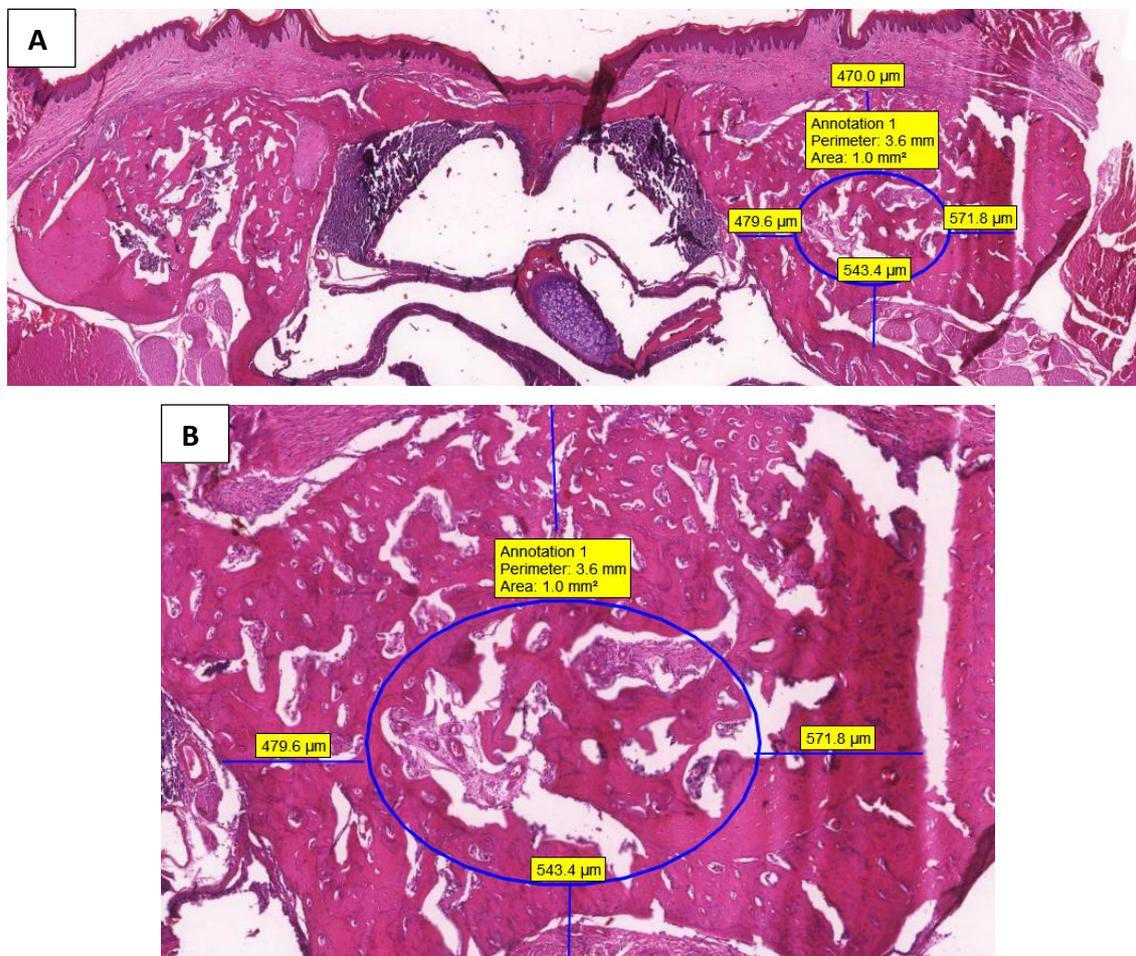
Para processamento histológico, após a fixação em formaldeído a 10% as peças foram desmineralizadas em solução de EDTA a 10%, pH 7,3. Estas foram avaliadas semanalmente até apresentarem consistência macia, indicando correta desmineralização óssea. Em seguida, com auxílio de uma lâmina de bisturi, os tecidos ao redor da área operada foram removidos cuidadosamente para preservar o alvéolo dental. As peças foram desidratadas gradativamente em soluções de concentração crescente de etanol, diafanizadas em xilol e embebidas em parafina (Histosec® pastilhas, Merck). Foram obtidas 3 lâminas para a coloração com H.E. e 1 lâmina para coloração com tricrômio de Masson de cada animal com cortes seriados de 4 µm de espessura, em micrótomo, e estes foram corados com hematoxilina-eosina e Tricrômio de Masson (LEHMAN et al., 2019). Foi realizada análise histológica descritiva dos cortes histológicos dos defeitos ósseos, por um patologista experiente, não sendo informado a ele de qual grupo se tratava, e analisados quanto a integração com tecidos adjacentes, e a neoformação óssea. As análises foram realizadas em microscópio óptico (Olympus BX51) com objetivas planocromáticas, sendo que as lâminas selecionadas foram escaneadas e digitalizadas para posterior análise digital (CAPI/ICB-UFMG, Microscopia digital 3DHitech Ltd. TM - Budapest, Hungary).

4.6.2. Análise histomorfométrica - quantitativa (LANZA, 2018; ALKAN, 2002):

Para análise histomorfométrica as lâminas histológicas foram avaliadas utilizando o aparelho 3D Histech™ - Budapest, Hungary – Scanner de lâminas. Imagens representativas de uma área delimitada pelo software de 200.000 μm^2 foi selecionada tendo como referência o centro do alvéolo cirúrgico, desprezando as interfaces ósseas com o osso apical, palatino e vestibular dos cortes histológicos (Figura 15). O software usado para visualizar as imagens foi o *CaseViewer* (3D Histech™ Budapest, Hungary).

Foi realizado o delineamento da região a ser analisada com posterior quantificação das áreas correspondentes ao tecido ósseo neoformado, dentro da marcação pré-estabelecida, ambas em μm^2 .

Figura 15 – Esquema de histomorfometria de acordo com o Software selecionado: determinação da área a ser analisada ao centro do defeito (A) e destaque para as medidas executadas pela técnica (B)



(Fonte: Próprio autor)

4.6.3. Análise histológica das amostras submetidas a imunoperoxidase (número de células marcadas para TRAP)

Os cortes teciduais submetidos à marcação (cor marrom) realizada pela técnica de TRAP para células osteoclásticas, foram avaliados quanto ao número de células marcadas. Para análise qualitativa forma levados em consideração o tipo celular marcado positivamente pela proteína analisada. As secções histológicas foram analisadas sob iluminação de campo claro em microscópio

óptico (Olympus BX-BX61, Tóquio, Japão) por um investigador que desconhecia os grupos experimentais analisados. Para a realização de análise semi-quantitativa foi realizada a contagem do número de células reativas para os anticorpos TRAP, para cada grupo e período estudado. Foram consideradas células TRAP positivas osteoclastos maduros contendo três ou mais núcleos. A marcação foi definida como aquela de coloração acastanhada presente no compartimento citossólicos das células alvo (osteoclastos). Para contagem do número de células imunomarcadas foi padronizada magnificação de 10X, com auxílio de microscopia de campo claro, como bem recomendado e esclarecido pela literatura. Três cortes histológicos de cada grupo foram avaliados individualmente em um campo de observação condizente com o centro do defeito ósseo estudado. Em cada campo foi considerado o número de osteoclastos marcados. Cada espécime foi mensurado por um examinador calibrado em sistema duplo cego, usando método semi-quantitativo, a partir de imagens capturadas no microscópio óptico.

4.7. Análise estatística dos dados

Os dados coletados foram analisados pelo software R (R Core Team, 2016). Foram realizadas análises de estatísticas descritivas. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk. Para verificar se houve diferença da neoformação óssea entre os grupos, os resultados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), no modelo fatorial (4x2), sendo este utilizado para comparar as médias dos tratamentos. Foi adotado o nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

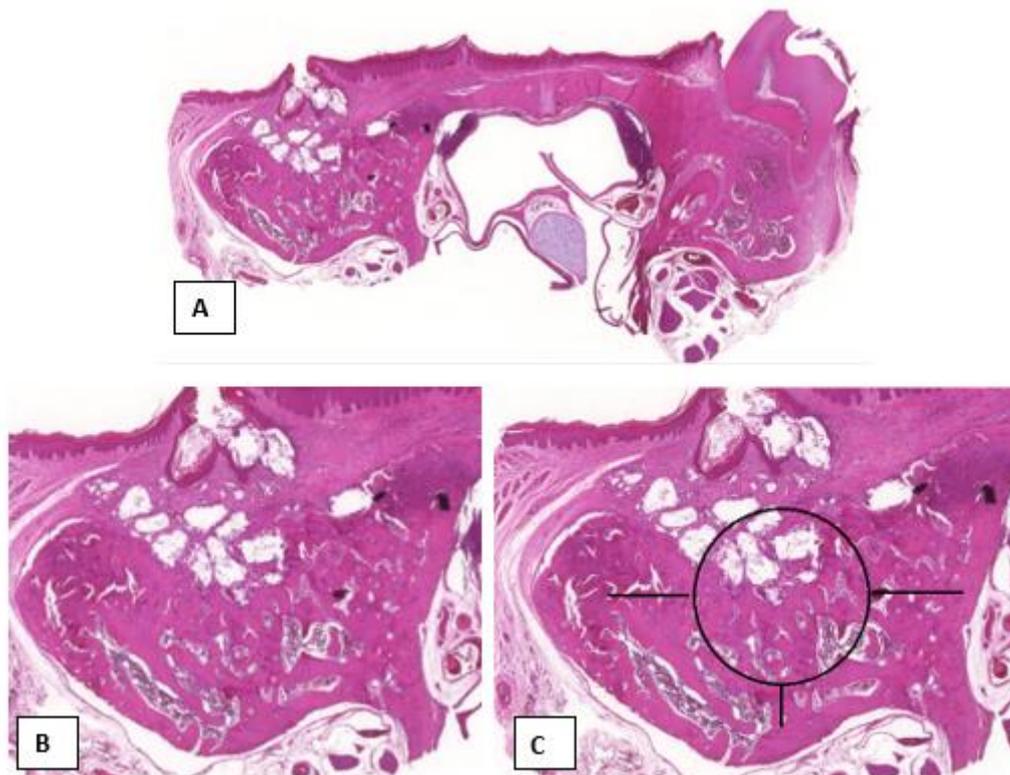
5.1. Análises histológicas

A análise qualitativa dos cortes histológicos, após coloração por HE, foi realizada separadamente para cada grupo, sendo suas características descritas de forma individual, como segue, considerando desde as características do fechamento da ferida operatória até o infiltrado inflamatório presente.

Para a análise microscópica descritiva (qualitativa), foram selecionados 3 cortes de cada animal, em cada grupo experimental. Os eventos histológicos foram descritos em toda extensão do defeito ósseo criado, sendo que a região central do defeito foi a eleita para caracterização do tecido ósseo neo-formado, sendo o objetivo principal a avaliação e investigação dos eventos morfológicos que ocorreram no interior do defeito ósseo criado (Figura 16). Considerou-se como critério de avaliação a presença de tecido conjuntivo com presença de camada de osteoblastos delimitando o trabeculado ósseo, com vasos sanguíneos, presença de processo inflamatório e formação e organização do tecido conjuntivo ósseo e medular.

Os cortes corados, tanto em H.E., quanto para o Tricrômio de Masson (TM), foram analisados por um único avaliador calibrado e cego ao tratamento realizado através das lâminas escaneadas pelo processo já descrito. Foram consideradas características do processo de reparo ósseo, revascularização e presença/característica do infiltrado inflamatório na região de interesse.

Figura 16 – Representação esquemática, do menor para o maior aumento (A, B e C), da área eleita para análise (C) histológica em cada grupo experimental



(Fonte: Próprio autor).

5.1.1. Coloração por hematoxilina- eosina [HE]

Em todos os cortes se observa a presença de epitélio de revestimento estratificado pavimentoso hiper-ortoqueratinizado (não se nota a presença de núcleos na camada de queratina, diferente do encontrado no epitélio paraqueratinizado), com camada granulosa proeminente. Presença de lâmina própria de tecido conjuntivo espesso, celularizado, abaixo do epitélio (nutrição da camada epitelial). Observou-se neoformação óssea alveolar em diversos graus de formação, sendo que em determinados grupos não houve degradação completa do biomaterial.

A seguir, a descrição particular para cada grupo/tempo operatório:

5.1.1.1. Grupo 01 - Coágulo – 14 dias

É possível observar o epitélio, com as características citadas, completamente regenerado.

Observa-se lâmina própria, de tecido conjuntivo bem desenvolvido extenso e celularizado, seguida da região de reparo ósseo.

A análise do defeito ósseo pós exodontia, no tempo pós-operatório de 14 dias (T1), evidenciou a presença do trabeculado ósseo neo-formado em continuidade com as corticais alveolares previamente existentes, exibindo em sua periferia acentuado número de células osteoblásticas. Quando da análise do trabeculado ósseo presente, observamos áreas com diferentes características. Na porção cervical do defeito (imediatamente abaixo da lâmina própria), notamos a presença de ossificação discreta, com tecido ósseo pouco diferenciado, caracterizado pela presença de trabéculas ósseas esparsas e imaturas, porém com intensa atividade osteoblástica em suas bordas. Foi notada ainda, nessa porção superior do defeito, a presença de importante quantidade de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea refazendo a anatomia alveolar.

As trabéculas ósseas no centro do defeito aparecem espessas e bem definidas, com osteoblastos em toda sua periferia além de se caracterizarem como osso vital, com osteócitos preenchendo os espaços intra-trabeculares. Os espaços inter-trabeculares estão preenchidos por tecido conjuntivo celularizado e bem vascularizado (podemos notar grande quantidade de vasos, sendo alguns deles bem dilatados), com a presença de infiltrado inflamatório leve, de predominância mononuclear (células de núcleo bem corado, arredondado e com proporção núcleo/citoplasma diminuída), característico de linfócitos, além da presença de células fagocitárias (macrófagos).

É possível observar a presença de algumas células gigantes, de amplo citoplasma, multinucleadas, sugestiva de osteoclastos, na imagem com maior aumento (Figura 17).

5.1.1.2. Grupo 01 - Coágulo – 28 dias

É possível observar o epitélio, com as características citadas, completamente regenerado.

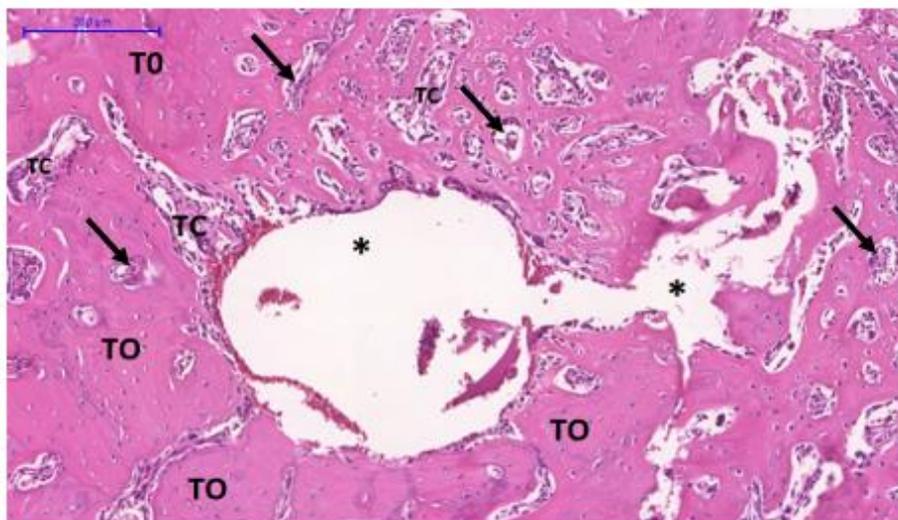
Observa-se lâmina própria de tecido conjuntivo bem desenvolvido extenso e celularizado, seguida da região de reparo ósseo.

A análise da região do defeito ósseo criado pós exodontia do primeiro molar superior esquerdo, no tempo operatório de 28 dias (T2), evidenciou a presença de trabeculado ósseo neoformado, em continuidade com as corticais alveolares previamente existentes, sendo a sua periferia repleta de células osteoblásticas viáveis. Quando da análise deste trabeculado, analisando as diferentes áreas do defeito, observamos que em contraste com T1, para o mesmo grupo, a região cervical do defeito já se apresenta com trabeculado mais denso, com tecido ósseo bem diferenciado, sendo menores as áreas de trabeculado discreto entremeado por tecido conjuntivo denso e celularizado.

O trabeculado ósseo na região central do defeito analisado apresenta trabeculado ósseo vital (trabéculas bem definidas e espessas, com osteoblastos em sua periferia e osteócitos preenchendo os espaços intra-trabeculares), com aparente maior volume quando comparado ao mesmo grupo com 14 dias (T1), sendo o número e a dilatação dos vasos também menor, quando comparado a T1. Os espaços inter-trabeculares estão preenchidos por tecido conjuntivo celularizado vascularizado, com a presença de infiltrado inflamatório leve de predominância mononuclear (células de núcleo bem corado, arredondado e com proporção núcleo/citoplasma diminuída), característico de linfócitos, além da presença de células fagocitárias (macrófagos).

