

**UNIVERSIDADE PAULISTA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**EFEITO DE UM BIOMATERIAL SINTÉTICO EM FORMA  
DE PASTA, NA REGENERAÇÃO ÓSSEA DE DEFEITOS  
CRÍTICOS DE CALVÁRIA DE RATOS:  
ANÁLISE HISTOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

**MATHEUS UZAI**

**São Paulo**

**2021**

**UNIVERSIDADE PAULISTA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**EFEITO DE UM BIOMATERIAL SINTÉTICO EM FORMA  
DE PASTA, NA REGENERAÇÃO ÓSSEA DE DEFEITOS  
CRÍTICOS DE CALVÁRIA DE RATOS:  
ANÁLISE HISTOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Zafallon Casati

**MATHEUS UZAI**

**São Paulo**

**2021**

Uzai, Matheus.

Efeito de um biomaterial sintético em forma de pasta na regeneração óssea de defeitos críticos de calvária de ratos: análise histológica e histomorfométrica / Matheus Uzai. - 2021.

18 f. : il. color.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, São Paulo, 2021.

Área de concentração: Clínica Odontológica.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Zafallon Casati.

1. Defeito crítico. 2. Biomaterial. 3. Polímero. I. Casati, Márcio Zafallon (orientador). II. Título.

**MATHEUS UZAI**

**EFEITO DE UM BIOMATERIAL SINTÉTICO EM FORMA  
DE PASTA, NA REGENERAÇÃO ÓSSEA DE DEFEITOS  
CRÍTICOS DE CALVÁRIA DE RATOS:  
ANÁLISE HISTOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

\_\_\_\_\_ - \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Prof. Dr. Marcio Zaffalon Casati  
Universidade Paulista – UNIP

\_\_\_\_\_ - \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mônica Grazieli Corrêa  
Universidade Paulista – UNIP

\_\_\_\_\_ - \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andreia Rodrigues Esposito Cabrera  
UNICAMP

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho à DEUS e aos meus pais Wanderley e Rosalina e minha amiga Barbara.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente aos meus pais, Wanderley e Rosalina, à minha irmã Talita, aos meus amigos, Bárbara, Gustavo, Jose Octavio pelo incentivo aos estudos, confiança no meu progresso, inspiração e apoio emocional.

À Universidade Paulista - UNIP, seu corpo docente e todos seus funcionários, que demonstram estar comprometidos com a qualidade e excelência do ensino, sempre com muita presteza.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pela bolsa concedida.

À equipe de Periodontia FOUNIP, especialmente a Professora Suzana Pimentel, por me incentivar a seguir este caminho e confiar no meu trabalho.

Aos meus amigos de Mestrado que compartilharam dos inúmeros desafios enfrentados, sempre com o espírito colaborativo.

À professora Professora Cristina Salomão pela ajuda e dedicação.

À Andrea Esposito que acompanhou todos os passos de nossa pesquisa.

À empresa Bioactive pelo fornecimento do material da pesquisa.

Um agradecimento especial ao meu orientador, Professor Doutor Marcio Zafalon Casati, pelos ensinamentos, oportunidades, incentivo, paciência e excelência profissional. Obrigado.

