

## Avaliação clínica de compósito constituídos por fosfato de cálcio nanoestruturado e biopolímero associado à células osteoprogenitoras como alternativa à biocerâmica para a uso na rede SUS na regeneração óssea

### Clinical evaluation of composite constituted by nanostructured calcium phosphate and biopolymer associated with osteoprogenitor cells as an alternative to bioceramics for use in the SUS network in bone regeneration

#### RESUMO

Os biomateriais nanoestruturados têm se destacado como elementos estratégicos para a medicina regenerativa devido à sua grande área específica, a sua característica de atuar como veículo portador e liberador de fatores de crescimento, células e pela sua mobilidade no plasma, no meio extra e intra-celular. Nos últimos anos, a equipe executora deste estudo, constituída por pesquisadores do CBPF, UFF, UFRJ e INMETRO têm concentrado seus esforços no desenvolvimento de novos fosfatos de cálcio na forma nanoestruturada e com substituições iônicas para uso clínico. Estas características potencializam a bioabsorção do material e sua eficiência na regeneração tecidual, bem como seu uso como nanocarreador de biomoléculas (proteínas, peptídeos, fatores de crescimento e fármacos). Neste estudo foi produzido e avaliado clinicamente um novo biomaterial para a regeneração óssea, seguindo o princípio de “quality by design”, visando aumentar sua eficiência em procedimentos clínicos específicos tais como o tratamento do edentulismo. Considerando o enxerto autógeno como referência, foram realizadas mudanças profundas no desenho dos enxertos de fosfato de cálcio convencionais no sentido de processar o biomaterial na forma de uma matriz microporos não cerâmica constituída por compósito nanoestruturado de hidroxiapatita carbonatada e o biopolímero alginato de sódio – associado ao concentrado de fatores de crescimento. Este projeto objetivou avaliar clinicamente o ganho ósseo na elevação da membrana sinusal após implantação de microesferas de hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada associadas ao concentrado de fatores de crescimento em fase líquida, obtido do sangue periférico autógeno. O levantamento do assoalho do seio maxilar utilizando microesferas de hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada associada ou não aos fatores de crescimento não identificou o efeito sinérgico no aumento do tecido ósseo quando o biomaterial era associado aos fatores de crescimento na fase líquida. Foi observada uma formação óssea equivalente em ambos os lados operados após seis meses do procedimento de elevação sinusal. Com este estudo concluímos que as microesferas de hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada é segura e eficaz para uso humano e pode ser uma alternativa segura para uso na Rede SUS em procedimentos de rege-

Monica Diuana Calasans-Maia<sup>1</sup>, Carlos Fernando de Almeida Barros Mourão<sup>2</sup>, Rodrigo Figueiredo de Brito Resende<sup>1</sup>, Jhonathan Raphaell Barros Nascimento<sup>2</sup>, Alexandre Malta Rossi<sup>3</sup>, José Mauro Granjeiro<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>. Laboratório Associado de Pesquisa Clínica em Odontologia Faculdade de Odontologia, Universidade Federal Fluminense

<sup>2</sup>. Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal Fluminense

<sup>3</sup>. Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas

<sup>4</sup>. Laboratório Associado de Pesquisa Clínica em Odontologia, Faculdade de odontologia, Universidade Federal Fluminense

neração óssea com custo muito inferior ao biomaterial sintético disponível no Mercado nacional. Estudos futuros multicêntricos com um número maior de participantes devem ser realizados (Fase 3 da Pesquisa Clínica).

**Palavras-chaves:** Fosfato de cálcio, Nanotecnologia, Enxerto ósseo, Bioengenharia, Enxerto seio maxilar e Ensaio clínico.

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o desenvolvimento de novos materiais para uso biomédico tem se destacado como uma das áreas mais promissoras da pesquisa científica. Este movimento se deve principalmente a dois fatores: à forte demanda da sociedade urbana por novas terapias para o tratamento de doenças degenerativas, traumas e tumores e ao rápido desenvolvimento de novas técnicas de produção e caracterização das propriedades físico-químicas e biológicas de biomateriais e, em especial, nanomateriais, tais como nanoestruturas, nanopartículas e nanodispositivos biocompatíveis [1].