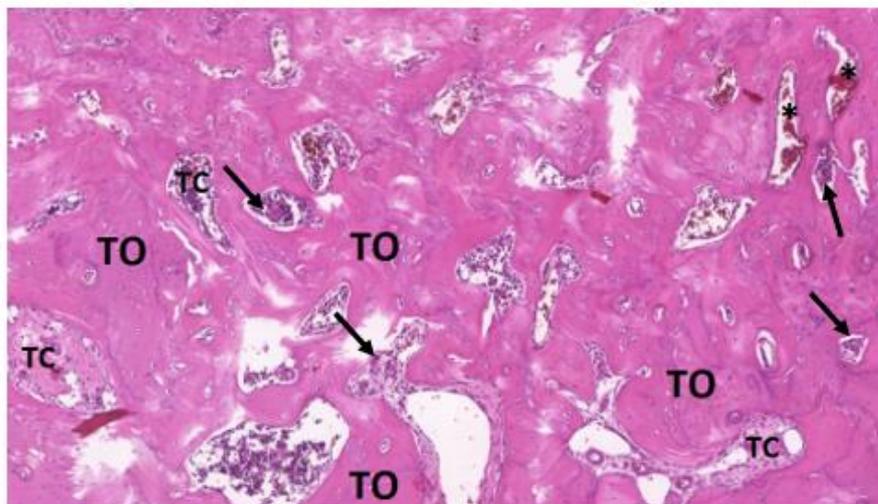
É possível observar a presença de algumas células gigantes, de amplo citoplasma, multinucleadas, sugestiva de osteoclastos, na imagem com maior aumento (Figura 18).

Figura 17 – Grupo 01 (Coágulo) aos 14 dias, corado em HE, no aumento de 10X e numa escala de 200 μm . Visão panorâmica da região do centro do defeito ósseo, mostrando trabéculas ósseas neoformadas, recobertas por osteoblastos ativos, contendo osteócitos em seu interior e rodeadas por tecido conjuntivo. Em destaque as células sugestivas de osteoclastos (seta), trabéculas ósseas (TO), tecido conjuntivo (TC) e vasos sanguíneos (*)



(Fonte: Próprio autor).

Figura 18 – Grupo 01 (Coágulo) aos 28 dias, corado em HE, no aumento de 10X e numa escala de 200 µm. Visão panorâmica da região do centro do defeito ósseo, mostrando trabéculas ósseas neoformadas, recobertas por osteoblastos ativos, contendo osteócitos em seu interior e rodeadas por tecido conjuntivo. Em destaque as células sugestivas de osteoclastos (seta), trabéculas ósseas (TO), tecido conjuntivo (TC) e vasos sanguíneos (*)



(Fonte: Próprio autor).

5.1.1.3. Grupo 02 - Biocerâmica – 14 dias

É possível observar o epitélio com as características citadas, totalmente regenerado.

Notam-se muitos espaços relativos a presença remanescente do biomaterial ainda não degradado, na lâmina própria, que se apresenta espessada, de tecido conjuntivo bem desenvolvido, extenso e celularizado, e com intenso infiltrado inflamatório de predominância mononuclear (linfócitos e macrófagos).

A análise do defeito ósseo, para o Grupo Biocerâmica, no tempo operatório de 14 dias (T1), evidenciou pequena presença de trabeculado ósseo neoformado em continuidade com as corticais ósseas previamente presentes e rodeando os espaços ocupados pelo biomaterial. Observamos, mais à região

cervical do defeito um trabeculado discreto, neoformado e pouco diferenciado, com trabéculas ósseas esparsas e imaturas, mas com intensa atividade osteoblástica em suas bordas. Na porção superior do defeito ainda é possível notar a presença de importante quantidade de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea, refazendo a anatomia alveolar. Quando da observação da região central e apical do defeito, continuamos com a presença de discreta neoformação óssea, porém agora de trabéculas mais espessas e definidas, com osteoblastos em sua periferia e osteócitos preenchendo os espaços intra-trabeculares.

Os espaços inter-trabeculares estão preenchidos por tecido conjuntivo celularizado e bem vascularizado (podemos notar boa quantidade de vasos), com a presença de infiltrado inflamatório leve, de predominância mononuclear (células de núcleo bem corado, arredondado e com proporção núcleo/citoplasma diminuída), característico de linfócitos, além da presença de células fagocitárias (macrófagos).

A análise da periferia dos espaços deixados pela presença do biomaterial, ainda não degradado, revelou a presença de células em íntimo contato com as partículas desse composto, e sem a presença de reação de corpo estranho e/ou presença de infiltrado inflamatório fora do padrão moderado do defeito, sinalizando a biocompatibilidade do mesmo (Figura 19).

É possível observar a presença de algumas células gigantes, de amplo citoplasma, multinucleadas, sugestiva de osteoclastos na imagem com maior aumento.

5.1.1.4. Grupo 02 - Biocerâmica – 28 dias

É possível observar o epitélio com as características citadas, completamente regenerado.

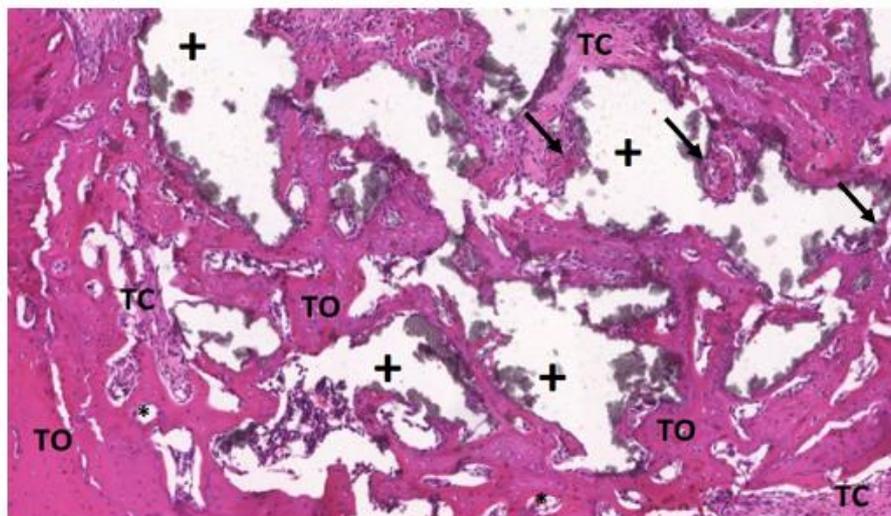
Observa-se a presença de relativo pouco espaço preenchido pelo biomaterial, quando comparado ao tempo de 14 dias (T1), logo abaixo da lâmina própria, que se apresenta com tecido conjuntivo bem desenvolvido, extenso e celularizado, seguida da região de reparo ósseo.

Quando da análise da região do defeito ósseo, observamos tanto na região cervical, quando mais ao centro, a presença de trabéculas ósseas maduras, espessas e bem definidas, com osteoblastos em toda sua periferia e osteócitos preenchendo os espaços intra-trabeculares. Os espaços inter-trabeculares estão preenchidos por tecido conjuntivo celularizado e vascularizado, com presença de infiltrado inflamatório leve, de predominância mononuclear (células de núcleo bem corado, arredondado e com proporção núcleo/citoplasma diminuída), característico de linfócitos, além da presença de células fagocitárias (macrófagos).

A análise da periferia dos espaços deixados pela presença do biomaterial, ainda não degradado, revelou a presença de células em íntimo contato com as partículas desse composto, e sem a presença de reação de corpo estranho e/ou presença de infiltrado inflamatório fora do padrão moderado do defeito, sinalizando a biocompatibilidade do mesmo, seguindo o mesmo padrão descritivo para o mesmo grupo, com 14 dias (T1) (Figura 20).

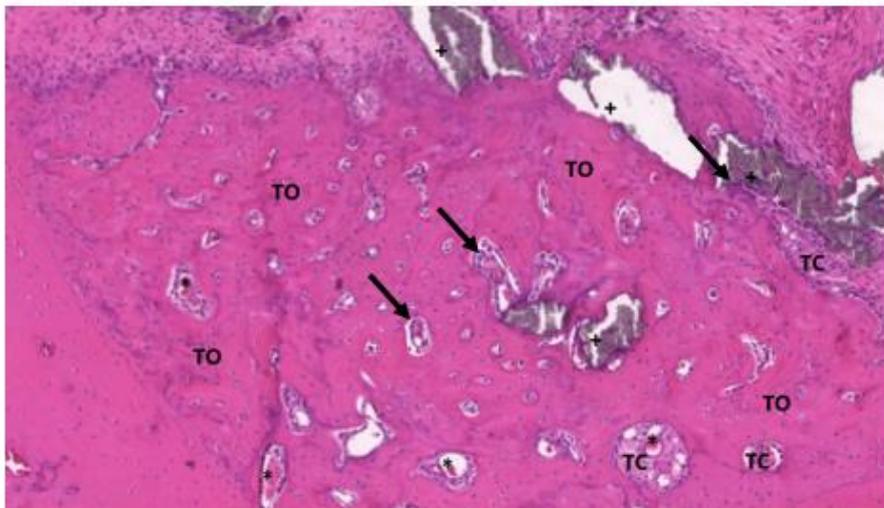
É possível observar a presença de algumas células gigantes, de amplo citoplasma, multinucleadas, sugestiva de osteoclastos, na imagem com maior aumento.

Figura 19 – Grupo 02 (Biocerâmica - β TCP) aos 14 dias, corado em HE, no aumento de 10X e numa escala de 200 μ m. Visão panorâmica da região do centro do defeito ósseo, mostrando trabéculas ósseas neoformadas, recobertas por osteoblastos ativos, contendo osteócitos em seu interior e rodeadas por tecido conjuntivo. Em destaque as células sugestivas de osteoclastos (seta), trabéculas ósseas (TO), tecido conjuntivo (TC), vasos sanguíneos (*) e espaços do biomaterial (+)



(Fonte: Próprio autor).

Figura 20 – Grupo 02 (Biocerâmica - β TCP) aos 28 dias, corado em HE, no aumento de 10X e numa escala de 200 μ m. Visão panorâmica da região do centro do defeito ósseo, mostrando trabéculas ósseas neoformadas, recobertas por osteoblastos ativos, contendo osteócitos em seu interior e rodeadas por tecido conjuntivo. Em destaque as células sugestivas de osteoclastos (seta), trabéculas ósseas (TO), tecido conjuntivo (TC), vasos sanguíneos (*) e espaços do biomaterial (+)



(Fonte: Próprio autor).

5.1.1.5. Grupo 03 - Biocerâmica + Polímeros – 14 dias

É possível observar o epitélio parcialmente regenerado com discreta área de descontinuidade, adjacente a área do biomaterial, provavelmente por interposição deste.

Logo abaixo, observa-se a lâmina própria, de tecido conjuntivo bem desenvolvido, extenso e celularizado, seguida da região de reparo ósseo.

A análise histológica da região do defeito ósseo pós-operatório, no tempo de 14 dias (T1), evidenciou presença do trabeculado ósseo neo-formado em continuidade com as corticais alveolares previamente existentes, exibindo em sua periferia acentuado número de células osteoblásticas. Quando da análise do trabeculado ósseo presente, observamos áreas com diferentes características. Na porção cervical do defeito (imediatamente abaixo da lâmina própria), notamos

a presença de ossificação discreta, com tecido ósseo pouco diferenciado, caracterizado pela presença de trabéculas ósseas esparsas e imaturas, porém com intensa atividade osteoblástica em suas bordas. Nessa região, ainda, observamos a presença de espaços característicos do biomaterial remanescente (não degradado).

A análise da periferia dos espaços deixados pela presença do biomaterial, revelou a presença de células em íntimo contato com as partículas desse composto, e sem a presença de reação de corpo estranho e/ou presença de infiltrado inflamatório fora do padrão moderado do defeito, sinalizando a biocompatibilidade do mesmo. Foi notada ainda, nessa porção superior do defeito, a presença de importante quantidade de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea refazendo a anatomia alveolar. As trabéculas ósseas no centro do defeito aparecem espessas e bem definidas, com osteoblastos em toda sua periferia além de se caracterizarem como osso vital, com osteócitos preenchendo os espaços intra-trabeculares. Os espaços inter-trabeculares estão preenchidos por tecido conjuntivo celularizado e vascularizado, com a presença de infiltrado inflamatório leve, de predominância mononuclear (células de núcleo bem corado, arredondado e com proporção núcleo/citoplasma diminuída), característico de linfócitos, além da presença de células fagocitárias (macrófagos) (Figura 21).

É possível observar a presença de algumas células gigantes, de amplo citoplasma, multinucleadas, sugestiva de osteoclastos, na imagem com maior aumento.

5.1.1.6. Grupo 03 - Biocerâmica + Polímeros – 28 dias

É possível observar o epitélio parcialmente regenerado, com discreta área de descontinuidade, seguida da área do biomaterial remanescente, ainda não degradado, provavelmente por interposição deste.

Observa-se lâmina própria, de tecido conjuntivo bem desenvolvido extenso e celularizado, seguida da região de reparo ósseo.

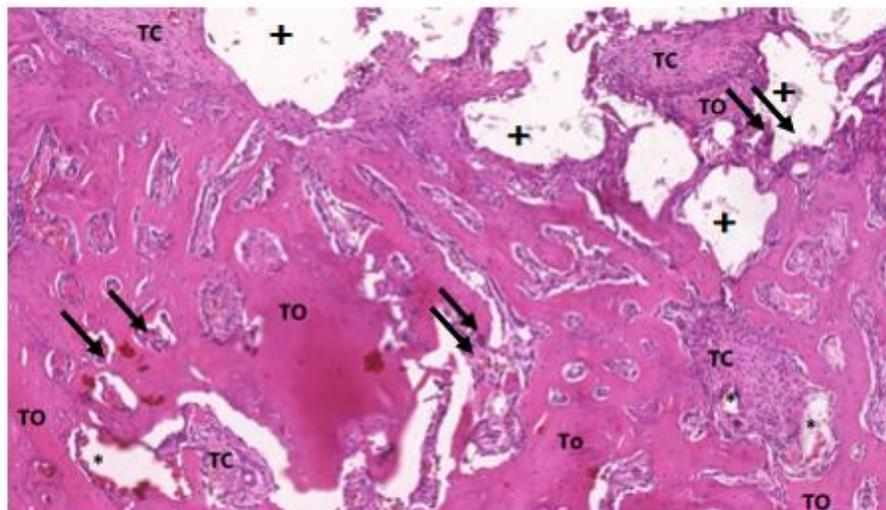
A análise do defeito ósseo pós exodontia, no tempo pós-operatório de 28 dias (T2) evidenciou a presença do trabeculado ósseo neo-formado em

continuidade com as corticais alveolares previamente existentes, exibindo em sua periferia acentuado número de células osteoblásticas. Quando da análise do trabeculado ósseo presente, observamos uma menor área, porém ainda existente, na porção cervical do defeito (logo abaixo da lâmina própria e dos espaços remanescentes do biomaterial) a presença de ossificação discreta, com tecido ósseo pouco diferenciado, caracterizado pela presença de trabéculas ósseas esparsas e imaturas, porém com intensa atividade osteoblástica em suas bordas. Foi notada ainda, nessa porção superior do defeito, a presença de importante quantidade de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea refazendo a anatomia alveolar. Já em maior área, observamos as trabéculas ósseas no centro do defeito aparecem espessas e bem definidas, com osteoblastos em toda sua periferia além de se caracterizarem como osso vital, com osteócitos preenchendo os espaços intra-trabeculares. Os espaços inter-trabeculares estão preenchidos por tecido conjuntivo celularizado e vascularizado com a presença de infiltrado inflamatório leve, de predominância mononuclear (células de núcleo bem corado, arredondado e com proporção núcleo/citoplasma diminuída), característico de linfócitos, além da presença de células fagocitárias (macrófagos).

A análise da periferia dos espaços deixados pela presença do biomaterial, ainda não degradado, revelou a presença de células em íntimo contato com as partículas desse composto, e sem a presença de reação de corpo estranho e/ou presença de infiltrado inflamatório fora do padrão moderado do defeito, sinalizando a biocompatibilidade do mesmo (Figura 22).

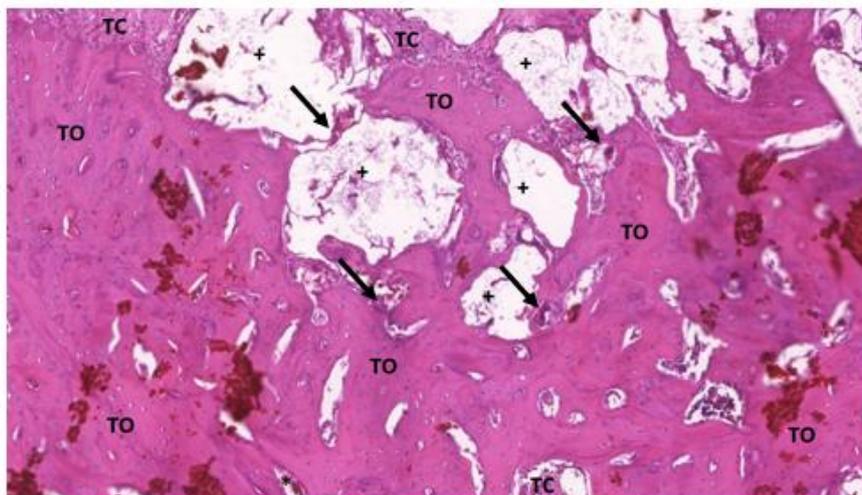
É possível observar a presença de algumas células gigantes, de amplo citoplasma, multinucleadas, sugestiva de osteoclastos, na imagem com maior aumento.

Figura 21 – Grupo 03 (Biocerâmica – β TCP + Polímeros – PCL/PLGA) aos 14 dias, corado em HE, no aumento de 10X e numa escala de 200 μ m. Visão panorâmica da região do centro do defeito ósseo, mostrando trabéculas ósseas neoformadas, recobertas por osteoblastos ativos, contendo osteócitos em seu interior e rodeadas por tecido conjuntivo. Em destaque as células sugestivas de osteoclastos (seta), trabéculas ósseas (TO), tecido conjuntivo (TC), vasos sanguíneos (*) e espaços do biomaterial (+)



(Fonte: Próprio autor).