## RESUMO

Este estudo tem como objetivo determinar a eficácia de um biomaterial sintético, em forma de pasta, composto por copolímero de ácido lático/caprolactona (PLC) e polietilenoglicol (PEG) associados ao beta-tricálcio fosfato ( $\beta$ -TCP), hidroxiapatita (HA) e nano-. Para isso o material foi usado visando o reparo ósseo de defeitos de calvária de tamanho crítico em ratos. Trinta ratos foram distribuídos nos grupos: Teste (n=10): biomaterial sintético na forma de Pasta; Controle Positivo (n=10): Bio-Oss®; Controle Negativo (n=10): coágulo. Os animais foram submetidos à confecção de dois defeitos de calvária de tamanho crítico de 5mm de diâmetro. A eutanásia dos animais ocorreu após 30 dias do procedimento cirúrgico. Os defeitos de calvária foram processados para análise histológica. O tamanho do defeito foi mensurado e os dados analisados estatisticamente de acordo com o grau de normalidade (ANOVA ou Kruskal Wallis), em nível de significância de 5%. Os resultados indicaram que o grupo tratado com a pasta (teste) apresentou maior defeito remanescente quando comparados com o controle negativo (sem tratamento) e com o controle positivo (Bio-Oss®) ( $p < 0.05$ ). O controle positivo (Bio-Oss®) apresentou maior fechamento do defeito ósseo em comparação com o controle negativo (sem tratamento) ( $p < 0.05$ ). Conclui-se que o biomaterial testado não foi favorável ao reparo dos defeitos ósseos no período analisado.

Palavras-chave: Defeito crítico. Biomaterial. Polímero. Regeneração óssea.

## ABSTRACT

This study aims to determine the effectiveness of a synthetic biomaterial, in paste form, composed of a copolymer of lactic acid/caprolactone (PLC) and polyethylene glycol (PEG) associated with beta-tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP), hydroxyapatite (HA) and nano-. For this, the material was used for bone repair of critical-sized calvaria defects in rats. Thirty rats were divided into groups: Test (n=10): synthetic biomaterial in the form of paste; Positive Control (n=10): Bio-Oss®; Negative Control (n=10): clot. The animals were submitted to the confection of two calvaria defects of critical size of 5 mm in diameter. The animals were euthanized 30 days after the surgical procedure. Calvaria defects were processed for histological analysis. The size of the defect was measured and the data analyzed statistically according to the degree of normality (ANOVA or Kruskal Wallis), at a significance level of 5%. The results indicated that the group treated with the paste (test) had a greater remaining defect when compared with the negative control (no treatment) and with the positive control (Bio-Oss®) ( $p < 0.05$ ). The positive control (Bio-Oss®) showed greater closure of the bone defect compared to the negative control (no treatment) ( $p < 0.05$ ). It is concluded that the biomaterial tested was not favorable to the repair of bone defects in the analyzed period.

Key-words: Bone defect. Biomaterial. Polymer.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>14</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>15</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo organizado por células ósseas vivas dispostas em um meio biomineral que contém cerca de 30% de segmentos orgânicos e 70% de inorgânicos (Wang et al., 2019). Quase 90% desse segmento orgânico é colágeno, enquanto os 10% residuais são caracterizados por proteínas não colágenas, moléculas de proteoglicanos, lipídios, osteopontina e outras proteínas da matriz óssea, as quais desempenham papel vital na resistência mecânica e nas características metabólicas do tecido ósseo (Hu et al., 2019). Além dos meios ósseos mineralizados, as células deste tecido também são críticas para a função dos ossos. As principais células que regulam a renovação do esqueleto são os osteoblastos e osteoclastos, os quais encontram-se em equilíbrio nesse processo, por meio de fenômenos de reabsorção e neoformação óssea (Horowitz; Holtzclaw; Rosen, 2012).

### **Mecanismos de Reparo Ósseo**

O processo de reparo ou de regeneração do tecido ósseo é complexo e contempla três principais fases: inflamação, produção óssea e remodelação (Schindeler et al., 2008). A inflamação faz parte do início do processo, a partir da formação de coágulo no local a ser reparado (Sikavitsas; Temenoff; Mikos, 2001). A produção óssea é iniciada assim que o sangue coagulado é substituído por tecido fibroso e cartilagem – ou calo ósseo. À medida que o processo regenerativo se estende, o calo ósseo vai substituído por osso maduro e a remodelação óssea, o estágio final da cicatrização óssea, continua a acontecer por mais de alguns meses. Na regeneração, a arquitetura e a função dos tecidos perdidos são restauradas por completo, fazendo com que o tecido retorne à sua forma original (Dimitriou; Tsiridis; Giannoudis, 2005).