Os biomateriais nanoestruturados têm se destacado como elementos estratégicos para a medicina regenerativa devido à sua grande área específica à sua característica de atuar como veículo portador e liberador de fatores de crescimento, células e pela sua mobilidade no plasma, no meio extra e intra-celular [2]. Estas propriedades potencializam também os efeitos de moléculas a eles associados e propiciam estratégias de ação local dos medicamentos. Biomateriais convencionais rotineiramente utilizados na terapia de patologia dos tecidos duros e moles, ou matrizes para terapias celulares, tais com as biocerâmicas, tornam-se bioreabsorvíveis pelo organismo quando nanoestruturados, ou seja, produzidos através da nanotecnologia. Esta nova condição amplia as possibilidades de uso clínico destes novos materiais nos processos de regeneração de tecidos e permite que o biomaterial seja absorvido pelo organismo após a sua função clínica, possibilitando, assim, que o tecido original reocupe o espaço do implante regenerando a área lesada [3].

Os biomateriais nanoestruturados têm se colocado como uma alternativa segura e eficiente ao uso de enxertos autólogos que são geralmente utilizados no tratamento de perdas ósseas onde a resposta do organismo é muitas vezes insuficiente para uma reparação completa de lesões tais como defeitos extensos, infecções, tumores e defeitos congênitos [4]. Apesar de suas excelentes propriedades de osteocondução e capacidade de fornecer células viáveis, o uso clínico de osso autógeno apresenta limitações. Deve-se considerar a disponibilidade limitada dos enxertos, o custo de um segundo sítio cirúrgico (área doadora) e o maior período de convalescença do paciente, aumentando o risco de infecções associado à imprevisibilidade do grau de reabsorção do enxerto autógeno. Portanto, um dos grandes desafios para a medicina regenerativa e para o sistema de saúde é o de desenvolver materiais biomiméticos para procedimentos em neurocirurgia, ortopedia, implantodontia e cirurgia buco-maxilo-facial com eficiência igual ou superior ao enxerto autógeno.

Apesar do seu grande potencial, inúmeros são os desafios da pesquisa para tornar os nanobiomateriais produtos eficientes para uso em seres humanos com capacidade de estimular a adesão, a migração, a proliferação celular, a vascularização, e a reconstituição acelerada e organizada dos tecidos funcionais [5].

A hidroxiapatita -  $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ , dentre os fosfatos de cálcio, é uma das biocerâmicas mais utilizadas comercialmente como substituto ósseo devido à sua bioatividade e propriedades osseoscondutoras. Na forma cerâmica, ou seja, sinterizada

da, este biomaterial perde a sua característica nanoestruturada acarretando uma baixa capacidade de absorção pelo organismo o que diminui a sua eficiência na regeneração tecidual. Nos últimos anos, os pesquisadores envolvidos neste estudo têm concentrado seus esforços no desenvolvimento de fosfatos de cálcio na forma nanoestruturada e com substituições iônicas. Estas características potencializam a bioreabsorção do material e sua eficiência na regeneração tecidual, bem como seu uso como nanocarreador de biomoléculas (proteínas, peptídeos, fatores de crescimento e fármacos) [6].

Este estudo visa a avançar no desenho do biomaterial, seguindo o princípio de quality by design, para aumentar sua eficiência em procedimentos clínicos específicos como no levantamento do assoalho do seio maxilar em pacientes edêntulos total ou parcial. Considerando o enxerto autógeno como referência, as mudanças propostas são na direção de usar o biomaterial na forma de uma matriz microporosa constituída por compósito de hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada e o biopolímero alginato de sódio – associado ao concentrado autógeno de fatores de crescimento em fase líquida.

## OBJETIVO GERAL

Avaliar clinicamente microesferas de hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada e absorvível associado ou não aos fatores de crescimento na fase líquida do sangue periférico no tratamento do edentulismo da região posterior dos maxilares.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Síntese e Processamento do Biomaterial

O material compósito utilizado neste projeto é constituído pela associação de uma hidroxiapatita carbonatada associada ao biopolímero alginato de sódio na forma de esferas microporosas. A hidroxiapatita carbonatada foi sintetizada segundo normas BPF (Manual de Boas Práticas de Fabricação) com parâmetros de preparação que induzam à formação de um material nanoestruturado com alta área específica (>200 m<sup>2</sup>/g), baixo grau de cristalinidade e tamanho reduzido de partículas (d<20nm). A substituição aniônica do grupo PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> pelo CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (Ca<sub>10-x</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6-x</sub>(CO<sub>3</sub>)<sub>x</sub>](OH)<sub>2-x-2y</sub> (CO<sub>3</sub>)<sub>y</sub> (0≤x≤1.1, 0≤y≤0.2) produz um material com estequiometria bem próxima da fase mineral da apatita biológica aumentando a bioreabsorção do biomaterial. Microesferas e matrizes porosas de hidroxiapatita carbonatada foram preparadas a partir de misturas homogêneas do biomaterial com o alginato

de sódio dissolvido em solução aquosa e a partir dessa mistura homogênea foram produzidas microesferas com diâmetro médio entre 400 e 625 µm.