Figura 22 – Grupo 03 (Biocerâmica – β TCP + Polímeros – PCL/PLGA) aos 28 dias, corado em HE, no aumento de 10X e numa escala de 200 μ m. Visão panorâmica da região do centro do defeito ósseo, mostrando trabéculas ósseas neoformadas, recobertas por osteoblastos ativos, contendo osteócitos em seu interior e rodeadas por tecido conjuntivo. Em destaque as células sugestivas de osteoclastos (seta), trabéculas ósseas (TO), tecido conjuntivo (TC), vasos sanguíneos (*) e espaços do biomaterial (+)



(Fonte: Próprio autor).

5.1.1.7. Grupo 04 (experimental) – DOX - 14 dias

É possível observar o epitélio com as características já citadas, parcialmente regenerado apresentando discreta área de descontinuidade provavelmente por interposição do biomaterial ainda não degradado, que se apresenta logo abaixo do epitélio, em continuidade com a lâmina própria.

Notam-se poucos espaços relativos a presença do biomaterial, na lâmina própria, que se apresenta como tecido conjuntivo bem desenvolvido, extenso e celularizado, seguida da região de reparo ósseo.

A análise do defeito ósseo pós exodontia, no tempo pós-operatório de 14 dias (T1), evidenciou a presença do trabeculado ósseo neo-formado em continuidade com as corticais alveolares previamente existentes, exibindo em sua periferia acentuado número de células osteoblásticas. Quando da análise do trabeculado ósseo presente, observamos áreas com diferentes características.

Na porção cervical do defeito (imediatamente abaixo da lâmina própria), notamos a presença de ossificação discreta (quando comparada ao centro do defeito, porém mais acentuada se comparada aos demais grupos, para T1 – 14 dias), com tecido ósseo pouco diferenciado, caracterizado pela presença de trabéculas ósseas esparsas e imaturas, porém com intensa atividade osteoblástica em suas bordas. Foi notada ainda, nessa porção superior do defeito, a presença de boa quantidade de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea refazendo a anatomia alveolar.

As trabéculas ósseas no centro do defeito aparecem espessas e bem definidas, com osteoblastos em toda sua periferia além de se caracterizarem como osso vital, com osteócitos preenchendo os espaços intra-trabeculares. Os espaços inter-trabeculares estão preenchidos por tecido conjuntivo celularizado e vascularizado, com a presença de infiltrado inflamatório leve, de predominância mononuclear (células de núcleo bem corado, arredondado e com proporção núcleo/citoplasma diminuída), característico de linfócitos, além da presença de células fagocitárias (macrófagos).

A análise da periferia dos espaços deixados pela presença do biomaterial, ainda não degradado, revelou a presença de células em íntimo contato com as partículas desse composto, e sem a presença de reação de corpo estranho e/ou presença de infiltrado inflamatório fora do padrão moderado do defeito, sinalizando a biocompatibilidade do mesmo (Figura 23).

Em menor número, ainda é possível observar a presença de algumas células gigantes, de amplo citoplasma, multinucleadas, sugestiva de osteoclastos.

5.1.1.8. Grupo 04 (experimental) – DOX - 28 dias

É possível observar o epitélio com as características já citadas, totalmente regenerado, não apresentando áreas de descontinuidade.

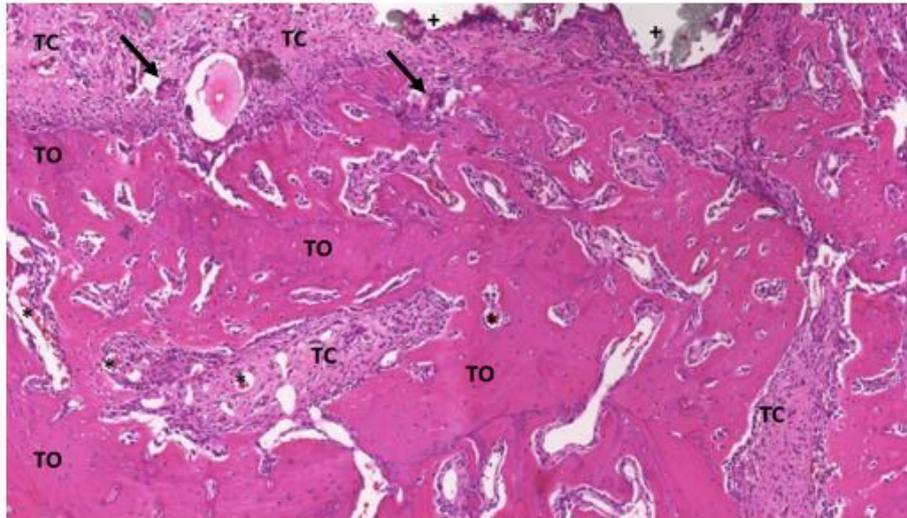
Notam-se muito poucos espaços relativos a presença do biomaterial (com trabéculas ósseas já maduras interpostas), na lâmina própria, que se apresenta como tecido conjuntivo bem desenvolvido, com extensão menor quando comparado ao tempo de 14 dias (t1) para o mesmo grupo, e celularizado, seguida da região de reparo ósseo.

A análise da região do defeito ósseo, na região do primeiro molar superior esquerdo, evidenciou a presença de trabeculado ósseo neo-formado em continuidade com as corticais alveolares previamente existentes, exibindo em sua periferia acentuado número de células osteoblásticas, refazendo a anatomia alveolar. Quando da análise do trabeculado ósseo presente, observamos áreas com diferentes características, porém menos exacerbadas quando comparadas ao grupo do tempo 14 dias (T1). Apesar do volume de neo-formação óssea ser aparentemente semelhante, notamos menores áreas de osso imaturo e esparsos no tecido conjuntivo da lâmina própria, que ainda nesse tempo se apresenta bem evidente contribuindo para a manutenção da anatomia alveolar. Notamos em sua maioria trabeculado ósseo maduro, espesso e bem definido, com osteoblastos em toda sua periferia e osteócitos em grande número preenchendo os espaços intra-trabeculares, caracterizando-o como osso perfeitamente vital.

A análise da periferia dos espaços deixados pela presença do biomaterial, ainda não degradado, revelou a presença de células em íntimo contato com as partículas desse composto, e sem a presença de reação de corpo estranho e/ou presença de infiltrado inflamatório fora do padrão moderado do defeito, sinalizando a biocompatibilidade do mesmo. Os espaços inter-trabeculares estão preenchidos por tecido conjuntivo celularizado e vascularizado, com a presença de infiltrado inflamatório leve, de predominância mononuclear (células de núcleo bem corado, arredondado e com proporção núcleo/citoplasma diminuída), característico de linfócitos, além da presença de células fagocitárias (macrófagos) (Figura 24).

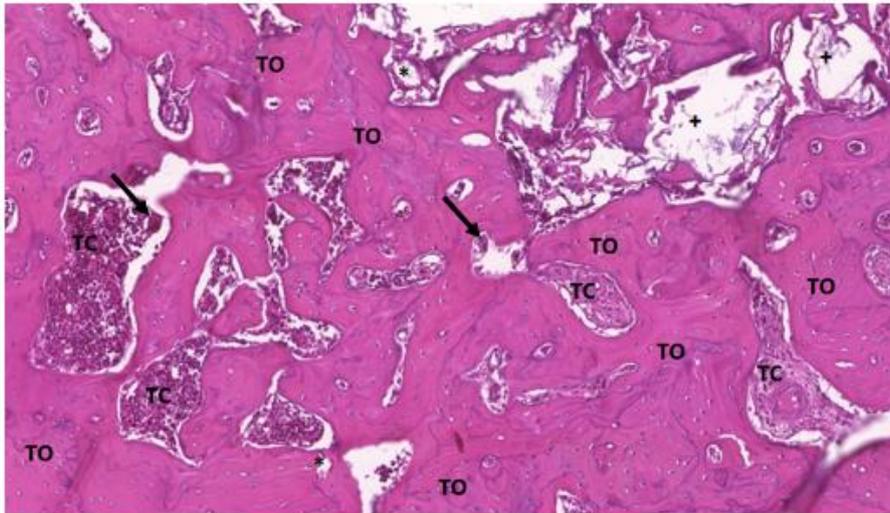
Em menor número, ainda é possível observar a presença de algumas células gigantes, de amplo citoplasma, multinucleadas, sugestiva de osteoclastos.

Figura 23 – Grupo 04 (Biocerâmica – β TCP + Polímeros – PCL/PLGA + DOX + β CD) aos 14 dias, corado em HE, no aumento de 10X e numa escala de 200 μ m. Visão panorâmica da região do centro do defeito ósseo, mostrando trabéculas ósseas neoformadas, recobertas por osteoblastos ativos, contendo osteócitos em seu interior e rodeadas por tecido conjuntivo. Em destaque as células sugestivas de osteoclastos (seta), trabéculas ósseas (TO), tecido conjuntivo (TC), vasos sanguíneos (*) e espaços do biomaterial (+)



(Fonte: Próprio autor).

Figura 24 – Grupo 04 (Biocerâmica – β TCP + Polímeros – PCL/PLGA + DOX + β CD) aos 28 dias, corado em HE, no aumento de 10X e numa escala de 200 μ m. Visão panorâmica da região do centro do defeito ósseo, mostrando trabéculas ósseas neoformadas, recobertas por osteoblastos ativos, contendo osteócitos em seu interior e rodeadas por tecido conjuntivo. Em destaque as células sugestivas de osteoclastos (seta), trabéculas ósseas (TO), tecido conjuntivo (TC), vasos sanguíneos (*) e espaços do biomaterial (+)



(Fonte: Próprio autor).

5.1.2. Coloração por tricrômio de masson

O método de coloração através do Tricrômio de Masson (com azul de anilina) tem aplicabilidade principal para a coloração de tecido conjuntivo, incluindo o tecido ósseo. No presente estudo, nota-se que o trabeculado ósseo se cora mais fortemente em tons azulados, quanto mais maduro for esse tecido. O mesmo tecido se cora em tons de vermelho, a medida que é mais imaturo e/ou neoformado (LEHMAN *et al.*, 2019, TELLES DE SOUZA *et al.*, 2018, DAS *et al.*, 2014).

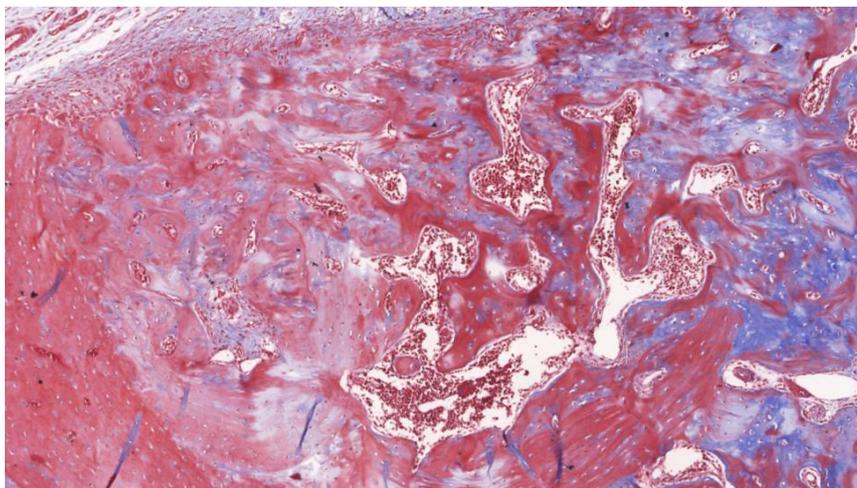
Conforme já descrito pela literatura atual (GOMES, *et al.*, 2015), a neoformação óssea no modelo animal em ratos, utilizado pelo estudo, parece não ter grandes alterações após o 14^o dia. Portanto, optamos por, nessa coloração analisar as lâminas com 28 dias (T2), afim de obtermos os resultados, de certa forma, estáveis para os grupos testados.

A seguir, a descrição particular para cada grupo/tempo operatório, sendo que a área analisada é a do centro do alvéolo, seguindo o mesmo método de eleição já descrito para as análises com HE.

5.1.2.1. Grupo 01 - Coágulo

Observou-se extensa área de neoformação óssea com predomínio da coloração em tons de vermelho, ainda aos 28 dias, evidenciando extensa neoformação óssea porém com predominância de trabeculado imaturo. Conseguimos, porém observar a presença, em menor volume, de trabéculas mais maduras com a presença de tons mais azulados quando da coloração deste corte histológico, principalmente na periferia da lesão. Importante ressaltar, se tratando do grupo onde o defeito ósseo foi preenchido apenas com o coágulo sanguíneo, a presença de números e dilatados vasos (Figura 25).

Figura 25 – Corte histológico, corado por Tricrômio de Masson, evidenciando trabeculado ósseo intenso e pouco maduro (tons de vermelho predominantes) aos 28 dias (aumento de 10x, escala de 200 μ m).

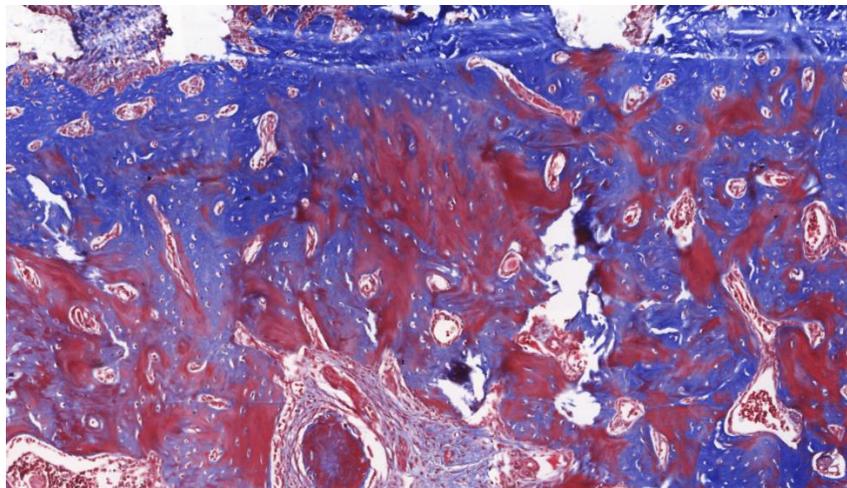


Fonte: Próprio autor.

5.1.2.2. Grupo 02 - Biocerâmica

Observamos importante área de neoformação óssea maior no tempo 28 dias. Observa-se o predomínio do tom azulado para os cortes do tempo 28 dias (T2), porém ainda com volume importante de osso não maduro (corado em tons de vermelho). Observamos a presença de tecido conjuntivo, também corado em vermelho, sinalizando a presença de osso imaturo, pouco denso entremeado as trabéculas já organizadas e morfológicamente características. Importante ressaltar os espaços vazios, correspondentes ao biomaterial ainda presente e de vasos bem característicos (Figura 26).

Figura 26 – Corte histológico, corado por Tricrômio de Masson, evidenciando trabeculado ósseo intenso e mais maduro (tons de azul), aos 28 dias, porém ainda com a presença de osso imaturo, corado em tons de vermelho (aumento de 10x, escala de 200 µm).



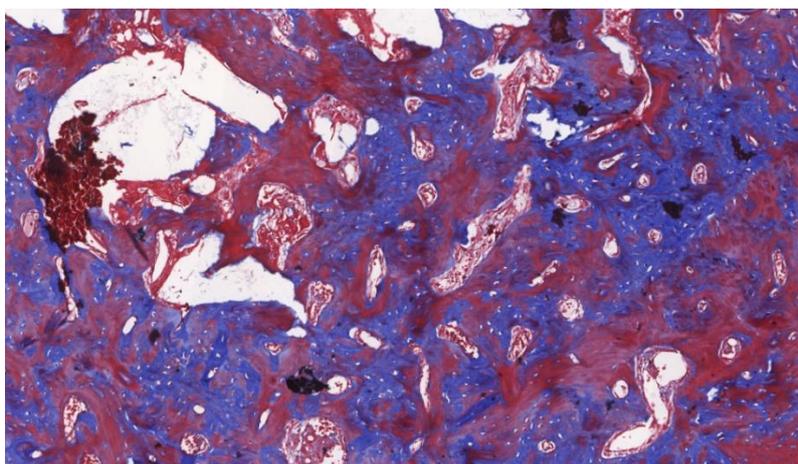
Fonte: Próprio autor

5.1.2.3. Grupo 03 - Biocerâmica + Polímeros

Observa-se área de intensa neoformação óssea no tempo 28 dias, sendo que quando observamos a maturação das trabéculas, notamos resultados

semelhantes ao grupo tratado apenas com biocerâmica. Conseguimos notar o predomínio do tom azulado para os cortes do tempo 28 dias (T2), porém ainda com volume importante de osso não maduro (corado em tons de vermelho). Observamos a presença de tecido conjuntivo, também corado em vermelho, sinalizando a presença de osso imaturo, pouco denso entremeado as trabéculas já organizadas e morfológicamente características. Importante ressaltar os espaços vazios, correspondentes ao biomaterial ainda presente e de vasos bem característicos (Figura 27).

Figura 27 – Corte histológico, corado por Tricrômio de Masson, evidenciando trabeculado ósseo intenso e maduro (tons de azul predominantes) aos 28 dias (aumento de 10x, escala de 200 μ m).