O tecido ósseo, além da sua estrutura fisicoquímica característica, tem a capacidade de regeneração e remodelação durante todo o período pós fetal, fazendo com que este tecido se diferencie dos demais (Gomes; Fernandes, 2011). Essa capacidade de regeneração ocorre em função de dois processos combinados, devendo-se tanto à proliferação de células osteoprogenitoras pré-formadas, como a indução da proliferação e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas.

Porém, esta capacidade regenerativa pode ser limitada pelo tamanho da lesão, fazendo com que grandes defeitos ósseos não se regenerem espontaneamente, o que pode representar um problema estético e funcional em diversas situações clínicas (Burg; Porter; Kellam, 2000).

## Estratégias para Regeneração Óssea

Considerando que capacidade regenerativa do tecido ósseo pode ser limitada pelo tamanho da lesão e em virtude das demandas estéticas e funcionais necessárias em diversas situações clínicas que exigem a regeneração óssea, diferentes estratégias terapêuticas para enxertia óssea têm sido empregadas.

Os enxertos ósseos autógenos são amplamente utilizados pela comunidade odontológica e médica e é considerado “padrão ouro”. Entretanto, embora possam ser aplicados em inúmeros tipos de defeitos ósseos ou condições que requeiram reparo ósseo, são associados a algumas dificuldades técnicas e biológicas relevantes (Putters et al., 2018). Além da necessidade de duas cirurgias, uma para a retirada e outra para implantação do enxerto, pode-se considerar um maior risco infecções, maior morbidade tanto trans- como pós-operatória, bem como maior tempo de procedimento. É preciso considerar também que existe uma disponibilidade limitada de osso que pode ser retirado para o emprego em procedimentos de enxertia óssea e, normalmente, ela está em locais de difícil acesso.

Devido as estas características, a busca por alternativas aos materiais autógenos é de extrema relevância e o uso destas alternativas tem se tornado cada vez mais frequente. Entre estas alternativas podemos citar os materiais alógenos e os materiais xenógenos. Os enxertos ósseos alógenos são provenientes de outro indivíduo da mesma espécie (Hettwer et al., 2019); os enxertos xenógenos são provenientes de espécie diferente da do receptor (Lee et al., 2015; Park et al., 2007). Os xenoenxertos e aloenxertos ósseos são esterilizados por liofilização e / ou irradiação e esses processos possibilitam que as células vivas não estejam mais presentes no enxerto doador, embora haja evidências de que esse processo possa destruir muitas das proteínas osteogênicas que contribuem para a reparação óssea adequada, reduzindo consideravelmente o potencial osteogênico dos xenoenxertos e aloenxertos em comparação com os enxertos autógenos (Enneking; Campanacci, 2001; Ghiraldini et al., 2016). Além disso, os métodos de conservação e riscos de infecção relacionados aos xenoenxertos e aloenxertos são ainda controversos devido à presença de resíduos biológicos indesejados (Henman; Finlayson, 2000).

Neste contexto, outras abordagens terapêuticas têm sido estudadas a fim de resolver essas complicações por meio da utilização de alternativas de substitutos ósseos, como biomateriais aloplásticos orgânicos/naturais e sintéticos (Ansari; Eshghanmalek, 2019).

## **Biomateriais Sintéticos**

Diversos polímeros e compostos inorgânicos biodegradáveis têm sido utilizados como biomateriais sintéticos para reconstrução e regeneração óssea, apresentando resultados promissores, suportando adequado desempenho ativo, biocompatibilidade e cinética de biodegradação reguladora adequada (Cheng et al., 2019; Rezwan et al., 2006; Zhang et al., 2010).