### 2. Preparo dos fatores de crescimento em fase líquida

O sangue periférico foi coletado de 14 doadores participantes da pesquisa, saudáveis e com idades entre 20 e 56 anos, sem histórico de uso de medicação anticoagulante. Para a produção de cada membrana foi utilizada uma alíquota de 9 ml de sangue, coletada em tubos sem adição de qualquer substância (DryVacutube, Biocon®, Brasil), imediatamente centrifugada a 400 g em centrífuga com rotor horizontal (B-40, RDE®, Brasil) por 10 minutos. Ao término da centrifugação foi possível identificar claramente a sedimentação de células vermelhas, separadas do soro sanguíneo. Uma alíquota de 5 ml foi retirada da parte superior (área laranja) de cada tubo e misturado ao biomaterial até obter uma mistura gelatinosa para ser implantado no seio maxilar.

### 3. Regeneração óssea no edentulismo

Esse projeto foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (Parecer nº 1.345.263).

Os procedimentos cirúrgicos e laboratoriais foram realizados no Núcleo de Pesquisa Clínica em Odontologia (NPCO) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense (FO/UFF). Para a realização desse projeto foram recrutados 10 participantes de pesquisa com indicação para a realização do levantamento do assoalho do seio maxilar com enxerto subantral bilateralmente (n=20). Esses voluntários foram de ambos os sexos e na faixa etária de 30 a 60 anos de idade.

O diagnóstico da necessidade de enxerto subantral foi confirmado por dois diferentes profissionais, que não fazem parte deste projeto. Todos os participantes foram informados previamente dos critérios físicos e psicológicos necessários para a participação nesse projeto. Os critérios físicos compreendem: não apresentar qualquer doença no momento, não estar fazendo uso de qualquer medicação que possa alterar ou comprometer a resposta cicatricial óssea (diabete, disfunção autoimune, terapia prolongada com corticosteroides, quimioterapia ou bifosfonato venoso, osteomielite maxilar, sinusite aguda ou crônica em um ou nos dois seios maxilares, hiperparatireoidismo, disfunções renais e hepáticas e deficiência vascular na região do implante). Em relação ao tecido ósseo na região posterior, os critérios foram:

disponibilidade de largura (mínimo de 5mm) e altura (até 4mm) verificada por meio de tomografia computadorizada, situação que recomenda a realização de enxerto ósseo do tipo inlay visando a recuperação da altura óssea.

Os participantes não poderiam ser tabagistas e, se no caso de ex-tabagista, deveriam estar no mínimo 6 meses sem fumar previamente ao início do tratamento. Os participantes de pesquisa receberam explicações e informações sobre a natureza do estudo e após expressarem o desejo em participar, eles foram orientados a ler e concordando assinar um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) antes da sua participação.

## MEDIDAS

Antes das cirurgias, tomografias computadorizadas foram realizadas com a intenção de avaliar a quantidade óssea do osso remanescente e foram repetidas 6 meses após os procedimentos cirúrgicos com a finalidade de avaliar o ganho vertical ósseo na região subantral e, simultaneamente, selecionar as dimensões dos implantes que serão instalados na região enxertada.

## PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Após a administração de anestesia local por bloqueio regional dos nervos infra orbitário, alveolar póstero-superior e palatino maior (Lidocaína 2% com adrenalina 1:100.000), uma incisão em L sobre a crista óssea alveolar (cabo nº3 e lâmina BD nº15), seguida do descolamento muco periosteal (descolador de Molt) foi realizada para permitir a exposição da crista óssea alveolar, permitindo uma visão adequada da crista e da parede anterior do seio maxilar. A janela óssea foi criada através da corticotomia que foi realizada com o Motor Piezosonic®. O ultrassom piezoelétrico foi desenvolvido por cirurgiões maxilofaciais, utilizando ondas que apresentam vibrações ultrassônicas a uma frequência de 29 kHz, o que permite corte seletivo apenas em estruturas mineralizadas, sem danificar tecidos moles, desta forma possibilitou a realização da corticotomia da parede lateral do seio maxilar preservando a integridade da membrana do seio maxilar. Em seguida essa membrana sinusal foi descolada do assoalho do seio maxilar delicadamente através da utilização de curetas próprias para este fim. Em dez seios maxilares foram implantadas esferas de hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada (grupo controle) e em dez seios maxilares as esferas de hidroxiapatita carbonatada nanoestrutu-