Fonte: Próprio autor

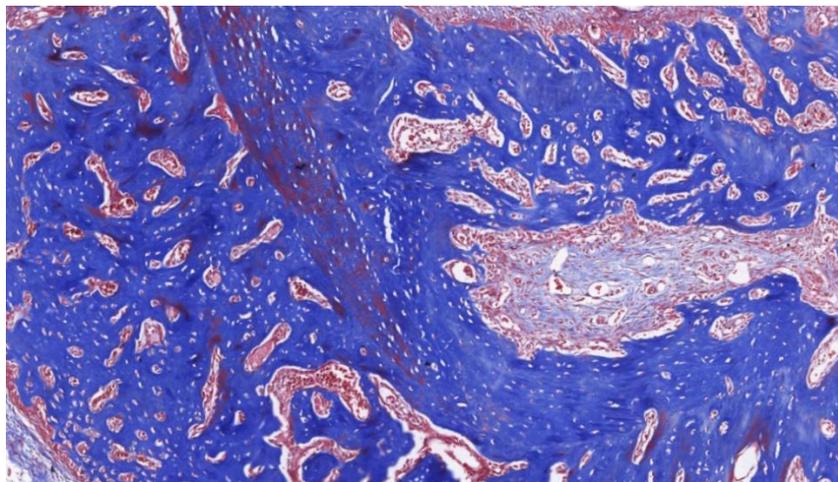
5.1.2.4. Grupo 04 (Experimental) – DOX

Quando da análise do grupo experimental, aos 28 dias, observa-se uma importante área de neoformação de tecido ósseo.

Nota-se que há um predomínio de trabeculado ósseo maduro (corado em tons de azul) quando comparado ao tom de vermelho, que sinaliza um osso mais imaturo. É possível, porém, observar pequenas ilhas de osso neoformado (corado em vermelho e seus tons), sinalizando uma recente absorção do

biomaterial e, por consequência, uma também recente formação óssea. Vale a pena ainda citar que praticamente não se observam espaços referentes a presença de biomaterial ainda não metabolizado. Observa-se a presença de tecido conjuntivo, também corado em vermelho, sinalizando a presença de osso imaturo, pouco denso entremeadado as trabéculas já organizadas e morfológicamente características. Importante ressaltar a possibilidade de identificação de estruturas vasculares bem delimitadas, também nessa coloração (Figura 28).

Figura 28 – Corte histológico, corado por Tricrômio de Masson, evidenciando trabeculado ósseo intenso e maduro (tons de azul predominantes), aos 28 dias (aumento de 10x, escala de 200 μ m).



Fonte: Próprio autor

5.2. Marcação para TRAP

A técnica histoquímica empregada para a detecção de TRAP, mostrou alta especificidade na detecção de tais proteínas. As marcações se apresentaram com uma coloração acastanhada confinadas ao compartimento citosólico das células osteoclásticas.

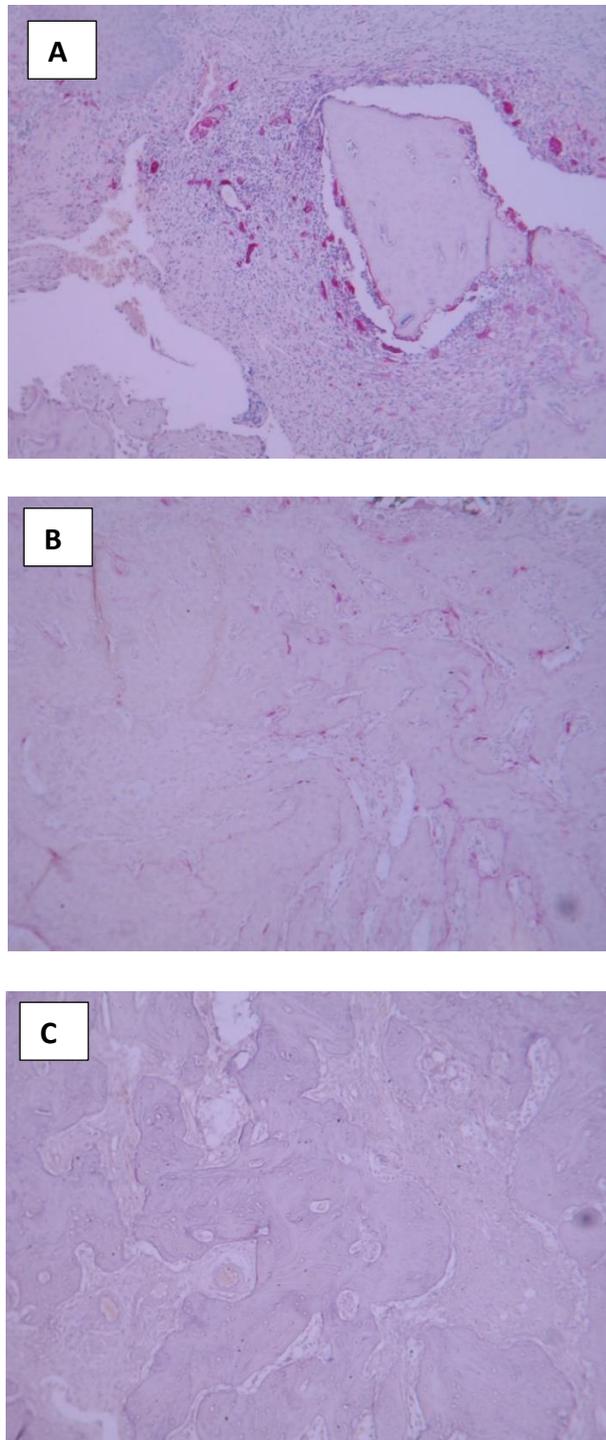
Observa-se, para o estudo em questão, que, quando comparados os dois tempos analisados, T1 e T2, houve um decréscimo no número de células

osteoclásticas marcadas pela histoquímica, inclusive no grupo teste, contendo DOX (Figura 29). O Grupo 01 – Coágulo, apresentou aos 14 dias uma maior quantidade de células osteoclásticas, quando comparado aos demais, provavelmente por não haver nenhuma interferência no reparo ósseo tecidual. Os demais, apresentaram uma contagem diminuída na marcação dessas células, mesmo nos grupos sem DOX, levantando a possibilidade de haver uma relação entre os biomateriais utilizados e a diferenciação das células em questão (Figura 30).

Tabela 01 - Análise semi-quantitativa para contagem celular das células osteoclásticas marcadas por TRAP, de acordo com a média de cada grupo.

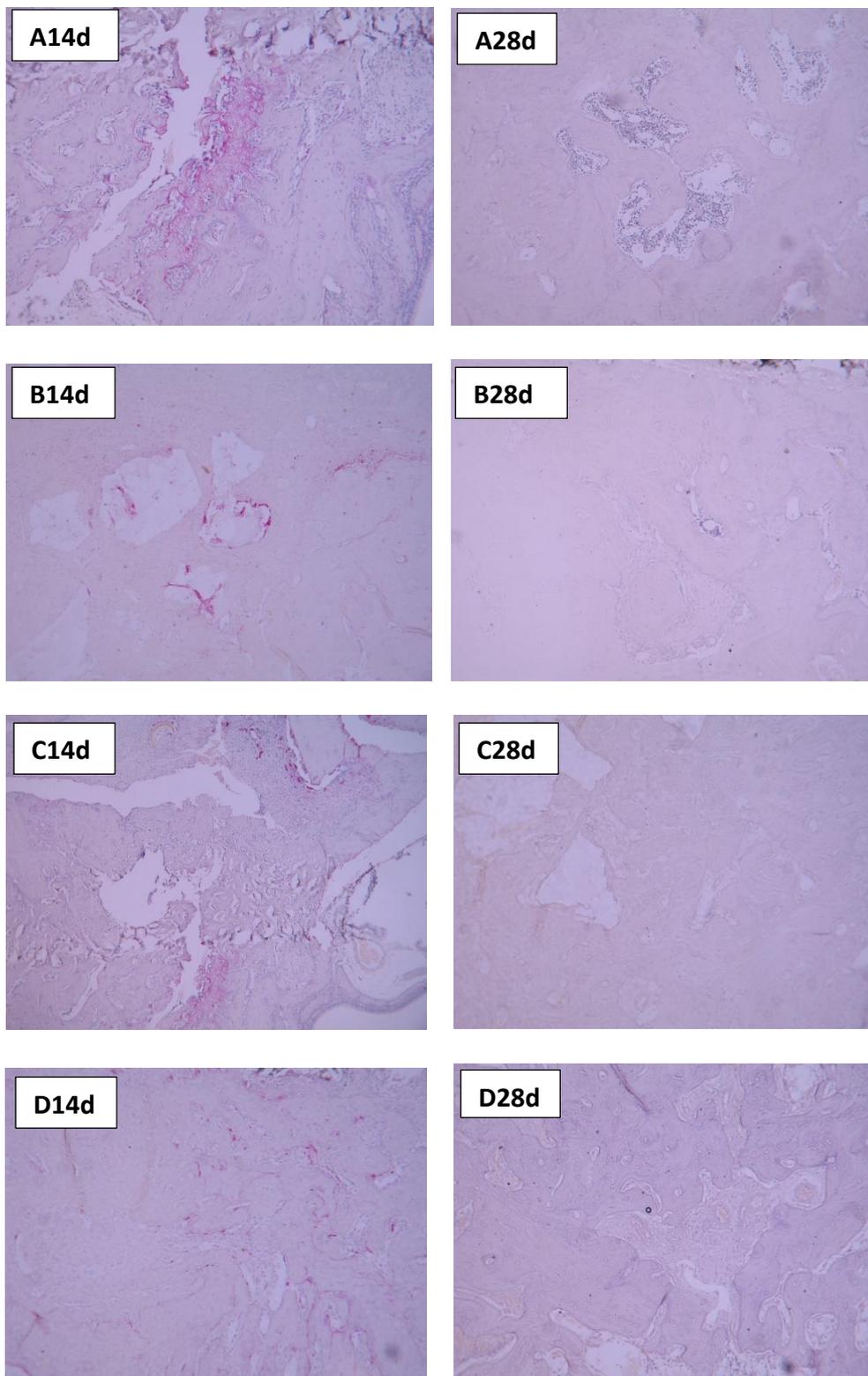
Grupo	Média de Contagem Celular	
	T1 – 14d	T2 – 28d
Grupo 01	11,5	0,75
Grupo 02	3,00	0,67
Grupo 03	5,33	0,25
Grupo 04	10,33	1,30

Figura 29 – Comparação das marcações para células osteoclásticas em A (Grupo 01 – Coágulo), em B (Grupo 04, com a presença de DOX, aos 14 dias) e em C (Grupo 04, com a presença de DOX, aos 28 dias), sendo os osteoclastos marcados em vermelho acastanhado (aumento de 10X)



(Fonte: Próprio autor).

Figura 30 – Esquema comparativo das marcações, entre os diferentes tempos, para células osteoclásticas (A – Grupo 01, B – Grupo 02, C – Grupo 03 e D – Grupo 04) (Aumento de 10x)

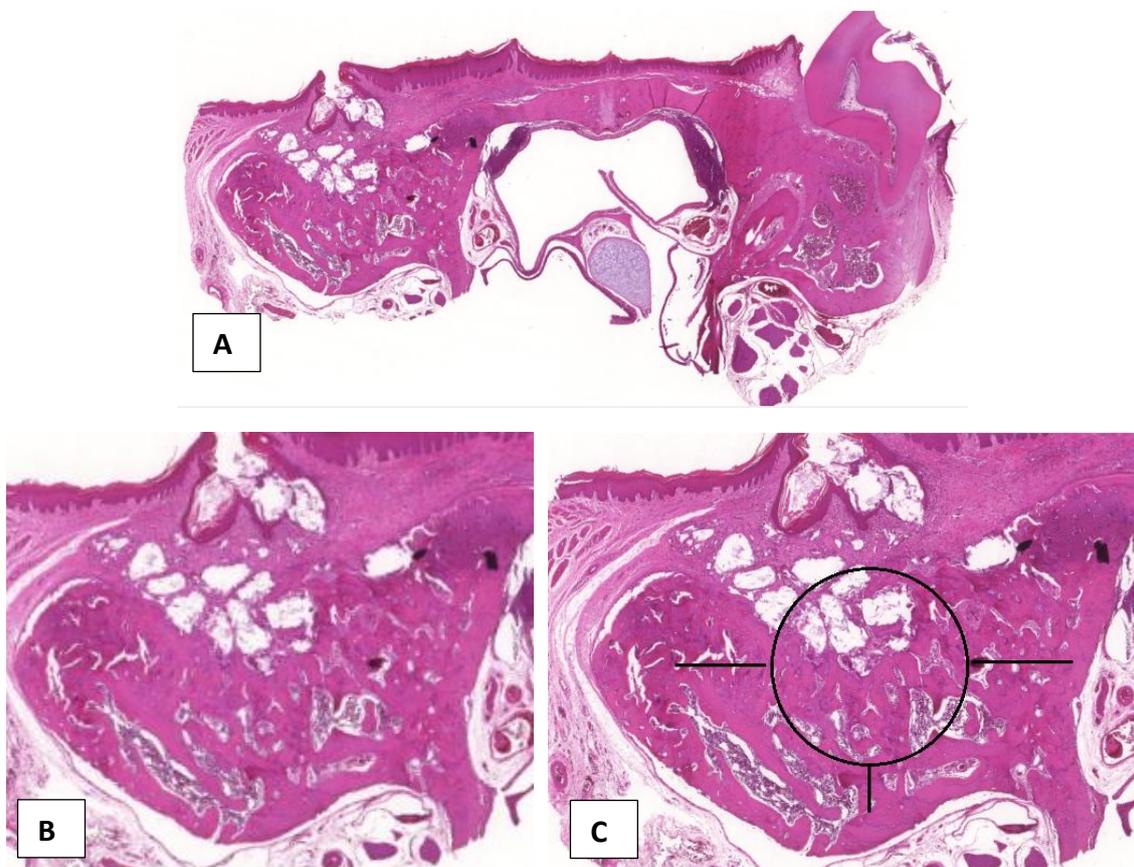


(Fonte: Próprio autor).

5.3. Análise histomorfométrica

As lâminas, após escaneadas, foram analisadas com auxílio do software já citado, seguindo os seguintes parâmetros: a partir do corte como um todo, no sentido coronal como plano anatômico de orientação, utilizou-se o primeiro molar do lado oposto ao defeito como referência de localização. A partir daí, selecionou-se na área do defeito a região de interesse, desprezando-se as regiões próximas as corticais apical, palatina e vestibular, afim de se evitar um resultado falso positivo (Figura 31, A e B).

Figura 31 – Representação esquemática da estratégia para seleção da área eleita para análise histomorfométrica: corte coronal completo (A), maior aumento para região do defeito ósseo, pós exodontia do primeiro molar superior esquerdo (B), área analisada circundada, no centro do defeito, desprezando-se as corticais do alvéolo (C).



Para cada animal, dentro de cada grupo, e para os diferentes tempos experimentais, após o escaneamento das lâminas coradas em Hematoxilina e Eosina, e, com auxílio do software já citado, foram delimitadas as áreas de interesse ($200.000 \mu\text{m}^2$) e assim procedeu-se com a análise histomorfométrica quantitativa dos cortes, obtendo-se os resultados descritos a seguir.

A análise descritiva foi utilizada com a finalidade de explorar a distribuição dos dados. Esses foram expressos em valores médios e medianos seguido de desvio

padrão, primeiro e terceiro quartis, respectivamente. Além disso a distribuição foi representada por meio de gráficos box-plot. Os dados foram avaliados pelo teste ANOVA no modelo fatorial (4×2); foi aplicado para comparar as médias dos tratamentos (Coágulo, β TCP, β TCP/PCL/PLGA e β TCP/PCL/PLGA/DOX/ β CD) e dos dois tempos (T1 e T2).

Os nomes em parênteses são como cada subgrupo foi denominada na parte

descritiva do trabalho: Coágulo, BTCP (B), β TCP/PCL/PLGA (BPPL), β TCP/PCL/PLGA/DOX/ β CD (BPPLDO).

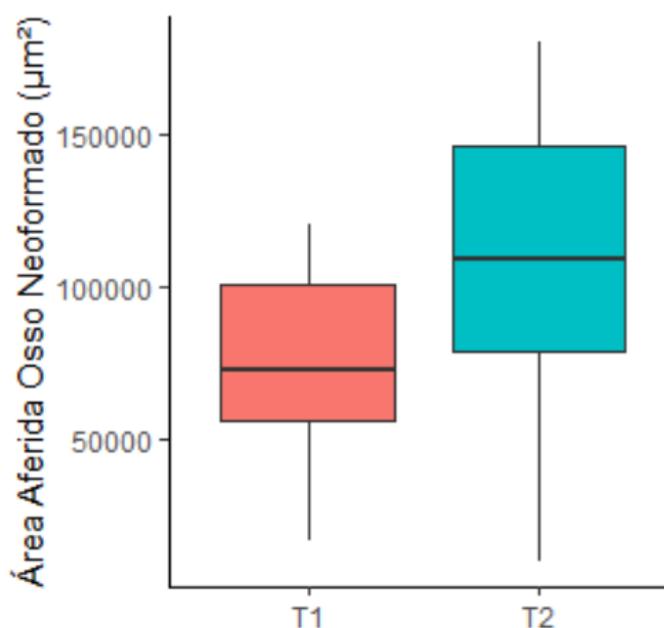
A Tabela 01 mostra medidas descritivas de cada tratamento, como média, desvio padrão, da área aferido do osso em μm^2 . Observa-se que em T1, o Grupo 04 – Teste, apresentou a maior área de neoformação óssea, quando comparado aos demais grupos, sendo que para T2, essa área se manteve praticamente constante, porém com trabeculado mais estruturado e maduro, conforme demonstrou a coloração por Tricrômio de Masson.

