

Morphological aspects and distribution of granules composed of deproteinized bone or dentin graft into putty mixtures: an in vitro study.

Inês Sofia Teixeira Pimentel

Dissertação conducente ao Grau de Mestre em
Medicina Dentária (Ciclo Integrado)

Gandra, 17 de junho de 2022

Inês Sofia Teixeira Pimentel

Dissertação conducente ao Grau de Mestre em Medicina Dentária
(Ciclo Integrado)

Morphological aspects and distribution of granules composed of
deproteinized bone or dentin graft into putty mixtures: an in vitro
study

Trabalho realizado sob a Orientação de Prof Doutor Júlio C. M.
Souza

Declaração de Integridade

Eu, **Inês Sofia Teixeira Pimentel**, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste trabalho, confirmo que em todo o trabalho conducente à sua elaboração não recorri a qualquer forma de falsificação de resultados ou à prática de plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria do trabalho intelectual pertencente a outrem, na sua totalidade ou em partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores foram referenciadas ou redigidas com novas palavras, tendo neste caso colocado a citação da fonte bibliográfica.

Agradecimentos

Aos meus pais, um enorme obrigada por todo o apoio que sempre me deram ao longo destes anos e pela oportunidade maravilhosa de concretizar um sonho! Sem eles nada disto seria possível! São os melhores pais do mundo!

As minhas amigas, Sofia, Bruna, Ana e Mariana, muito obrigada pelos momentos fantásticos que passamos juntas ao longo destes 5 anos. Levo-vos desta faculdade para a vida toda. Seguimos juntas e unidas nesta nova etapa!

À minha binómia, Ana Francisco, que foi uma grande surpresa que cruzou o meu caminho. Obrigada por toda a paciência, trabalho e companheirismo. Sem dúvida alguém que levarei para a vida.

Ao meu orientador, um gigantesco obrigada por toda a ajuda, ensino e projetos que me proporcionou ao longo do meu percurso académico. Muito grata por toda a confiança que colocou em mim!

Comunicações Científicas em Congressos na Forma de Poster

Poster científico “Combination of bone graft materials and type I collagen to enhance bone healing” – XI Jornadas Científicas do Departamento de Ciências do Instituto Universitário de Ciências da Saúde – Abril de 2019

Publicações Científicas

Artigo científico “Biomateriais sintéticos e xenógeno com alto potencial clínico para reparo tecidual” – Revista Científica Internacional RevSALUS, Volume 2 – Novembro 2019

Resumo

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar os aspetos morfológicos e a distribuição de partículas compostas por mineral ósseo bovino desproteínizado (DBBM) e grânulos derivado de dentina humana (HDBG) em uma mistura de consistência putty.

Materiais e Métodos: DBBM e HDBG foram misturados com um hidrogel de alginato em duas diferentes concentrações (1:1 e 1:3) e divididas em grupos quanto ao tipo de substituto ósseo. Grupos de amostras foram seccionados para avaliação morfológica por microscopia eletrônica de varrimento (SEM) em modo de elétrons retro-espalhados. Detalhes sobre as dimensões, conteúdo e tamanho de partículas e poros de DBBM e HDBG foram avaliados após a mistura ou não com hidrogéis de alginato.

Resultados: As análises microscópicas revelaram um tamanho de partículas DBBM variando de 750 a 1600 μm enquanto as partículas de HDBG apresentaram tamanho de partícula variando de 375 a 1500 μm . Os valores médios do tamanho dos poros das partículas de DBBM foram medidos em torno de 400 μm , enquanto as partículas de HDBG revelaram o tamanho dos poros em torno de 10 μm representados pelos túbulos dentinários. A distância das partículas DBBM na proporção de 1:1 variou de 250 a 1000 μm e na proporção de 3:1 variou de 125 a 500 μm . A distância das partículas de HDBG na proporção de 1:1 variou de 125 a 1100 μm e na proporção de 3:1 variou de 125 a 625 μm .

Conclusões: O aumento da proporção de partículas de substitutos ósseos em uma mistura para enxerto em bloco resulta numa diminuição do espaço entre as partículas o que mantém o volume ósseo durante o período de cicatrização. O tamanho de poros é adequado para a adsorção de proteínas e proliferação de células osteogénicas para o reparo ósseo.

Palavras-chave: *dentin graft; deproteinized bovine bone material; DBBM; bone healing.*

Abstract

Objective: The main aim of this study was to evaluate the morphological aspects and distribution of particles composed of deproteinized bone biomaterial mineral (DBBM) and human dentin-derived bone graft (HDBG) into a putty consistency mixture.