rada foram implantadas associadas ao concentrado de fatores de crescimento em fase líquida do sangue periférico, que foram obtidas através de um sistema automatizado e fechado para a separação e concentração de células obtidas a partir de 27ml de sangue periférico de cada participante em uma centrifuga horizontal.

No grupo controle, as esferas de cHA foram embebidas em solução salina fisiológica a 0,9% e 1 a 2 cc de esferas de 400 a 625 µm de diâmetro foram delicadamente implantados sob a mucosa do seio maxilar com a preocupação de evitar qualquer tipo de lesão para a mucosa durante esse procedimento. Para o grupo experimental a mesma quantidade de esferas foi associada ao concentrado de fatores de crescimento antes da sua implantação. Após a implantação e antes do fechamento da ferida cirúrgica, uma membrana de colágeno reabsorvível Lumina Coat® (Criteria®, Brasil) foi implantada com intenção de proteger a área enxertada e guiar a regeneração tecidual e finalmente a sutura com fio Seda preta 4-0 (Ethicon®) foi realizada através de pontos interrompidos. Para o pós-operatório, os participantes foram instruídos para não realizar qualquer aplicação de carga sobre o local (próteses removíveis ou trituração de alimentos) para fazer uso de gelo local e solução fisiológica à 0,9% aplicado em ambas as narinas para garantir um fluxo contínuo de ar. A antibioticoterapia foi iniciada 24 horas antes do procedimento cirúrgico e se manteve por mais 10 dias (Clavulim BD 875mg, 1 cápsula de 12 em 12 horas), no caso de pacientes alérgicos à penicilina, foi utilizada a Clindamicina 300mg (1 comprimido de 6 em 6 horas pelo mesmo período). Já o antiinflamatório empregado foi a Dexametasona (Decadron 4 mg, 1 comprimido ao dia por 4 dias), em casos de hipersensibilidade foi prescrito o Naproxeno sódico 500mg (1 comprimido de 8 em 8 horas por 5 dias). Foi associado um analgésico, Paracetamol 750mg (1 comprimido de 6 em 6 horas por 3 dias) e, nos casos de alergia à substância, foi prescrito Dipirona sódica 1g (1 comprimido de 4 em 4 horas por 3 dias). A antissepsia tópica foi realizada através da aplicação local de gel de Clorexidina a 0,2%. A sutura foi removida após 10 dias e a região operada permaneceu sem influência de carga direta durante todo o período de acompanhamento.

Seis meses após à realização da enxertia subantral os participantes de pesquisa tiveram a área enxertada tomografada e, com esse exame de imagem, foi realizada medição e avaliação quantitativa do ganho ósseo no local enxertado.

## RESULTADOS

### Resultados clínicos

A idade média dos participantes foi de 46-67 anos. Foi observado um melhor manuseio do biomaterial para enxertia quando foi associado ao concentrado de fatores de crescimento, otimizando o tempo do procedimento operacional. Todos os participantes retornaram para avaliação no pós-operatório, e nenhum participante apresentou complicações pós-operatórias, como dor intensa, sangramento nasal, febre e/ou desconforto na área operada. Não houve casos de infecção e/ou necrose tecidual e sem retardo na cicatrização do local cirúrgico. Nenhum participante deixou o estudo.