Tabela 02 - Medidas descritivas para a área aferida de osso neoformado em μm^2

Tratamento	Média Tempo (μm^2)		DP Tempo (μm^2)	
	T1	T2	T1	T2
Coágulo	72.024,3	151.851,9	32.858,9	25.668,6
β TCP	65.341,6	89.347,3	22.330,0	73.042,2
β TCP/PCL/PLGA	60.929,3	105.450,5	30.939,5	31.649,4
β TCP/PCL/PLGA/DOX/ β CD	91.066,1	92.643,2	39.001,0	46.963,2

O Gráfico 01 (box-plot) apresenta a distribuição do osso neoformado nos diferentes tempos operatórios T1 e T2. Sendo que o valor da mediana de T1 e T2, equivalem respectivamente a $72.650,55 \mu\text{m}^2$ e $108.884,9 \mu\text{m}^2$ e a amplitude de T1 é $103.305 \mu\text{m}^2$ e a de T2 é $169.705,8 \mu\text{m}^2$. É possível observar, de uma forma geral, que a neoformação óssea foi maior em T2, quando comparada a T1, o que não traduz, por exemplo a estruturação e maturação do osso neoformado, por exemplo no Grupo 04.

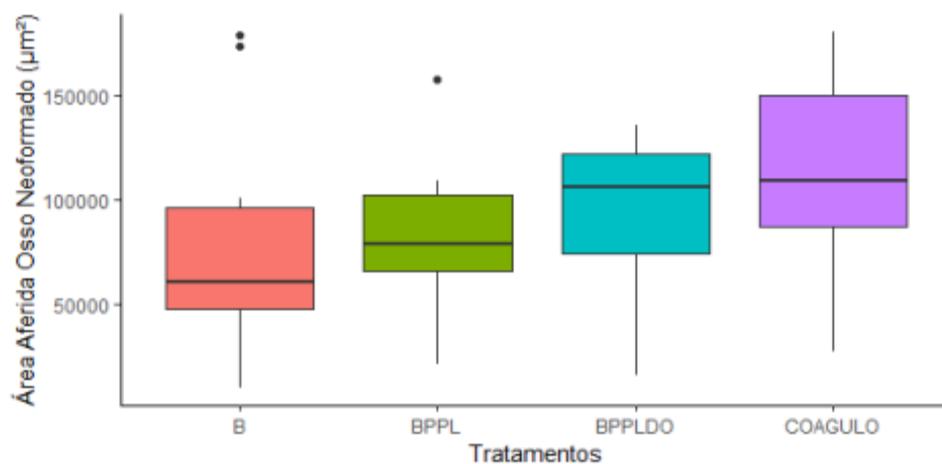
Gráfico 01 – Distribuição da área aferida de osso neoformado (μm^2) em cada tempo



O Gráfico 02, representa a distribuição dos dados por tratamentos, desconsiderando a divisão de tempos. A área aferida dos animais no tratamento coágulo possui a maior mediana de $109.405,7 \mu\text{m}^2$; em seguida é a mediana de BPPLDO $105.808,3 \mu\text{m}^2$, a terceira é BPPL com $79.107,3 \mu\text{m}^2$ e a última é a mediana de B com $60.709,15 \mu\text{m}^2$. Nota-se que quando comparados os Grupos 01 – Coágulo e Grupo 04 – Teste, há uma proximidade muito grande entre os valores da mediana, evidenciando quantitativamente a maior neoformação

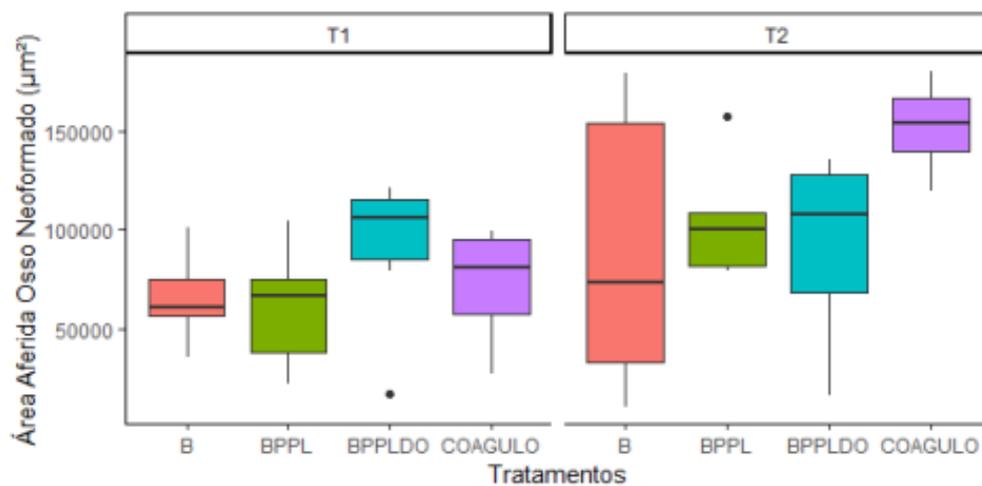
óssea desses grupos quando comparados aos demais. Observa-se ainda que, quando da comparação entre o Grupo 04, contendo DOX, e os demais grupos de biomateriais sem o antimicrobiano, este se mostrou com resultado melhor, de maior área de osso neoformado, sugerindo efetividade quando da adição de Doxiciclina ao compósito.

Gráfico 02 – Distribuição da área aferida de osso neoformado (μm^2) para cada tratamento, desconsiderando-se o tempo.



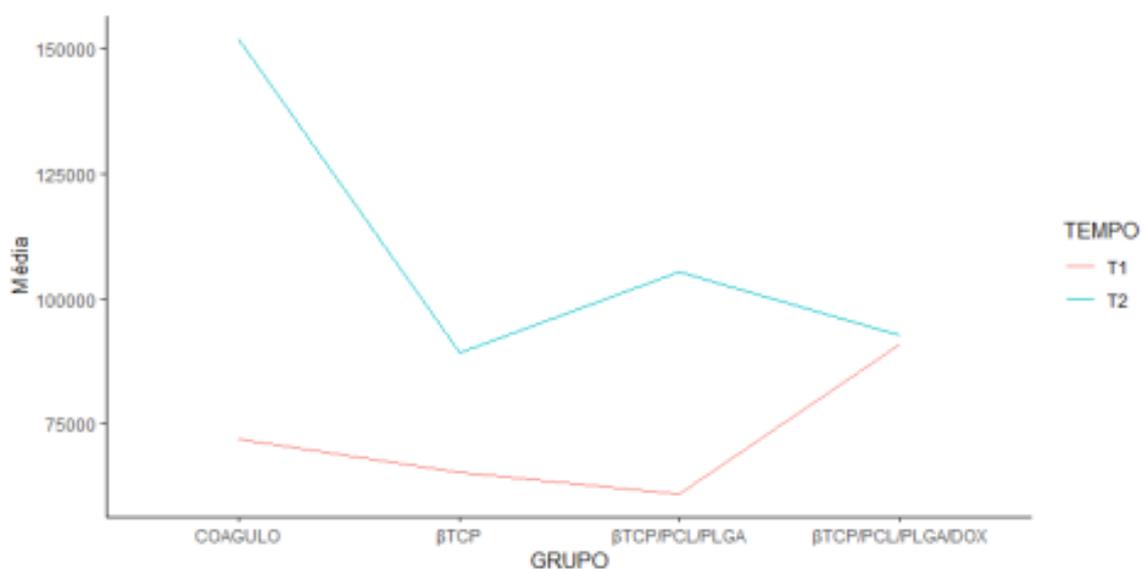
O Gráfico 03, mostra a distribuição de dados de todos os tratamentos, considerando o tempo (T1 e T2). Nota-se, então, que para T1, o Grupo 04 (BPPLDO), foi o que obteve melhor resultado, quando analisada a área de osso neoformado, em comparação aos demais. Ao analisar o tempo de 28 dias, T2, observamos um aumento da área de osso neoformado para o Grupo 01 - Coágulo, principalmente, sendo que o Grupo 04, se manteve praticamente constante, ao se compara o tempo de 14 dias (T1) e o tempo de 28 dias (T2).

Gráfico 03 – Distribuição da área aferida de osso neoformado (μm^2) para cada tratamento, considerando os diferentes tempos operatórios.



Observando o Gráfico 04, percebe-se que o comportamento da variável resposta entre os tratamentos muda de acordo o tempo, indicando uma possível interação entre os tratamentos e o tempo. Mais uma vez, nota-se que, para T1 (reta traçada em laranja) o Grupo 04, contendo DOX, foi o que se mostrou mais eficiente no que diz respeito a área de neoformação óssea analisada.

Gráfico 04 – Interação entre os tratamentos e os tempos



O modelo atendeu aos requisitos de normalidade e homocedasticidade (Gráfico 01 – Anexo II). A normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) e a homogeneidade entre as variâncias pelo teste de Levene ($p > 0,05$). As comparações múltiplas foram realizadas usando correção de Bonferroni.

Na Tabela 02, os tempos foram fixados e os quatro tratamentos comparados.

Ao nível de significância de 0,05, a única diferença notável é entre os tratamentos Coágulo e β TCP no T2 ($p < 0,05$). Porém, é importante dizer que, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos, para os diferentes tempos, houve sim diferença na área de neoformação óssea, sendo que em T1, o Grupo 04, foi o que apresentou o melhor resultado nesse quesito.

Tabela 03 – Comparação dos tratamentos fixando os tempos

Tempo	Contraste	P-valor
T1	Coágulo - β TCP	1,000
T1	Coágulo - β TCP/PCL/PLGA	1,000
T1	Coágulo - β TCP/PCL/PLGA/DOX/ β CD	1,000
T1	β TCP - β TCP/PCL/PLGA	1,000
T1	β TCP - β TCP/PCL/PLGA/DOX	1,000
T1	β TCP/PCL/PLGA - β TCP/PCL/PLGA/DOX/ β CD	0,822
T2	Coágulo - β TCP	0,006
T2	Coágulo - β TCP/PCL/PLGA	0,310
T2	Coágulo - β TCP/PCL/PLGA/DOX/ β CD	0,069
T2	β TCP - β TCP/PCL/PLGA	0,391
T2	β TCP - β TCP/PCL/PLGA/DOX/ β CD	0,953
T2	β TCP/PCL/PLGA - β TCP/PCL/PLGA/DOX/ β CD	1,000

6 DISCUSSÃO

Tendo como base os princípios de liberação controlada de fármacos, de Engenharia Tecidual associada a polímeros biodegradáveis e biocerâmicas como suporte mecânico, além da concentração ideal que favorecesse a atividade osteogênica da Doxíciclina, o presente estudo propôs a avaliação do compósito de DOX, encapsulada em β CD em matrizes de PCL/PLGA/ β TCP, *in vivo*.

Neste presente estudo, levantou-se a hipótese de que o compósito de DOX, e seus demais componentes, favoreceriam a neo-formação óssea em modelo animal, pós exodontia de molar superior em ratos.

Para caracterização e padronização desse modelo de reparo ósseo, inicialmente foi realizado um estudo piloto observando-se parâmetros histológicos dos alvéolos de ratos tratados com diferentes concentrações do compósito de DOX, nos períodos de 14 e 28 dias. Os critérios para delineamento dos períodos foram baseados nos trabalhos realizados por Carvalho e Okamoto, (1985), entre outros (GORUSTOVICH *et al.*, 2008; BARÓ *et al.*, 2013; KUROSHIMA *et al.*, 2013; ABREU *et al.*, 2013). Esses autores descreveram que o processo de reparo do alvéolo tem início imediatamente após a exodontia, sendo o alvéolo preenchido por coágulo sanguíneo. Esta se constitui em etapa essencial no reparo tecidual, uma vez que o coágulo formado por plaquetas, transporta uma série de fatores de crescimento necessários aos eventos de remodelação e reparo ósseos. Nas fases seguintes, morfologicamente são consideradas quatro etapas principais: a fase de proliferação celular, fase de desenvolvimento e maturação do tecido conjuntivo, sendo o processo encerrado com a fase de maturação óssea (VIEIRA *et al.*, 2015).

Quando da análise da neoformação óssea, em relação aos diferentes tempos considerados, notamos que a amostra apresentou, principalmente para o Grupo 4 (β TCP/PCL/PLGA/DOX/ β CD), aos 14 dias, uma maior área de preenchimento ósseo do defeito, com trabeculado denso e maduro em sua grande parte, contrastando com áreas de osso recentemente depositado, como mostrou a coloração de Masson. Esse dado corrobora com o encontrado por Gomes, (2015), que em seu estudo testando o efeito da DOX no mesmo modelo

animal a autora afirma que o 14^o dia após a cirurgia é caracterizado por apresentar extensas áreas de neoformação óssea, circundadas por tecido conjuntivo fibroso e com discreto infiltrado inflamatório.

De acordo com o mesmo estudo de Gomes, (2015), e corroborando com outros autores (YONEDA *et al.*, 2014; GHALAYANI *et al.*, 2014) que afirmam que aos 14 dias já podemos encontrar osso maduro no terço apical do alvéolo e osso imaturo preenchendo o alvéolo em sua porção coronal, o que também foi observado para este tempo operatório no grupo teste (Grupo 4 – β TCP/PCL/PLGA/DOX/ β CD) do presente estudo.

Shahabooui *et al.*, (2015), estudaram e quantificaram a neoformação óssea em defeitos de maxilas de ratos pós exodontias e afirmaram entre a segunda e a quarta semana nenhuma diferença significativa no percentual de neoformação óssea é observada, assim como Naghsh *et al.*, (2018), que em seu estudo de modelo animal igual ao do presente trabalho afirmaram que já está demonstrado que 14 dias após a extração dentária em ratos é o tempo médio de máxima formação de volume ósseo nos alvéolos. Essas informações se somam aos achados do nosso estudo, no qual para o Grupo 04, com DOX, percentualmente não houve diferença significativa na área de neoformação óssea quando comparamos T1 e T2 (14 e 28 dias), o que sinaliza uma possível maior efetividade do sistema de liberação controlada do fármaco nos primeiros dias do reparo ósseo. Porém, quando analisamos os demais grupos controles, notamos que houve diferenças, mesmo que não estatisticamente significativas, entre os tempos operatórios inclusive para o grupo coágulo, o que vai de encontro ao descrito pelo autor acima citado.

O processo de reparo ósseo alveolar ocorre por primeira intenção e é caracterizado por uma resposta fibroproliferativa onde ocorre a expressão de diversos fatores de crescimento envolvendo a proliferação e diferenciação de fibroblastos, osteoblastos e células endoteliais. Do ponto de vista molecular, nessa etapa, ocorre ativação dos macrófagos linfócitos e células endoteliais, via estímulo de INF- γ , nas fases iniciais (7^o ao 14^o dia após a exodontia) desse processo, levando a uma acentuação na expressão de citocinas pró inflamatórias. Entre elas, TNF- α é uma clássica citocina responsável pela indução da transmigração de células inflamatórias, justificando o influxo de leucócitos para o tecido de granulação desencadeado pelo trauma tecidual

(LIEBERMAN *et al.*, 2002; SCHMIDT-BLEEK *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2015). Esse fenômeno orquestra o processo de reparo em todas as suas etapas de angiogênese (LIENAU *et al.*, 2009), remoção de tecido de granulação e formação óssea (JAHANGIRI *et al.*, 1998; VIEIRA *et al.*, 2015).

Estudos mostraram que, para ocorrer as fases de transição e substituição do tecido de granulação por tecido conjuntivo, deverá ocorrer a redução do processo inflamatório e sua persistência acarreta um atraso nesse processo (CARDOSO *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2012). A resolução do processo inflamatório é compreendida e necessária para o avanço do reparo e posterior neoformação óssea no alvéolo dental (MAAHS *et al.*, 2011). Estudos clínicos e experimentais mostraram que a reação inflamatória produz efeitos deletérios sobre o remodelamento ósseo, induzindo a um incremento na reabsorção e decréscimo da formação (BRIOT; ROUX, 2015).

De acordo com Rubin e Gorstein (2006), a fase de reparação óssea inicia-se na primeira semana e é caracterizada por redução na expressão de células de inflamação aguda e diferenciação de células pluripotentes em fibroblastos e osteoblastos. Foi verificado nos alvéolos dos ratos tratados, uma atividade da DOX na sequência de eventos que concorrem para o processo de reparo do alvéolo dentário submetido à exodontia. Ao considerar a presença, tipo e intensidade de infiltrado inflamatório, foi observado no Grupo 01 (Coágulo), por exemplo, presença de infiltrado leucocitário misto, porém predominantemente mononuclear (linfócitos e macrófagos) de intensidade leve a moderada, enquanto que o tratamento com DOX reduziu discretamente o infiltrado inflamatório leucocitário, caracterizado histologicamente como infiltrado leve porém de mesmas características, corroborando com o estudo de Gomes *et al.*, (2017). É possível que o tratamento com DOX colabore no processo de reparo ósseo, pois a modulação do processo inflamatório, acelera a remodelação óssea após perda dentária (YONEDA *et al.*, 2014).

Há na literatura, diversas referências às propriedades da DOX sobre a expressão de muitos dos fatores que interferem na evolução do processo de reparo ósseo alveolar. Moutsatsos *et al.*, (2001) e Lucateli *et al.*, (2018) mostraram que a DOX é capaz de controlar a expressão de BMP-2, regular o processo de angiogênese e a diferenciação osteogênica tanto *in vitro* como *in*

vivo, sugerindo que esse análogo de tetraciclina possui atividade sobre a formação e regeneração óssea.

Franco *et al.*, (2011) confirmaram em modelo de calvária em ratos, a eficácia de DOX sobre osteoclastogênese sinalizada por RANKL, inibindo a ação enzimática da MMP-9. Neste mesmo estudo, foi observada *in vitro* que DOX modula a expressão de mRNA de marcadores funcionais dos osteoclastos, incluindo fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e catepsina K.

Em cultura de células com células mesenquimais, Baniwal *et al.*, (2012), concluíram que DOX favorece e controla a diferenciação dos osteoblastos e indiretamente a diferenciação de osteoclastos, por aumentar a expressão de RUNX-2 em pré-osteoblastos.