Dentre eles, polímeros sintéticos como ácido polilático (PLA) e ácido poliglicólico (PGA), bem como copolímeros polilático-coglicólico (PLGA), têm sido muito utilizados na engenharia de tecidos ósseos (Zhao et al., 2013). Outros polímeros promissores são o policaprolactona (PCL) e polietileno glicol (PEG), usados como biomateriais de preenchimento em diferentes defeitos ósseos, demonstrando absorção e biocompatibilidade adequadas (Corrales et al., 2012; Wang et al., 2019). Esses polímeros apresentam como vantagens seu tempo de degradação, resistência mecânica e a biocompatibilidade com o tecido biológico, além de sua característica de biodegradação, que acontece por meio de hidrólise de suas ligações ésteres, sendo os produtos decorrentes da degradação completamente absorvidos pelo organismo (Corrales et al., 2012; Zhao et al., 2013).

Com o desenvolvimento das pesquisas de biomateriais, alternativas sintéticas de destaque na literatura atual também utilizadas na regeneração óssea são as biocerâmicas à base de fosfato de cálcio e silicato (Dziadek; Stodolak Zych; Cholewa-Kowalska, 2017; Silva, 2019). Devido à elevada estabilidade e adequada taxa de biodegradação, o beta fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) tem sido amplamente utilizado na regeneração óssea (Horch et al., 2006), com capacidade osteocondutora e osteoindutora, induzindo a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas e estimulando a proliferação de osteoblastos (Rezwan et al., 2006). No estágio avançado da regeneração óssea, a hidrólise e a fagocitose ativa desintegram gradualmente este biomaterial, o qual é substituído por tecido ósseo neoformado (Rezwan et al., 2006). Algumas evidências apontam que os enxertos  $\beta$ -TCP possuem regenerativo ósseo semelhante ao osso autógeno e ao aloenxerto congelado e seco, desmineralizado ou não (Nociti et al., 2000).

Ainda, os biomateriais baseados em hidroxiapatita (HA), maior componente inorgânico dos tecidos duros, são amplamente usados como substitutos ósseos, de forma isolada ou associados a outros biomateriais (Chang et al., 2015; Gotz et al., 2008; Hamerschmidt et al., 2011). Devido à alta biocompatibilidade e segurança, biomateriais a base de HA têm sido aplicados na engenharia tecidual como osteocondutores (Liu et al., 2018; Martin; Bettencourt, 2018), além de estimularem a liberação de marcadores angiogênicos e possuírem efeito na

diferenciação de células osteogênicas, acelerando o processo de neoformação óssea (Honda et al., 2006; Kalantari; Naghib, 2019; Kilian et al., 2008; Silva, 2019). A HA possui caráter vital na mineralização óssea e expressão de marcadores relacionados ao metabolismo ósseo mineral (Arvidson et al., 2011), além de apresentar alta afinidade por proteínas e fatores de crescimento (Wang; Yeung, 2017). Biomateriais a base de HA, diferentemente do  $\beta$ -TCP, reabsorvem lentamente, por meio de dissolução aquosa nos fluidos corporais, reabsorção por osteoclastos e células multinucleares e fagocitose de partículas por macrófagos. Por esse motivo, o uso da HA tem sido combinado com  $\beta$ -TCP, a fim de que já haja formação de novo osso nos espaços criados a partir da degradação e a reabsorção  $\beta$ -TCP (Garagiola et al., 2016). Ainda, a aplicação de nano-hidroxiapatita (nano-HA), com partículas menores, tem sido empregada de forma promissora na regeneração de defeitos ósseos, beneficiando o processo de neoformação óssea (Ding et al., 2016; Kubasiewicz-Ross et al., 2017). Estudos apontam que com o uso de nano-HA a bioatividade é aprimorada em comparação ao uso de partículas de tamanho maior de HA, além de otimizar a adesão de proteínas e a proliferação celular (Garagiola et al., 2016; Teotia et al., 2017).