### Análise tomográfica

Dez participantes (9 mulheres) foram avaliados com medições esquerda e direita, totalizando 20 observações para cada variável analisada. Antes da análise de dados, o teste de normalidade Shapiro-Wilk W foi aplicado para a distribuição da amostra. Os resultados apontaram para uma distribuição normal da amostra ( $p > 0,05$ ). O corte coronal médio inicial foi de 5,89 mm e o final de 10,66 mm, com diferença significativa entre ambos ( $p < 0,05$ ). A média inicial no corte panorâmico foi de 6,36 mm, e os 10,34 mm finais, com diferença significativa entre ambos ( $p < 0,05$ ). Como ambas as diferenças foram significativas, o sucesso do tratamento foi sugerido nas duas seções avaliadas (Figura 1 A). A média da diferença (T1-T0) no corte coronal foi de 4,78 mm. Na panorâmica, era de 3,98 mm, sem diferença significativa entre ambos ( $p > 0,05$ ). As di-

ferenças não foram significativas. Sugere-se que o tratamento tenha obtido resultados semelhantes nas duas seções avaliadas. A média da diferença (T1-T0) nas seções coronal e panorâmica foi semelhante para os lados direito e esquerdo ( $p > 0,05$ ). As diferenças não foram significativas. Sugere-se que os tratamentos realizados nos hemi-arcos obtiveram resultados similares para a amostra avaliada (Figura 1B).

### CONCLUSÃO

Os biomateriais avaliados não induziram a diferenciação das células THP-1 em macrófagos e não afetaram viabilidade dos macrófagos ativados independentemente de sua cristalinidade. Os presentes resultados demonstram que as membranas de Fibrina Rica em Plaquetas possuem grande estabilidade estrutural em meio líquido por até 28 dias, apresentando grande liberação inicial de fatores de crescimento, com cinética decrescente nas semanas subsequentes, acompanhada de uma produção consistente de citocinas pró- e anti-inflamatórias ao longo de três semanas. A hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada é um substituto ósseo viável para promover a neoformação óssea em procedimentos de elevação da membrana sinusal. A associação do biomaterial ao concentrado de fatores de crescimento não aumentou o ganho ósseo, porém facilitou o manuseio e implantação no leito receptor. Estudos futuros deverão ser realizados para avaliar a influência positiva dos fatores de crescimento do sangue periférico, principalmente nos períodos iniciais da neoformação óssea.

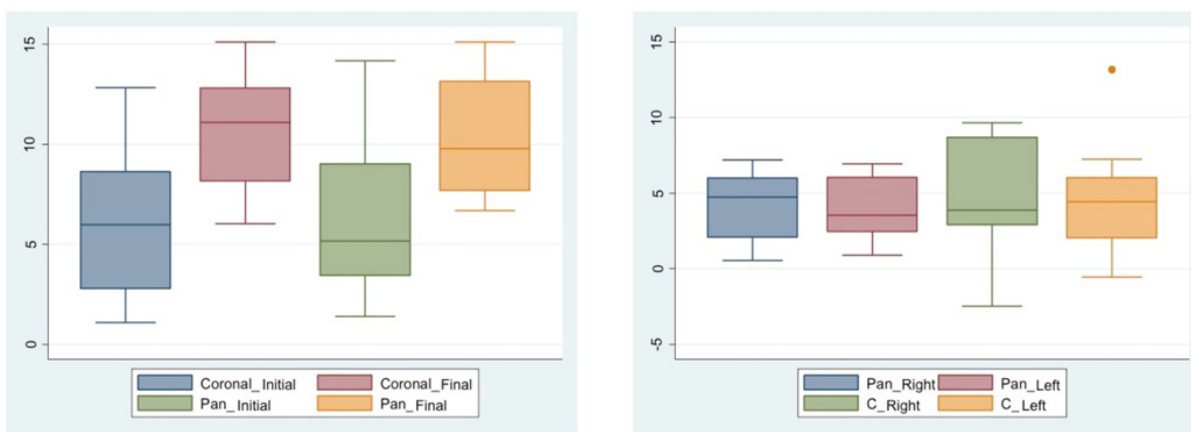


Figura 1. A. Análise das variáveis coronal e panorâmica nos dois períodos experimentais avaliados e B. Análise das médias (T1-T0) para as variáveis coronais e panorâmicas.

## BIBLIOGRAFIA

1. L. Yang, L. Zhang and T. J. Webster, *Adv. Eng. Materials*, 2011, 13 No. 6, B197-217.
2. M. Goldberg, R. Langer, *X. J Biomater. Sci. Polymer*, Vol. 18, No. 3, pp. 241–268 (2007).
3. George Stylios, Taoyu Wan, Peter Giannoudis, *Int. J. Care Injured* (2007) 38S1, S63—S74.
4. Anselme K., *Biomaterials* 2000;21:667-681.
5. C. Cunha, S. Panseri, S. Antonini, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 7 (2011) 50–59.
6. Shelley A. Durazo, Uday B. Kompella, *Mitochondrion* 12 (2011) 190–20.