O presente trabalho demonstrou que a análise histoquímica pode ser considerada uma importante ferramenta de estudo nessa área, sendo eficaz por fornecer uma avaliação diferenciada da expressão e da localização de proteínas envolvidas no processo de reparo ósseo, fornecendo, portanto, informações complementares às obtidas na análise histomorfométrica. Assim como no trabalho de Naghsh *et al.*, (2018), onde foi demonstrado que a presença de Doxiciclina e Eritromicina, diminuíram a contagem de células osteoclásticas marcadas por TRAP a partir do dia 7 do pós operatório, o presente estudo demonstrou que, quando comparado ao Grupo 01 (Coágulo) e com o próprio Grupo 04 (β TCP/PCL/PLGA/DOX/ β CD), aos 14 dias (T1), o Grupo 04 (β TCP/PCL/PLGA/DOX/ β CD), aos 28 dias (T2) apresentou uma contagem muito diminuída de células osteoclásticas marcadas histoquimicamente por TRAP, sugerindo um recrutamento inicial dessas células, quando do início do processo de reparo, sendo a presença e/ou diferenciação destas inibidas com a liberação do fármaco em questão (DOX).

No presente estudo, pudemos observar que o pico maior de neo-formação óssea relacionada à presença de DOX, e que pode corroborar com os dados da literatura acima mencionados, se deu até os 14 dias e se manteve, percentualmente, na análise com 28 dias. Tal episódio pode ser justificado pelo fato de o sistema de liberação de drogas utilizado ter sido mais eficiente durante esse primeiro período, mantendo a Doxiciclina disponível localmente e, por consequência, sendo seus efeitos locais melhor observados e as taxas de osteogênese aumentadas, corroborando com o estudo de Limirio *et al.*, (2015),

que afirma que o sistema de liberação controlado de drogas, em específico com o uso de DOX, tem sim influência nas taxas de neo-formação óssea no reparo de alvéolos pós exodontia em modelo animal de ratos. Dados estes que estão de acordo com o estudo Alenzi *et al.*, (2017), no qual o autor afirma que num modelo animal com ratos, o uso de carreadores nanoestruturados para a disponibilização local de tetraciclina em defeitos ósseos, os melhores resultados foram observados entre 2 e 4 semanas, no máximo, de pós operatório, não sendo observados melhores efeitos após esse tempo.

É válido citar, ainda, que muitos estudos relacionam a eficiência da DOX, com relação ao seu potencial osteogênico, com sua concentração. De acordo com Gomes *et al.*, (2007) e Park *et al.*, (2012), doses mais baixas de DOX, podem resultar em efeito positivo na diferenciação de células osteoprecursoras, sendo ainda um efeito não citotóxico para os estudos *in-vitro*, doses de até 10% de concentração. O presente estudo, amparado nessas informações, e em concordância com o uso de um sistema de liberação controlada do fármaco, optou por doses de 5%, imaginando que a disponibilização da droga no sítio local, por mais tempo, compensaria a diminuição da concentração da mesma no compósito.

É necessário citar ainda que os achados do estudo *in-vitro* de Trajano *et al.*, (2012), no qual os autores citam se tratar de um compósito biocompatível e não citotóxico foram confirmados no estudo *in-vivo* para o modelo animal em questão. No presente estudo pudemos observar partículas remanescentes do biomaterial rodeadas por células viáveis e sem observarmos reação de corpo estranho, além de infiltrado inflamatório compatível com o grupo controle e trabeculado ósseo neoformado totalmente viável.

São necessários estudos adicionais para avaliar com maior amplitude o comportamento da DOX, em defeitos alveolares. Observa-se que como limitação do trabalho, a padronização exata dos defeitos parece não ter sido de influência crucial para os resultados, apesar da dificuldade sob um campo operatório restrito. Imagina-se que, a adição de outros grupos controle, por exemplo a associação de DOX a biocerâmica, poderiam elucidar melhor o efeito do fármaco frente ao seu potencial de neo-formação óssea em defeitos alveolares no modelo animal. Apesar de contrariar os preceitos experimentais atuais, um maior número de grupos controle comparativos para o compósito poderia enriquecer mais os

resultados estatísticos e, quem sabe, nos elucidar melhor sobre os efeitos osteogênicos do composto testado. É válido considerar, ainda, que o tamanho das partículas do biomaterial utilizado poderia ser testado, novamente, optando-se por partículas menores, minimizando-se assim, talvez, o fechamento parcial do epitélio em alguns animais e diminuindo, quem sabe, o tempo para reabsorção das mesmas.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nas condições experimentais deste estudo conclui-se que:

- a. Os compósitos utilizados (β TCP/PCL/PLGA/DOX/ β CD) se mostraram biocompatíveis e não citotóxicos, com células viáveis presentes e intimamente relacionadas às partículas recentes do material e sem a presença de reações de corpo estranho, nos diferentes tempos analisados;
- b. O modelo de defeito ósseo alveolar, pode ser considerado eficaz devido a simular com mais proximidade as condições ideais de esforços mastigatórios e presença de microbiota oral. Observa-se que mesmo com essas condições o grupo teste demonstrou comportamento satisfatório, sendo a resposta osteogênica compatível com o delineado pela literatura e discutido ao fim deste trabalho;
- c. Quando em relação ao infiltrado inflamatório presente, se comparado os diferentes grupos, nos tempos avaliados, esse se apresentou semelhante qualitativamente leve, inclusive para o grupo experimental, com DOX, que se mostrou com o um infiltrado inflamatório muito discretamente diminuído;
- d. A análise histomorfométrica, mostrou que a incorporação de DOX ao compósito melhorou/aumentou a área ósseo neoformado, aos 14 dias, quando comparado aos grupos controle. Verificou-se que aos 28 dias essa área se manteve estável, porém com trabéculas ósseas mais maduras e estruturadas, quando também comparada aos demais grupos;
- e. A imunomarcção das células osteoblásticas se mostrou menos presente para o grupo tratado com o compósito contendo DOX. Porém, quando comparados os tempos, para todos os grupos, observou-se um menor número de células marcadas por imuno-histoquímica para T2, quando comparado a T1.

- f. O compósito estudado, com a adição de DOX, se mostrou vantajoso e promissor para o uso clínico reabilitador, quando pensamos em manutenção da dimensão do rebordo alveolar e/ou reconstrução após perdas ósseas por diferentes motivos ou até mesmo para reabilitação com implantes osseointegráveis. É importante citar que a manutenção pós exodontia, apenas do coágulo sanguíneo, pode piorar o prognóstico, aumentando as taxas de reabsorção, por este, muitas vezes, não apresentar resistência mecânica que impeça, por exemplo, a reabsorção fisiológica de tábuas vestibulares pouco volumosas, como é o caso das maxilas anteriores, por exemplo.

REFERÊNCIAS

- 1 - FONTANA, E.; TRISI, P.; PIATTELLI, A. Freeze- dried dura mater for guided tissue regeneration in postextraction dental implants: A clinical and histologic study. **Journal of Periodontology.**, Chicago, v. 65, n. 7, p. 658- 665, July, 1994;
- 2 - SIMION, M. et al. Qualitative and quantitative comparative study on different filling materials used in bone tissue regeneration: a controlled clinical study. **International Journal of periodontics restorative dentistry**, Chicago, v. 14, p. 199-215, 1994.
- 3 - ALVIN, B. K. Y.; ONG, M.A. Principles and Implications of site preservation for alveolar ridge Development. **Singapore Dental Journal**, v. 26, n.1, p.15-20, Dec. 2004.
- 4 - PERRI DE CARVALHO, P. S.; LUPPINO, F.; MENDES, V. C. **Histofisiologia óssea e os biomateriais aplicados à implantodontia in Terapia Clínica Avançada em Implantodontia.** 1ed.São Paulo:Artes Médicas,2002.329p.cap.2,p.18-30.
- 5 - SCHROPP, L. et al. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. **International Journal Periodontics Restorative Dentistry**, v.23, n.4, p.313-323, 2003.
- 6 - DOUGLASS, G. L. Alveolar ridge preservation at tooth extraction. **Journal of the California Dental Association**, v.33, n.3, p.223-231, Mar. 2005.
- 7 - IRINAKIS, T.; TABESH, M. Preserving the socket dimensions with bone grafting in single sites: an esthetic surgical approach when planning delayed implant placement. **Journal of Oral Implantology**, v. 33, n.3, p.156-163, Oct. 2007.
- 8 - ARAÚJO, M.G.; LINDHE, J. Ridge alterations following tooth extraction with and without flap elevation: an experimental study in the dog. **Clinical Oral Implants Research**. v. 20, n. 6, p. 545–549, June 2009.
- 9 - LEGEROS, R. Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. **Chemical Reviews.**, v. 108, n. 11, p. 4742-4753, nov. 2008.
- 10 - ORÉFICE, R. L. **Biomateriais: Fundamentos e Aplicações.** Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. p. 59-250; 283-298; 479-506
- 11 – ALKAN, A. et al. Histomorphometric Evaluation of the effect of doxycycline on the healing of bone defects in experimental diabetes mellitus: a pilot study. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. 60:898-904, 2002.

12 - LANGER R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering (Review). **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920-6, 1993.

13 - IKADA, Y. et al. Challenges in tissue engineering. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 3, p. 589-601, 2006.

14 - TABATA, Y. et al. Biomaterial technology for tissue engineering applications. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 6, p. 311-324, 2006.

15 - FELLAH, B.H.; JOSSELIN, N. Inflammatory reaction in rats muscle after implantation of biphasic calcium phosphate micro particles. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n.2, p.287-294, Feb. 2007.

16 - BYUN J. H.; LEE, H. A. R.; KIM, T. H.; LEE, J. H.; OH, S.H.; Effect of porous polycaprolactone beads on bone regeneration: preliminary in vitro and in vivo studies. **Biomaterials Research**, doi:10.1186/2055-7124-18-18, 2014.

17 - ADERIBIGBE, B.; SADIKU, E.; JAYARAMUDU, J.; SINHA, R. S. Controlled dual release study of curcumin and a 4-aminoquinoline analog from gum acacia containing hydrogels. **Journal of Applied Polymer Science**, v.132, 2015.

18 - LEE J.S.; BAE, J.W.; JOUNG, Y.K.; LEE, S.J.; HAN, D.K.; PARK, K.D. Controlled dual release of basic fibroblast growth factor and indomethacin from heparin conjugated polymeric micelle. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 346, p. 57–63, 2008.

19 - LIMA, K.M.; JUNIOR, J. M. R. Poly-dl-lactide-co-glycolide microsphere as a controlled release antigen delivery system. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 32, p.171-180, 1999.

20 - FITCH, W. M. R. M.; BUSH, C. A.; BENDER, and N. J. COX. Long term trends in the evolution of H(3) HA1 human influenza type A. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v.94, p.7712– 7718, 1997.

21 – STEVENSON, S. Biology of bone grafts. **Orthopedic Clinics of North America Journal**. v. 30, n. 4, p. 543-551, 1999.

22 – URIST, M. R. Bone transplants and implants. **In: Urist MR**, ed. *Fundamental and clinical bone physiology*. Philadelphia: Lippincott, 331-368, 1980.

23 - HENCH, L. L. Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials**, v.19, n. 16, p. 1419-1423, 1998.

24 - CHAUDHARY, L. R.; AVIOLI, L.V. Dexamethasone regulates 1L-1 β and TNF- α -induced interleukin-8 production in human bone marrow stromal and osteoblast-like cells. **Calcified Tissue International**, v. 55, p. 16-20, 1994.

25 – DE LONG JR, W.G.; EINHORN, T.A.; KOVAL, K.; MCKEE, M.; SMITH, W.; SANDERS, R. Bone grafts and bone grafts substitutes in orthopedic trauma

surgery: A critical analysis. **The Journal of Bone and Joint Surgery American**, v. 89, p. 649-58, 2007.

26 – FINKEMEIER, C.G. Bone-graft substitutes **The Journal of Bone and Joint Surgery American**, v. 84, p. 454-64, 2002.

27 – JENSEN, T.; SCHOU, S; STAVROOULOS, A.; TERHEYDEN, H.; HOLMSTRUP, P. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bios-Oss mixed with autogenous bone as graft in animals: a systematic review. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v. 41, p. 114-120, 2012.

28 – BLOCK, M.S. Horizontal ridge augmentation using particulate bone. **Atlas of Oral and Maxillofacial Surgery and Clinics of North American**, v. 14, p. 27-38, 2006.

29 – DINOPOULOS, H.; DIMITRIOU, R.; GIANNOUDIS, P.V. Bone graft substitutes: What are the options? **The Surgeon**, v.10, p. 230-239, 2012.

30 – GIANNOUDIS, P.V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: an update. **Injury**, v. 36, p. 20-7, 2005.

31 – URIST, M. R. Bone formation by autoinduction. **Science**, v. 150, p. 893-899, 1965.

32 – YAO, J.; HO, A.M. Bone graft substitutes in the treatment of distal radius and upper limb injuries. **Journal of Operative Techniques in Orthopedics**, v. 19, p. 77-87, 2009.

33 – DIMITRIOU, R.; TSIRIDIS, E.; GIANNOUDIS P.V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. **Injury**, v. 36, p. 1392-404, 2005.

34 – BIELBY, R.; JONES, E.; MCGONAGLE, D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. **Injury**, v. 38, p. 26-32, 2007.

35 - FELLAH, B.H.; JOSSELIN, N. Inflammatory reaction in rats muscle after implantation of biphasic calcium phosphate micro particles. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n.2, p.287-294, Feb. 2007.

36 - SCHWARZ, F. et al. Guided bone regeneration at dehiscence-type defects using biphasic hydroxiapatite + beta tricalcium phosphate (Bone Ceramic®) or a collagen-coated natural bone mineral (BioOss Collagen®): an immunohistochemical study in dogs. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 36, n.12, p.1198-1206, Dec. 2007.

37 - CARMAGNOLA, D.; ADRIENS, P.; BERGLUNDH, T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss. **Clinical Oral Implants Research**, v.14, p.137-143, 2003.

38 - ARTZI, Z.; TAI, H.; DAYAN, D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part I: Histomorphometric evaluations at 9 months. **Journal of Periodontology**, v.71, p.1015-1023, 2000 .

39 - ARTZI, Z.; WEINREB, M.; GIVOL, N.; ROHRER, M D.; NEMCOVSKY, C. E.; PRASAD, H. S.; TAL, H. Biomaterial resorption rate and healing site morphology inorganic bovine bone and β -tricalcim phosphate in the canine: a 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, v.19, n.3, p.357-368, 2004.

40 - NEVINS, M.; CAMELO, M.; dePAOLI, S.; FRIEDLAND, B.; SCHENK, R. K.; PARMA-BENFENATI, S.; SIMION, M.; TINTI, C.; WAGENBERG, B. A study of the fate of the buccal wall of extraction sockets of teeth with prominent roots. **The international journal of Periodontics e Restorative Dentistry**, v. 26, p.19-26, 2006.

41 – COOK, S. D.; RUEGER, D.C. Osteogenic protein-1:biology and applications. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n.324, p.29-38, march,1996.

42 – SANTOS, L. A. Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área médico-odontológica.Tese Doutorado.Universidade Estadual de Campinas, 2002.

43 - BUCKWALTER, J.A.; GLIMCHER, M.J.; COOPER, R.R.; RECKER, R. Bone Biology I: structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization (Review). **Instructional Course Lectures**, v. 45, p. 371-86, 1996.

44 - SEEMAN E. Bone quality: the material and structural basis of bone strength. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 26, p. 1-8, 2008.

45 -TENCATE, A. R. Oral histology: Development, Structure, and Function. **Mosby Inc**, 1994.

46 – TURNER, C.H.; ROBLING, A. G.; DUNCAN, R. L. Do bone cells behave like a neuronal network? **Calcified Tissue International**, v. 70, p. 435-442, 2002.

47 - BRACHVOGE, B. et al. Annexin A5 is not essential for skeletal development. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 8, p. 2907-13, 2003.

48 – GEORGES, S.; RUIZ VELASCO, C.; TRICHET, V.; FORTUN, Y.; HEYMANN, D.; PADRINES, M. Proteases and bone remodeling. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 20, n.1, p. 29-41, 2009.

49 – LANGER, R. Tissue engineering (Review). **Molecular Therapy Journal**, v. 1, n. 1, p. 12-15. 2000.

50 - MARINHO, R. M. Climatério. Rio de Janeiro: Medsi Editora Médica e Científica, 1995.

- 51 - MUNDY, G. R. Inflammatory mediators and the destruction of bone. **Journal of Periodontal Research**, v. 26, p. 213-7, 1991.
- 52 - PINHEIRO, A. L. B.; LIMEIRA JUNIOR, F. A., GERBI, M. E. M. Effect of 830 nm laser light on the repair of bone defects grafts with inorganic bovine bone an calcified cortical osseous membrane. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 21, p. 383-388, 2003.
- 53 - CANCEDDA, R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. **Matrix Biology Journal**, v. 22, p. 81-91, 2003.
- 54 - BOYAN, B. D. et al. Bone and cartilage tissue engineering. **Clinics in Plastic Surgery Journal**, v. 26, n.1, p. 81-91, 2003.
- 55 - VACANTI, J. P. et al. Beyond Transplantation. **The Archives of Surgery**, v. 123, p. 545-549, 1998.
- 56 - ARINZEH, T. L. et al. A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. **Biomaterials**. v. 26, n. 17, p. 3631-8, 2005.
- 57 - UEMURA, T. et al. Transplantation of cultured bone cells using combinations of scaffolds and culture techniques. **Biomaterials**, v. 24, p. 2277-86, 2003.
- 58 - HOLMES, R. E. Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in metaphyseal defects: a histometric study. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 68A, n. 4, p. 904-911, 1986.
- 59 - SICCA, C. M. et al. A new degradable controlled release device for treatment of periodontal disease: in vitro release study. **Journal of Periodontology**, v. 61, n. 7, p. 393-8, 1990.
- 60 - BARBANTI, S. H. et al. Polímeros reabsorvíveis na Engenharia de Tecidos - artigo de revisão. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.
- 61 - HUTMACHER, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. **Biomaterials**, n. 21, v. 24, p. 2529-43, 2000.
- 62 - PEREIRA, M. M. et al. Cytotoxicity evaluation of bioactive glass-polyvinyl alcohol hybrid foams prepared by the sol-gel method. **Key Engineering Materials**, v. 284, p. 589-592, 2005.
- 63 - SIKAVITSAS, V. I.; TEMENOF, J. S.; MIKOS, A. G. Biomaterials and bone mechanotransduction. **Biomaterials**, v. 22, p. 2581-2593, 2001.
- 64 - GALETTI, P. M. et al. Clinical applications of biomaterials. **NIH Consensus Statement**, v. 4, n. 5, p. 1-19, nov. 1982.