O avanço dos conhecimentos envolvendo biomateriais sintéticos tem mostrado também que a combinação de alternativas sintéticas pode ser promissora em diversos mecanismos relacionados à formação óssea. Neste contexto, um estudo recente mostrou que a combinação de PCL e nano-HA não somente melhorou as propriedades mecânicas do biomaterial, como também estimulou macrófagos a produzirem fatores de crescimento como VEGF e PDGF-BB, e moléculas relacionadas à osteogênese, incluindo Proteína óssea morfogenética 2 (BMP2), fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ 1), e Prostagladina E2 (PGE2) (Abreu et al., 2013).

Considerando as limitações relacionadas às técnicas regenerativas com enxertos ósseos autógenos, alógenos e xenógenos e, tendo em vista o desenvolvimento promissor das pesquisas relacionadas aos biomateriais e as vantagens oferecidas pelo uso de recursos sintéticos na regeneração óssea, seria relevante o aprofundamento de estudos de novos biomateriais, que pudessem proporcionar resultados eficazes, seguros e previsíveis na reconstrução de defeitos ósseos.

### **Modelo Experimental de Defeitos de Tamanho Crítico**

Modelos experimentais pré-clínicos têm sido amplamente utilizados para investigar a aplicabilidade de diferentes biomateriais e tais ensaios em animais são capazes de fornecer uma

“prova de princípio” estabelecendo a eficácia, segurança e previsibilidade das intervenções quando aplicadas, subsequentemente, na clínica (Gomes; Fernandes, 2011).

Embora a seleção de modelos pré-clínicos possa levar em consideração a árvore filogenética, se dados confiáveis puderem ser conseguidos usando animais de pequeno porte, como roedores, é preferível (Gomes; Fernandes, 2011). Nos processos para avaliação da regeneração óssea, roedores podem oferecer algumas vantagens, como uma melhor relação custo-benefício, facilidade na realização do estudo, além de permitir melhor padronização dos experimentos em condições de amostras geneticamente semelhantes (Vajgel et al., 2014).

A utilização de modelos experimentais em calvária tem contribuído para um melhor entendimento do processo de reparo de defeitos ósseos (Cirano et al., 2018). Como a calvária de ratos é relativamente inerte e possui características semelhantes aos ossos maxilares como ossificação membranosa e a mesma origem embriológica, ela tem sido utilizada como modelo experimental para regeneração óssea, inclusive por meio da utilização de membranas e/ou materiais de preenchimento (Frota et al., 2011; Luvizuto et al., 2011; Schofer et al., 2011). A calvária é um local fácil de receber enxerto e os tecidos moles podem ser suturados de modo que a ferida cirúrgica fique totalmente protegida, o que reduz o risco de exposição da membrana ou contaminação (Gomes; Fernandes, 2011). Um aspecto importante que deve ser levado em consideração na utilização deste modelo experimental refere-se ao tamanho crítico do defeito. É denominado desta forma quando, ao longo de toda a vida do animal, o reparo ósseo espontâneo não é capaz de preencher todo o defeito com tecido neoformado. O tamanho crítico do defeito ósseo em calvária de ratos é de 5.0mm de diâmetro, conforme estabelecido em uma revisão sistemática que analisou 61 artigos científicos, reportando que apenas 1,6% dos defeitos dessa dimensão repararam completamente com osso neoformado, caracterizando- os mesmos como defeitos de tamanho crítico (Vajgel et al., 2014).