- 65 - MEDLICOTT, N. J. et al. Delivery systems for the administration of drugs to the periodontal pocket. **Advanced Drug Delivery Reviews.**, v. 13, p. 181-203, 1994.
- 66 - OLIVEIRA, P. T.; NANCI, A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. **Biomaterials**, v. 25, n. 3, p. 403-413, 2004.
- 67 – DIENER, A. Control of focal adhesion dynamics by material surface characteristics. **Biomaterials**, v. 26, n. 4, p. 383-392, 2005.
- 68 - TENGVALL, P.; LUNDSTRÖM I. Physico-chemical considerations of titanium as a biomaterial. **Clinical Materials**, v. 9, n. 2, p. 115-134, 1992.
- 69 - PRADO DA SILVA, M. H. Recobrimento de titânio com hidroxiapatita: desenvolvimento de processo de deposição eletrolítica e caracterização biológica in vitro. Tese (Doutorado) - COPPE/UFRJ, 1999.
- 70 - FELLAH, B.H.; JOSSELIN, N. Inflammatory reaction in rats muscle after implantation of biphasic calcium phosphate micro particles. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n.2, p.287-294, Feb. 2007.
- 71 - MANJUBALA, I. et al. Bioactivity and osseointegration study of calcium phosphate ceramic of different chemical composition. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 63, n.2, p.200-08, Feb. 2002.
- 72 - DACULSI, G. et al. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**; v.14, n.3 p.195-200, Mar.2003.
- 73 - TRISI, P. et al. Histologic effect of pure β -phase Beta-Tricalcium phosphate on bone regeneration in human artificial jawbone defects. **International Journal Periodontics Restorative Dentistry**, v.23, p.69-77,2003.
- 74 - THOMPSON, D.M.; ROHER, M.D.; PRASAD, H.S. Comparison of bone grafting materials in human extraction sockets: Clinical, histologic, and histomorphometric evaluations. **Implant Dentistry**, v.15, p.89-94, 2006.
- 75 - ARTZI, Z.; WEINREB, M ; GIVOL, N ; ROHRER, M D ; NEMCOVSKY, C E ; PRASAD, H S ; TAL, H. Biomaterial resorption rate and healing site morphology inorganic bovine bone and β -tricalcim phosphate in the canine: a 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis. **International Journal of Oral Maxillofacial Implants**, v.19, n.3, p.357-368, 2004.
- 76 - BALLA, R.; LOMONACO, C. J.; SKRIBNER, J.; LIN, L. M. Histological study of furcation perforations treated with tricalcium phosphate, hydroxylapatite, amalgam, and life. **Journal of Endodontics**, v.17, p.234-238, 1991.

77 - ARTZI, Z.; TAI, H.; DAYAN, D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part I: Histomorphometric evaluations at 9 months. **Journal of Periodontology**. v.71, p.1015-1023, 2000.

78 - CAMARGO, P.M. et al. Influence of bioactive glass on changes in alveolar process dimensions after exodontia. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Oral Endodontics**, v.90, p.581-586, 2000.

79 - CARMAGNOLA, D.; ADRIENS, P.; BERGLUNDH, T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss. **Clinical Oral Implants Research**, v.14, p.137-143, 2003.

80 - DACULSI, G. et al. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**; v.14, n.3 p.195-200, Mar.2003.

81 - FROUM, S. et al. Extraction sockets and implantation of hydroxyapatites with membrane barriers. A histologic study. **Implant Dentistry**, v.13, p.153-163, 2004.

82 - FROUM, S. et al. Histological comparison of healing extraction sockets implanted with bioactive glass or demineralized freeze-dried bone allograft: A pilot study. **Journal of Periodontology**, v.73, p.94-102, 2002.

83 - IASELLA, J.M. et al. Ridge preservation with freeze-dried bone allograft and a collagen membrane compared to extraction alone for implant site development: A clinical and histologic study in humans. **Journal of Periodontology**, v.74, p.990-999, 2003.

84 - LEGEROS, R.Z. et al. Biophasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.14, n.3, p.201-09, Mar. 2003.

85 - NORTON, M.N. et al. Efficacy of bovine bone mineral for alveolar augmentation: a human histologic study. **Clinical Oral Implant Research**, v.14, p.775-783, 2003.

86 - ORLY, I. et al. Chemical changes in hydroxylapatite biomaterial under in vivo and in vitro biological conditions. **Calcified Tissue International**, v.45, p.20-26, 1989.

87 - SERINO, G. et al. Ridge preservation following tooth extraction using a polylactide and polyglycolide sponge as space filler: a clinical and histological study in humans. **Clinical Oral Implants Research**, v.14, p.651-658, 2003.

88 - ZUBILLAGA, G. et al. Changes in alveolar bone height and width following postextraction ridge augmentation using a fixed absorbable membrane and demineralized freeze-dried bone osteoinductive graft. **Journal of Periodontology**, v.74, p.965-975, 2003.

89 - RIPAMONTI U; DUNEAS N. Tissue engineering of bone by osteoinductive biomaterials. **Materials Research Society Bulletin**, v. 21, p. 36-39, 1996.

90 - COOMBES, A. G. A. et al. Precipitation casting of polycaprolactone for applications in tissue engineering and drug delivery. **Biomaterials**, v. 25, n. 2, p. 315-325, 2004.

91 - CIAPETTI, G. et al. Osteoblast growth and function in porous poly ϵ -caprolactone matrices for bone repair: a preliminary study. **Biomaterials**, v. 24, n. 21, p. 3815-3824, 2003.

92 - DAI, N. T. et al. Human single-donor composite skin substitutes based on collagen and polycaprolactone copolymer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 386, n. 1, p. 21-25, 2009.

93 - ROSA, D. S. et al. Evaluation of PHB, PHB-V and PCL biodegradation in composted soil. **Polímeros**, v. 12, n. 4, p. 311-317. 2002.

94 - SINHA, V. R. et al. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 1, p. 1-23, 2004.

95 - SHANTZ, J. T.; CHIM, H.; WHITEMAN, M. Cell Guidance in Tissue Engineering: SDF-1 Mediates Sites-Directed Homing of Mesenchymal Stem cells within Three-Dimensional Polycaprolactone Composites. **Tissue Engineering**, v. 13, p. 2615-2624, 2007.

96 - TADDEI, P. et al. In vitro mineralization of bioresorbable poly (ϵ -caprolactone)/apatite composites for bone tissue engineering: a vibrational and thermal investigation. **Journal of Molecular Structure**, v. 744, n. 47, p. 135-143, 2005.

97 - JALIL, R.; NIXON, J. R. Biodegradable poly(lactid acid) and poly(lactide-co-glycolid) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties. **Journal of Microencapsulation**, v. 7, n. 3, p.297-325, 1990.

98 - LIMA, K. M.; JUNIOR, J. M. R. Poly-dl-lactide-co-glycolide microsphere as a controlled release antigen delivery system. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**; v. 32, p.171-180, 1999.

99 - LAO, L. L.; VENKATRAMAN, S. S.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from biodegradable polymer blends. **European Journal of Pharmaceutisc and Biopharmaceutics**, v. 70, p.796-803, 2008.

100 - LUCCHESI, C.; BARBANTI, S. H.; JOAZEIRO, P. P.; DUEK, E. A. R. Cell culture on PCL-PLGA blends. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 115, n. 5 p. 2609-2615, 2010.

101 - CURRAN, J. M.; TANG, Z; HUNT, J. A. PLGA doping of PCL affects the plastic potential of human mesenchymal stem cells, both in the presence and

absence of biological stimuli. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, p. 1-12, 2012.

102 - TRAJANO, V. C .C. **Avaliação in vitro da atividade osteogênica da doxiciclina associada a compósitos de polímeros biodegradáveis em matriz de biocerâmica**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia, 2012.

103 - BLACK J. Composition and structure of bone. In: NETTER, F. H. The collection of medical illustrations: musculoskeletal system. New Jersey. 1991. p.171- 172.

104 - CIAPETTI, G. et al. Osteoblast growth and function in porous poly ϵ -caprolactone matrices for bone repair: a preliminary study. **Biomaterials**, v. 24, n. 21, p. 3815-3824, 2003.

105 - KIM, H. W.; KNOWLES, J. C.; KIM, H. E. Hydroxyapatite/ poly (ϵ -caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone compósito for drug delivery. **Biomaterials**, v. 25, n. 7-8, p. 1279-1287, 2004.

106 - PATARO, A. L. et al. Polymer: bioceramic composites optimization by tetracycline addition. **International Journal of Pharmaceutics.**, v. 336, n. 1, p. 75-81, 2007.

107 - REIS, R. L. et al. Materials in particulate form for tissue engineering: Applications in bone. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 1, p. 97-109, 2007.

108 - GOLUB, R. T. et al. A non-antimicrobial tetracycline inhibits gingival matrix metalloproteinases and bone loss in Porphyromonas gingivalis-induced periodontitis in rats. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 732, p. 96-111, 1994

109 - BEZERRA, M. M. et al. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 5, p. 613-616, mar. 2002

110 - WILLIAMS, S. et al. Minocycline prevents the decrease in bone mineral density and trabecular bone in ovariectomized aged rats. **Bone**, v. 19, p. 637-644, 1996

111 - TOLEDO, L. C. et al. Book of abstract of 4th international conference on science and technology of composites materials. 2007

112 - DASHTI, A. et al., In vitro antibacterial efficacy of tetracycline hydrochloride adsorbed onto Bio-Oss® bone graft, **Journal of Biomedical Materials Research Part B** v. 93, n. 2, p. 394-400, 2010.

113 - LEE, H. M. et al. Subantimicrobial dose doxycycline efficacy as a matrix metalloproteinase inhibitor in chronic periodontitis patients is enhanced when

combined with a non-steroidal anti-inflammatory drug. **Journal of Periodontology**, v.75, n. 3, p. 453-63, 2004.

114 – KINUGAWA, S. et al. Tetracyclines convert the osteoclastic differentiation pathway of progenitor cells to produce dendritic cell-like cells. **The Journal of Immunology** v. 188, p. 1772-1781, 2012.

115 – UDAGAWA, N.; KOIDE, M.; NAKAMURA, M.; TAKAHASHI, N. Minocycline to be used a potential anti bone resorption agents due to the suppression of osteoclastic bone resorption. **Journal of Oral Biosciences**, v. 55, p. 16-22, 2013.

116 – YAGAN, A.; KESIM, S.; LIMAN, N. Effect of low-dose doxycycline on serum oxidative status, gingival antioxidant levels, and alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **Journal of Periodontology**, v. 85, p. 478-489, 2014.

117 – BORGMAN, R. J. Biodisponibilidade, dosagens e novas formas de apresentação. Craig RC, Stitzel RE. Farmacologia Moderna 4ª Ed. São Paulo: Roca Livraria Ltda; 1986. Cap.6.

118 - ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. Ansel's pharmaceutical dosage forms. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, 2007.

119 - CORTÉS, M. E. Estudo dos compostos de inclusão tipo hospedeiro convidado entre a clorexidina e a β -ciclodextrina: Avaliação in vitro. Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

120 - FILHO, N. A., OLIVEIRA, A. G. Sistemas de micro/nanoencapsulamento de fármacos. Disponível em: <<http://www.farmabrasil.hpg.ig.com.br/fisqui9.htm>> Acesso em: julho de 2011.

121 - GENNARO, A. R. Remington: the science and practice of pharmacy. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, 2007.

122 - FARREL, S.; HESKETH, R. P. An introduction to drug delivery for Chemical Engineers. Disponível em: <<http://engineering.eng.rowan.edu/~hesketh/hesketh/cee%20drug%20delivery.pdf>> Companies involved in polymeric drug delivery.htm> Acesso em: julho de 2011.

123 - GHANDEHARI, H. Phar 535: controlled drug release. Disponível em: <[https://rxsecure.umaryland.edu/courses/PHAR535/lecture_handouts/Intro_CR/Introductio n%20to%20Controlled%20Drug%20Delivery.pdf](https://rxsecure.umaryland.edu/courses/PHAR535/lecture_handouts/Intro_CR/Introductio%20to%20Controlled%20Drug%20Delivery.pdf)>. Acesso em julho de 2011.

124 - HIRAYAMA, F. et al. Yclodextrin conjugate based controlled release system: repeated and prolonged releases of ketoprofen after oral administration in rats. **Journal of Controlled Release**, v. 82, p. 407-16, 2002.

125 - JENNING, V.; SCHAFER-KORTING, M.; GOHLA, S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. **Journal of Controlled Release**, v. 66, p. 115-126, 2000.

126 – STRUB, M. et al. Maxillary bone regeneration based on nanoservoirs functionalized e-polycaprolactone biomembranes in a mouse model of jaw bone lesion. **BioMed Research International**. v. 18, DOI: 10.1155/2018/7380389, 2018

127 - GRIFFIN, M. O. et al. Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 299, n. 3, p. C539-C548, 2010.

128 - GU, Y. et al. Doxycycline inhibits mononuclear cell-mediated connective tissue breakdown. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 218-225, 2010.

129 - FARHAD, S. Z. et al. The effect of adjunctive low-dose DOXycycline and licorice therapy on gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels in chronic periodontitis. **Dental Research Journal**, v. 10, n. 5, p. 624, 2013.

130 - KUDALKAR, M. D. et al. Effect of Azadirachta indica (Neem) and Aloe vera as compared to subantimicrobial dose DOXycycline on matrix metalloproteinases (MMP)-2 and MMP-9: An in-vitro study. **Ayu Journal**, v. 35, n. 1, p. 85, 2014.

131 - LOFTSSON, T.; MASSON, M. M. Cyclodextrins in topical drug formulations: Theory and practice. **The International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, p. 15-30, 2001.

132 - LANGER R. New methods of drugs delivery. **Science**, v. 249, p. 1527-33, 1990.

133 - LANGER, R.; PEPPAS, N.A. Advances in Biomaterials, Drug Delivery, and Bionanotechnology. **AIChE Journal**., v. 49, n. 12, p. 2990-3006, 2003.

134 - MASSON, M. et al. Stabilization of ionic drugs through complexation with non ionic and ionic cyclodextrins. **The International Journal of Pharmaceutics**, v. 164, n. 1-2, p. 45-55, 1998.

135 - MIRTH, D. B. Controlled-release therapeutic systems:technology applicable to the treatment of oral disease. **Advances in Dental Research**, v. 1, n. 1, p. 109-18, 1987.

136 - PEPPE, N. A. In Hydrogels in Medicine and Pharmacy. CRC Press, Inc.: Boca Raton, 1987.

137 - PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. **Revista Brasileira de Ciencias Farmacêuticas**, v. 43, p. 491, 2007.

- 138 - QIU, L. Y.; BAE, Y. H. Polymer architecture and drug delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 23, p.1-30, 2006.
- 139 - RICCI, E. J.; MARCHETTI, J. M. Zinc(II) phthalocyanine loaded PLGA nanoparticles for photodynamic therapy use. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 310, p.187-195, 2006.
- 140 - SATO, M. E. O. et al. Permeação cutânea in vitro do ácido kójico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 195-203, 2007.
- 141 - SZEJTLI J. Cyclodextrin Technology. Netherland:Kluwer, p. 1-170, 1988.
- 142 - UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE T. Cyclodextrin drug carrier systems. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 2045-76, 1998.
- 143 - YUE, I. C. et al. A novel polymeric delivery device for the treatment of periodontal disease. **Biomaterials**, v. 25, p. 3743-50, 2004.
- 144 - KIM, H.W.; KNOWLES, J.C.; KIM, H.E. Hydroxyapatite/poly (ϵ -caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery. **Biomaterials**. v. 25, n.7-8, p.1279-1287, 2004.
- 145 - GOLLWITZER, H. et al. Antibacterial poly(d,l-lactic acid) coating of medical implants using a biodegradable drug delivery technology. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**., v. 51, p. 585-591, 2003.
- 146 – CORTÉS, M. E. et. al. The chlorhexidine:beta-ciclodextrin inclusion compound: preparation, characterization and microbiological evaluation. **Journal of Inclusion Phenomena Macrocyclic Chemistry**, v. 40, p. 297- 302, 2001.
- 147 – RAMAMURTHY, N. S.; ZEBROWSKI, E. J.; GOLUB, L. M. Insulin reversal of alloxandibabetes induced changes in gingival collagen metabolism of the rat. **Journal of Periodontology Research**, v. 9, p.199–206, 1974.
- 148 - PLEWIG, G.; SCHOPF, E. Anti-inflammatory effects of antimicrobial agents: An in vivo study. **Journal of Investigative Dermatology**., v. 65, p.532–536, 1975.
- 149 - GOLUB, L. M. et al. A non-antimicrobial tetracycline inhibits gingival matrix metalloproteinases and bone loss in Porphyromonas gingivalisinduced periodontitis in rats. **Annals of the New York Academy Sciences**., v. 732, p.96–111, 1994.
- 150 - GOLUB, L. M. et al. Subantimicrobial-dose doxycycline modulates gingival crevicular fluid biomarkers of periodontitis in postmenopausal osteopenic women. **Journal of Periodontology**., v. 79, p.1409–1418, 2008.
- 151 - BETTANY, J. T. et al. Tetracyclines induce apoptosis in osteoclasts. **Bone**. v. 27, p.75–80, 2000.

152 - BEZERRA, M. M. et al. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. **Brazilian Journal of Medicine and Biology Research.**, v.35, p. 613–616, 2002.

153 - GUIMARÃES, Y.. L. Arginina como imunomodulador da resposta inflamatória Pulmonar em camundongos com peritonite induzida. 2017. 61f. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Faculdade de Medicina , UFMG, Belo Horizonte, 2017.

154 - KUNERT-KEIL, C.; SCHOLZ, F.; GEDRANGE, T.; GREDES, T. Comparative study of biphasic calcium phosphate with beta-tricalcium phosphate in rat cranial defects—A molecular-biological and histological study. **Annals of Anatomy**, v. 199, p. 79–84, 2015.

155 - LWANGA, S. K.; LEMESHOW, S. Sample Size Determination in Health Studies: A Practical Manual. Geneva: WHO, 1991.

156 - SHAHABOOEI, M. et al. A histomorphometric study of the effect of doxycycline and erythromycin on bone formation in dental alveolar socket of rat. **Advanced biomedical research**, v. 4, 2015.

157 - ABREU, F. A. M. et al. Effect of PDGF-BB, IGF-I growth factors and their combination carried by liposomes in tooth socket healing. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, n. 4, p. 299-307, 2013.

158 - BARÓ, M. A. et al. Alveolar wound healing in rats fed on high sucrose diet. **Acta Odontológica Latinoamericana**, v. 26, n. 2, p. 97-103, 2013

159 - GORUSTOVICH, A. A. et al. Histomorphometric study of alveolar bone healing in rats fed a boron-deficient diet. **The Anatomical Record**, v. 291, n. 4, p. 441-447, 2008.

160 - KUROSHIMA, S. et al. Intra-oral PTH administration promotes tooth extraction socket healing. **Journal of dental research**, v. 92, n. 6, p. 553-559, 2013.

161- VIEIRA, A. E. et al. Intramembranous Bone Healing Process Subsequent to Tooth Extraction in Mice: Micro-Computed Tomography, Histomorphometric and Molecular Characterization. **PloS One**, v.10, n. 5, 2015.

162 – GOMES, K. N. Avaliação do efeito da doxiciclina associada ou não à dexametasona no modelo de reparo ósseo alveolar em ratos. (Tese de doutorado) – Programa de pós graduação em farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

163 - BRIOT, K.; ROUX, C. Glucocorticoid-induced osteoporosis. **RMD Open**, v. 1, n. 1, p. e000014, 2015.

164 - CARDOSO, C. L. et al. Experimental dry socket: Microscopic and molecular evaluation of two treatment modalities. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 26, n. 5, p. 365-372, 2011.

165 - JAHANGIRI, L. et al. Current perspectives in residual ridge remodeling and its clinical implications: a review. **The Journal of prosthetic dentistry**, v. 80, n. 2, p. 224-237, 1998.

166 - KIM, D. et al. Changes in periodontium after extraction of a periodontally-involved tooth in rats. **Journal of periodontal & implant science**, v. 42, n. 5, p. 158-165, 2012.

167 - LIEBERMAN, J. R.; DALUISKI, A.; EINHORN, T. A. The role of growth factors in the repair of bone. **The Journal of bone & joint surgery**, v. 84, n. 6, p. 1032-1044, 2002.

168 - LIENAU, J. et al. Differential regulation of blood vessel formation between standard and delayed bone healing. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 27, n. 9, p. 1133-1140, 2009.

169 - MAAHS, M. P. et al. Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: a study in Wistar rats. **Head & neck**, v. 33, n. 2, p. 199-207, 2011.

170 - RUBIN et al. (Ed.). Rubin patologia: bases clinicopatológicas da medicina. Guanabara Koogan/GEN, 2006.

171 - SCHMIDT-BLEEK, K. et al. Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade. **Cell and tissue research**, v. 347, n. 3, p. 567-573, 2012.

172- YONEDA, T. et al. Application of Coenzyme Q10 for Accelerating Soft Tissue Wound Healing after Tooth Extraction in Rats. **Nutrients**, v. 6, n. 12, p. 5756-5769, 2014.

173 - BANIWAL, S. K. et al. Runx2 promotes both osteoblastogenesis and novel osteoclastogenic signals in ST2 mesenchymal progenitor cells. **Osteoporosis International**, v. 23, n. 4, p. 1399-1413, 2012.

174 - FRANCO, G. C. N et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 activity by doxycycline ameliorates RANK ligand-induced osteoclast differentiation in vitro and in vivo. **Experimental cell research**, v. 317, n. 10, p. 1454-1464, 2011.

175 - MOUTSATSOS, I. K. et al. Exogenously regulated stem cell-mediated gene therapy for bone regeneration. **Molecular Therapy**, v. 3, n. 4, p. 449-461, 2001.

176 – GOMES, K. N. et al. Doxycycline induces bone repair and changes in Wnt signalling. **International Journal of Oral Science**, v. 9, p. 158-166, 2017.

177 – LIMIRIO, P. H. J. O. et al. The effect of local delivery DOX and Alendronate on bone repair. **AAPS PharmSciTech**, DOI: 10.1208/s12249-015-0411-0, 2015.

178 – LUCATELI, R. L. et al. DOX and Autogenous Bone in Repair of Critical-Size Defects. **Implant Dentistry**, v. 27, n. 4, p. 1-6, 2018.

179 – HWANG, K. et al. Comparative efficacies of Collagen-Based 3D printed PCL/PLGA/B-TCP composite block bone grafts and biphasic calcium Phosphate bone substitute for bone regeneration. **Materials**, doi:10.3390/ma10040421, 2017.

180 – GOMES, P. S.; FERNANDES, M. H. Effect of therapeutic levels of doxycycline and minocycline in the proliferation and differentiation of human bone marrow osteoblastic cells. **Archives of Oral Biology**, v. 52, p. 251-259, 2007.

181 – PARK, J. B. Low dose of doxycycline promotes early differentiation of preosteoblasts by partially regulating the expression of estrogen receptors. **Journal of Surgical Research**, v. 178, p. 737-742, 2012.

182 – HIEP, N. T. et al. Fabrication of PCL/PLGA-BCP porous scaffold for bone tissue engineering applications. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, DOI:10.1080/09205063.2017.1311821, 2017.

183 – LEE, J. Y. et al. Bone-Healing Capacity of PCL/PLGA/Duck Beak Scaffold in critical bone defects in a rabbit model. **Biomed Research International**, DOI: 10.1155/2016/2136215, 2016.

184 – ELGALI, I. et al. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. **European Journal of Oral Sciences**. 125: 315-337, 2017.

185 – GENTILE, P. et al. An overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. **International Journal of Molecular Sciences**. 15, 3640-3659, 2014 doi:10.3390/ijms15033640

186 – MONDAL, D.; GRIFFITH, M.; VENKATRAMAN, S. S. Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: current scenario and challenges. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**. v. 65, n. 5, p. 255-265, 2016.

187 – SHIM, J. et al. Fabrication of blended polycaprolactone/poly(lactic-co-glycolic acid)/ β -tricalcium phosphate thin membrane using solid freeform fabrication technology for guided bone regeneration. **Tissue Engineering: Part A**. v.19, n.3/4, 2013.

188 – LANAO, R. P. F. et al. Physicochemical Properties and Applications of Poly(lactic-co-glycolic acid) for use in bone regeneration. **Tissue Engineering: Part B**. v. 19, n. 4, 2013.

189 – QIAO, C. et al. Sustained release poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres of bone morphogenetic protein 2 plasmid/calcium phosphate to

promote in vitro bone formation and in vivo ectopic osteogenesis. **American Journal of Translational Research**. v. 7, n. 12, p. 2561-2572, 2015.

190 – MOURIÑO, V.; BOCCACCINI, A. R. Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds. **Journal of the Royal Society Interface**. v. 7, p. 209-227, 2009.

192 - ALENEZI, A. et. al. Controlled release of clarithromycin from PLGA microspheres enhances bone regeneration in rabbit calvaria defects, **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**. v.1, n.8, 2017.

193 – GOMES, N. R. et al. Comparison between fractal analysis and radiopacity evaluation as a tool for studying repair of an osseous defect. In an animal mode using biomaterials. **Dentomaxillofacial Radiology** (48 – 20180466), 2019.

194 – NAGHSH, N. et al. Evaluation of the effects of two diferente bone resorption inhibitors on osteoclast numbers and ativity: an animal study. **Dental Research Journal**, IP: 186.242.234.244], 2018.

195 – ELIAZ, N.; METOKI, N. Calcium Phosphate Bioceramics: a review of their history, structure, properties, coating Technologies and biomaterial applications. **Materials**, doi:10.3390/ma10040334, 2017.

196 – RAMBHIA, K. J.; MA, P. X. Controlled Drug Release for Tissue Engineering. **Journal of Control Release**, doi:10.1016/j.jconrel.2015.08.049, 2016

197 – SHI, Y. et al. β -TCP scaffold coated with PCL as biodegradable materials for dental applications. **Ceramics International**, DOI:10.1016/j.ceramint.2018.05.142, 2018.

198 – LEHMAN, L. F. C. et al. Bioactive glass containing 90% SiO₂ in hard tissue engineering: An in vitro and in vivo characterization study. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, DOI: 10.1002/term.2919, 2019

199 – TELLES DE SOUZA, T. P. et al. Polyurethane derived from Ricinus Communis as graft for bone defect treatments. **Polímeros**, v.28, n.3, p.246-255, 2018.

200 – DAS, A. et al. Delivery of Bioactive Lipids from Composite MicrogelMicrosphere Injectable Scaffolds Enhances Stem Cell Recruitment and Skeletal Repair. **PLOS One**, v.9, n.7, p. 1-11, 2014.

ANEXOS

Anexo I

Tabela 01 – Descrição dos dados e média simples por grupo, separados por tempo (T1 e T2)

Análise com 14 dias – T1:

Grupo/Rato Grupo	Ossó Neofornado - área μm^2	Percentual	Média
G1/R I	99423.5	50%	
G1/R II	93909.9	46%	
G1/ R III	67318.3	34%	
G1/ R IV	27445.5	14%	36%
G2/R I	63643.2	32%	
G2/R II	101155.0	50%	
G2/ R III	57775.1	29%	
G2/ R IV	35370.1	17%	
G2/ R V	55956.5	28%	
G2/ R VI	78149.6	39%	32.5%
G3/R I	104477.2	52%	
G3/ R II	21669.1	11%	
G3/R III	64973.7	33%	
G3/R IV	67766.2	34%	
G3/ R V	77534.9	38%	
G3/ R VI	29154.5	15%	30.5%
G4/R I	17384.2	9%	
G4/R II	117468.6	58%	
G4/R III	109493.1	55%	

G4/R IV	79237.8	40%	
G4/R V	120689.2	61%	
G4/R VI	102123.4	51%	47%

Análise com 28 dias – T2:

Grupo/Rato Grupo	Osso Neoformado - área μm^2	Percentual	Média
G1/R I	200035.6	73%	
G1/R II	119387.9	60%	
G1/R III	161471.7	78%	
G1/R IV	180144.8	90%	73.25%
G2/R I	178150.9	78%	
G2/R II	51982.0	26%	
G2/R III	10439.0	5%	
G2/R IV	26739.7	13%	
G2/R V	173692.4	86%	
G2/R VI	94479.8	47%	42,5%
G3/R I	157555.9	78%	
G3/R II	99790.3	49%	
G3/R III	108889.9	54%	
G3/R IV	79107.3	39%	
G3/R V	81913.9	41%	52,2%
G4/R I	89013.6	44%	
G4/R II	16345.3	8%	
G4/R III	126546.8	64%	
G4/R IV	127689.8	65%	
G4/R V	61016.0	30%	

G4/R VI

135247.9

68%

47%

Anexo II

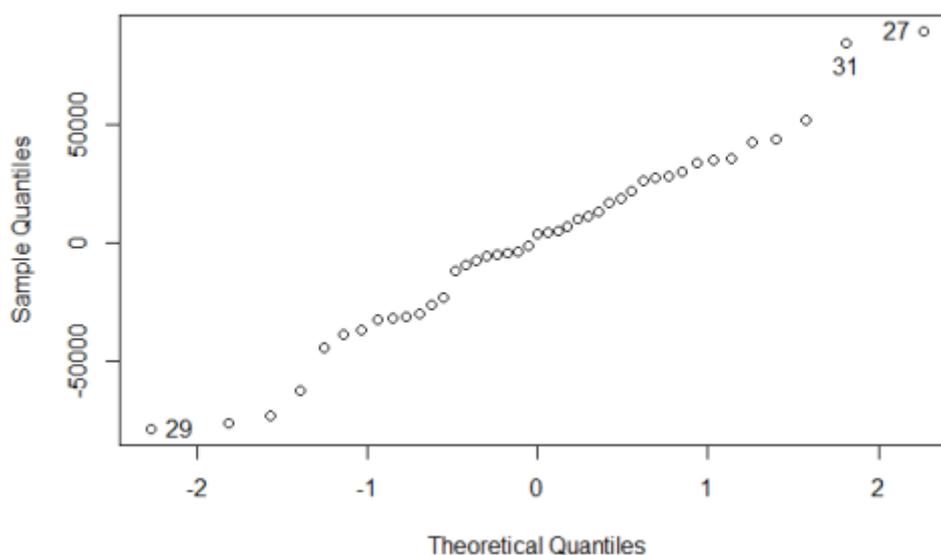


Gráfico 01 – Modelo QQ, indicando distribuição normal da amostra, evidenciando a presença de outliers.

Anexo III

Tabela 02 – Descrição dos dados, média, desvio padrão, mínimo e máximo, separados por tempo (t1 e t2), de cada grupo experimental.

Tratamento	Média Tempo (μm^2)		DP Tempo (μm^2)		Mínimo (μm^2)		Máximo (μm^2)	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
Coágulo	72.024,3	151.851,9	32.858,9	25.668,6	27.445,5	119.387,9	99.423,5	180.144,8
β TCP	65.341,6	89.347,3	22.330,0	73.042,2	35.370,1	10.439,0	101.155,0	178.750,9
β TCP/PCL/PLGA	60.929,3	105.450,5	30.939,5	31.649,4	21.669,1	79.107,3	104.477,2	157.555,9
β TCP/PCL/PLGA/DOX	91.066,1	92.643,2	39.001,0	46.963,2	17.384,2	16.345,3	120.689,2	135.247,9

A Tabela 03 mostra os resultados da análise de variância. Os resultados indicam que não há diferença entre as médias dos tratamentos ($p > 0,05$). Entretanto, a média obtida no período de 14 dias foi diferente da média obtida no período de 28 dias ($p < 0,05$). Nenhuma interação foi observada entre tratamento e tempo ($p > 0,05$).

Tabela 03 – Análise de Variância considerando tratamentos entre si, tempos entre si e tratamento X tempo.

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Soma de Quad. Média	Estatística F	P-valor
Tratamento	3	$6,6 \cdot 10^9$	$2,2 \cdot 10^9$	1,248	0,307
Tempo	1	$1,2 \cdot 10^{10}$	$1,2 \cdot 10^{10}$	6,759	0,014
Tratamento*Tempo	3	$7,9 \cdot 10^9$	$2,6 \cdot 10^9$	1,501	0,231
Resíduos	35	$6,2 \cdot 10^9$	$1,8 \cdot 10^9$		

Tabela 04 – Comparação dos tratamentos fixando os tempos

Comparação dos tratamentos fixando os tempos				
Tempo	Contraste	Estimativa	Estatística T	P-valor
T1	Coágulo - β TCP	6.683	0,303	1,000
T1	Coágulo - β TCP/PCL/PLGA	11.095	0,502	1,000
T1	Coágulo - β TCP/PCL/PLGA/DOX	-19.042	-0,862	1,000
T1	β TCP - β TCP/PCL/PLGA	4.412	0,223	1,000
T1	β TCP - β TCP/PCL/PLGA/DOX	-25.724	-1,302	1,000
T1	β TCP/PCL/PLGA - β TCP/PCL/PLGA/DOX	-30.137	-1,525	0,822
T2	Coágulo - β TCP	94.118	3,601	0,006
T2	Coágulo - β TCP/PCL/PLGA	46.401	2,021	0,310
T2	Coágulo - β TCP/PCL/PLGA/DOX	59.209	2,680	0,069
T2	β TCP - β TCP/PCL/PLGA	-47.717	-1,909	0,391
T2	β TCP - β TCP/PCL/PLGA/DOX	-34.909	-1,443	0,953
T2	β TCP/PCL/PLGA - β TCP/PCL/PLGA/DOX	12.807	0,618	1,000

Tabela 05 – Comparação dos tempos, fixando os tratamentos

Comparação dos tempos fixando os tratamentos				
Tratamento	Contraste	Estimativa	Estatística T	P-valor
Coágulo	T1 - T2	-79.828	-3,299	0,002
β TCP	T1 - T2	7.608	0,314	0,755
β TCP/PCL/PLGA	T1 - T2	-44.521	-2,148	0,039
β TCP/PCL/PLGA/DOX	T1 - T2	-1.577	-0,080	0,936