Deste modo, tendo em vista as vantagens oferecidas pelo uso de materiais sintéticos no preenchimento e reconstrução de defeitos ósseos, o presente estudo tem como objetivo avaliar a utilização de um biomaterial bioabsorvível de origem sintética em forma de pasta, composto por polímeros PLA, PLC e PEG associado ao  $\beta$ -TCF, HA e nano-HA, no reparo ósseo em defeitos de calvária de tamanho crítico em ratos. Embora existam alguns dados moleculares sobre os efeitos de biomateriais sintéticos nos processos relacionados à reparação óssea, a influência deste biomaterial em questão no reparo de defeitos ósseos críticos ainda não é conhecida. Espera-se que com a realização deste estudo possa ser verificada a influência de um biomaterial bioabsorvível de origem sintética em forma de pasta composto por polímeros PLA, PLC e PEG associado ao  $\beta$ -TCF, HA e nano-HA, no reparo ósseo em defeitos de calvária de

tamanho crítico em ratos. Embora existam alguns dados moleculares sobre os efeitos de biomateriais no processo de reparo ósseo, além de estabelecer os mecanismos biológicos pelos quais isso ocorre.

## **2 CONCLUSÃO GERAL**

Portanto, dentro dos limites deste estudo in vivo, podemos concluir que o biomaterial testado (X) não foi favorável ao preenchimento de defeitos ósseos até o final do período de relato analisado.

## REFERÊNCIAS

- Abreu FA, Ferreira CL, Silva GA, Paulo CD, Miziara MN, Silveira FF, et al. Effect of PDGF-BB, IGF-I growth factors and their combination carried by liposomes in tooth socket healing. *Brazilian dental journal*. 2013 Jul;24:299-307.
- Ansari M, Eshghanmalek M. Biomaterials for repair and regeneration of the cartilage tissue. *Bio-Design and Manufacturing*. 2019 Mar;2(1):41-9.
- Arvidson K, Abdallah BM, Applegate LA, Baldini N, Cenni E, Gomez-Barrena E, et al. Bone regeneration and stem cells. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2011 Apr;15(4):718-46.
- Burg KJ, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2000;23:47-59.
- Chang YY, Lee JS, Kim MS, Choi SH, Chai JK, Jung UW. Comparison of collagen membrane and bone substitute as a carrier for rh BMP-2 in lateral onlay graft. *Clinical oral implants research*. 2015; 26(1):e13-e19.
- Cheng TL, Leblanc E, Kalinina A, Cantrill LC, Valtchev P, Dehghani F, et al. A bioactive coating enhances bone allografts in rat models of bone formation and critical defect repair. *Journal of Orthopaedic Research*. 2019;37(11):2278:86.
- Cho KS, Choi SH, Han KH, Chai JK, Wikesjö UM, Kim CK. Alveolar bone formation at dental implant dehiscence defects following guided bone regeneration and xenogeneic freeze-dried demineralized bone matrix. *Clin Oral Implants Res*. 1998 Dec;9(6):419-28.
- Cirano FR, Pimentel SP, Casati MZ, Corrêa MG, Pino DS, Messoria MR, et al. Effect of curcumin on bone tissue in the diabetic rat: repair of peri-implant and critical-sized defects. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2018 Nov 1;47(11):1495-503.
- Corrales T, Larraza I, Catalina F, Portolés T, Ramírez-Santillán C, Matesanz M, et al. In vitro biocompatibility and antimicrobial activity of poly ( $\epsilon$ -prolactone) /montmorillonite nanocomposites. *Biomacromolecules*. 2012 Dec 10;13(12):4247-56.
- De la Piedra C, Vicario C, de Acuña LR, García-Moreno C, Traba ML, Arlandis S, et al. Osteoinductive effect of bone bank allografts on human osteoblasts in culture. *Journal of Orthopaedic Research*. 2008 Feb;26(2):200-7.
- Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury*. 2005;36(12):1392-404.
- Ding J, Mu YT, Zhai S, Tao WQ. Numerical study of gas purge in polymer electrolyte membrane fuel cell. *International Journal of Heat and Mass Transfer*. 2016 Dec 1;103:744-52.
- Dziadek M, Stodolak Zych E, Cholewa-Kowalska K. Biodegradable ceramic-polymer composites for biomedical applications: A review. *Materials Science and Engineering*. 2017; C, 71, 1175-1191.

Enneking WF, Campanacci DA. Retrieved human allografts : a clinicopathological study. *J Bone Joint Surg Am.* 2001 Jul;83(7):971-86.

Frota R, Da Silva Junior VA, Teixeira ML, Veras Sobral AP, Silva ED, Da Silveira MM, et al. Histological evaluation of bone repair using beta-tricalcium phosphate. *Medicina Oral Patologia Oral Cirurgia Bucal.* 2011;190–194.

Garagiola U, Grigolato R, Soldo R, Bacchini M, Bassi G, Roncucci R, et al. Computer-aided design/computer-aided manufacturing of hydroxyapatite scaffolds for bone reconstruction in jawbone atrophy: a systematic review and case report. *Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery.* 2016 Dec;38(1):1-9.

Ghiraldini B, Conte A, Casarin RC, Casati MZ, Pimentel SP, Cirano FR, et al. Influence of glycemic control on peri-implant bone healing: 12-month outcomes of local release of bone-related factors and implant stabilization in type 2 diabetics. *Clinical implant dentistry and related research.* 2016 Aug;18(4):801-9.

Gomes PS, Fernandes MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Laboratory Animals.* 2011;45:14–24.

Gotz W, Gerber T, Michel B, Lossdorfer S, Henkel KO, Heinemann F. Immunohistochemical characterization of nanocrystalline hydroxyapatite silicagel (NanoBone(r)) osteogenesis: a study on biopsies from human jaws. *Clin. Oral Implants.* 2018;1016–26.

Hamerschmidt R, Santos RF, Araújo JC, Stahlke Jr HJ, Agulham MA, Moreira AT, et al. Hydroxyapatite granules used in the obliteration of mastoid cavities in rats. *Brazilian Journal of otorhinolaryngology.* 2011 Jun;77(3):315-21.

Henman P, Finlayson D. Ordering allograft by weight: Suggestions for the efficient use of frozen bone-graft for impaction grafting. *J Arthroplasty.* 2000;15:368–371.

Hettwer W, Horstmann PF, Bischoff S, Güllmar D, Reichenbach JR, Poh PS, et al. Establishment and effects of allograft and synthetic bone graft substitute treatment of a critical size metaphyseal bone defect model in the sheep femur. *Apmis.* 2019;127(2):53-63.

Honda Y, Anada T, Kamakura S, Nakamura M, Sugawara S, Suzuki O. Elevated extracellular calcium stimulates secretion of bone morphogenetic protein 2 by a macrophage cell line. *Biochemical and biophysical research communications.* 2006 Jul 7;345(3):1155-60.

Horch HH, Sader R, Pautke C, Neff A, Deppe H, Kolk A. Synthetic, pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb®) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006;35(8):708-713.

Horowitz R, Holtzclaw D, Rosen PS. A review on alveolar ridge preservation following tooth extraction. *J Evid Based Dent Pract.* 2012 Sep;12(3 Suppl):149-60.

Hu C, Ashok D, Nisbet DR, Gautam V. Bioinspired surface modification of orthopedic implants for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2019;219:119366.

Kalantari E, Naghib SM. A comparative study on biological properties of novel nanostructured monticellite-based composites with hydroxyapatite bioceramic. *Materials Science and Engineering: C*. 2019 May 1;98:1087-96.

Kilian O, Wenisch S, Karnati S, Baumgart-Vogt E, Hild A, Fuhrmann R, et al. Observations on the microvasculature of bone defects filled with biodegradable nanoparticulate hydroxyapatite. *Biomaterials*. 2008 Aug 1;29(24-25):3429-37.

Kubasiewicz-Ross P, Hadzik J, Seeliger J, Kozak K, Jurczyszyn K, Gerber H, et al. New nano-hydroxyapatite in bone defect regeneration: A histological study in rats. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*. 2017 Sep 1;213:83-90.

Lee JS, Jung JS, Im GI, Kim BS, Cho KS, Kim CS. Ridge regeneration of damaged extraction sockets using rhBMP-2: an experimental study in canine. *J Clin Periodontol*. 2015 Jul;42(7):678-87.

Liu J, Kerns DG. Mechanisms of guided bone regeneration: a review. *Open Dent J* 2014; 8: 56–65.

Liu X, Rodeheaver DP, White JC, Wright AM, Walker LM, Zhang F, et al. A comparison of in vitro cytotoxicity assays in medical device regulatory studies. *Regulatory toxicology and pharmacology*. 2018 Aug 1;97:24-32.

Luvizuto ER, Tangl S, Zanoni G, Okamoto T, Sonoda CK, Gruber R, et al. The effect of BMP-2 on the osteoconductive properties of beta-tricalcium phosphate in rat calvaria defects. *Biomaterials*. 2011;32(15):3855-61.

Martin V, Bettencourt A. Bone regeneration: Biomaterials as local delivery systems with improved osteoinductive properties. *Materials Science and Engineering: C*. 2018 Jan 1;82:363-71.

Misch CM. Autogenous bone: is it still the gold standard? *Implant Dent*. 2010; 19:361.

Nociti FH Jr, Caffesse RG, Sallum EA, Machado MA, Stefani CM, Sallum AW. Evaluation of guided bone regeneration and/or bone grafts in the treatment of ligature-induced peri-implantitis defects: a morphometric study in dogs. *J Oral Implantol*. 2000;26(4):244-9.

Park YJ, Lee YM, Park SN, Lee JY, Ku Y, Chung CP, et al. *Periodontics Restorative Dent*. 2007;27:151.

Putters TF, Wortmann DE, Schortinghuis J, van Minnen B, Boven GC, Vissink A, et al. Morbidity of anterior iliac crest and calvarial bone donor graft sites: a 1-year randomized controlled trial. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2018;47(11):1474-80.

Rezwan K, Chen Q, Blaker J, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterial*. 2006; 27(18):13–3431.

Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. In: *Seminars in cell & developmental biology*. 2008 Oct 1;19(5):459-66.

Schofer MD, Roessler PP, Schaefer J, Theisen C, Schlimme S, Heverhagen JT, et al. Electrospun PLLA nanofiber scaffolds and their use in combination with BMP-2 for reconstruction of bone defects. *PloS one*. 2011 Sep 28;6(9):e25462.

Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials*. 2001;22(19):2581-93.

Silva CM. Obtenção de biocimentos de hidroxiapatita e  $\beta$ -TCP para aplicações ortopédicas e odontológicas. [Graduação em Biotecnologia]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 2019.

Teotia AK, Raina DB, Singh C, Sinha N, Isaksson H, Tägil M, et al. Nano-hydroxyapatite bone substitute functionalized with bone active molecules for enhanced cranial bone regeneration. *ACS applied materials & interfaces*. 2017 Mar 1;9(8):6816-28.

Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimões R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clinical oral implants research*. 2014;25(8):879-93.

Wang D, Jang J, Kim K, Kim J, Park CB. "Tree to Bone": Lignin/Polycaprolactone Nanofibers for Hydroxyapatite Biomineralization. *Biomacromolecules*. 2019; 8;20(7):2684-93.

Wang W, Yeung KW. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials*. 2017;2(4):224-47.

Zhang J, Xu Q, Huang C, Mo A, Li J, Zuo Y. Biological properties of an anti-bacterial membrane for guided bone regeneration: An experimental study in rats. *Clinical Oral Implants Research*. 2010 Mar;21(3):321-7.

Zhao J, Han W, Tang M, Tu M, Zeng R, Liang Z, et al. Structure, morphology and cell affinity of poly (L-lactide) films surface-functionalized with chitosan nanofibers via a solid-liquid phase separation technique. *Materials Science and Engineering: C*. 2013 Apr 1;33(3):1546-53.