Materials and Methods: DBBM or HDBG were mixed with an alginate-based hydrogel at two different ratio (1:1 and 1:3) and divided into groups. Groups of specimens were cross-sectioned for morphological evaluation by scanning electron microscopy (SEM) at backscattered electrons mode. Details on the dimensions, content, and pores' size of DBBM and HDBG were evaluated after mixing or not with alginate-based hydrogels.

Results: Microscopic analyses revealed a size of DBBM particles ranging from 750 up to 1600 μm while HDBG particles showed particle size ranging from 375 up to 1500 μm . The mean values of pores' size of DBBM particles were noticed at around 400 μm while HDBG particles revealed pores' size of around 1-3 μm promoted by the dentin tubules. The lowest distance between particles was recorded for HDBG at 125 μm and 250 μm for DBBM when the particle content was increased. On decreasing the particles' content, the distance between particles was larger for DBBM (~ 1000 μm) and HDBG (~ 1100 μm).

Conclusions: The increase in bone substitute particles in a putty mixture decrease the space between particles that can maintain the bone volume over the bone healing process. The pores' size is adequate for the adsorption of proteins and growth of osteogenic cells for the bone healing.

Key words: *dentin graft; deproteinized bovine bone material; DBBM; bone healing.*

Table of contents

List of figures	X
List of abbreviations and acronyms	X
1. Introduction	1
2. Objective and hypothesis.....	3
3. Materials and Methods.....	4
3.1. Search of previous studies	4
3.2. Preparation of the specimens	4
4. Results	8
5. Discussion.....	13
6. Conclusions	17
References.....	18

List of figures

Figure 1. Schematics of the groups of materials.....	6
Figure 2. Preparation of specimens. (A) Mixture of the materials, (B) agglutination and setting time, and (C) storage in sterile well-plates. (D) Embedment of materials were autopolymerizing polyether-modified resin for (E) SEM analyses. (F) Image acquired by scanning electron microscopy.....	6
Figure 3. SEM images of DBBM granules at (A,B) x500 and (C) x20000 magnification. Red arrows indicate micro-scale pores present on the surface of DBBM granules.	8
Figure 4. SEM images of DDBM granules into a mixture with alginate-based hydrogel at the DBBM/alginate ratio of 1:3 (A) and 1:1 (B) vol/vol. SEM images at 40x magnification.....	9
Figure 5. SEM images of HDBG granules at different magnification: (A) x50, (B) x200 and (C) x2500 magnification. (C) Dentin tubules can be seen on the surface of dentin granule.....	9
Figure 6. SEM images of HDBG granules mixture with alginate-based hydrogel at the proportions DBBM/alginate 1:3 (A,B) and 1:1 (C,D) vol/vol. SEM images at 40x magnification.....	10
Figure 7. SEM images of HDBG granules (white arrows) into a mixture with alginate-based hydrogel at DBBM/alginate ratio of 1:1 vol/vol. Diatoms (yellow arrows) and dentin tubules (red arrows) can be seen on the surface of the HDBG granules. SEM images at x100 (A) and x1000 (B, C, D) magnifications.	11
Figure 8. Mean values and standard deviation recorded for size of granules and distance among granules.	12
Figure 9. Mean values and standard deviation recorded for size of macro-scale pores and micro-scale pores.	12
Figure 10. (A, B) Schematics of bone ingrowth on DBBM bone. Proliferation of osteogenic cells and formation of blood vessels into macro-scale pores. (C) Formation of woven bone (WB) and blood vessels (BV) surrounding the DBBM (*) after 6 weeks of bone healing. (D) Details on the integration between DBBM (*) particles and branches of woven bone (WB) and the high number of blood vessels (BV) and multiple multinucleated osteoclast-like cells (OC). Adapted from Jensen SS. et al. (26).....	14

List of abbreviations and acronyms

BMP	Bone Morphogenic Proteins
DBBM	Deproteinized Bovine Bone Mineral
GBR	Guided bone repair
Hap	Hydroxyapatite
HDBG	Human Dentin-derived Bone Graft
Sem	Scanning electron microscopy

1. Introduction

After the loss of a tooth, the alveolar bone undergoes a continuous process of resorption (1). Remodeling of bone tissue following tooth extraction or extensive craniomaxillofacial defects results in bone loss that can negatively affect the rehabilitation with endosseous implants. Adequate bone height and width are essential for further placement of endosseous implants (1,2). Guided bone repair (GBR) is a surgical technique using bone grafting materials to support bone healing in cases of tissue damage. Inorganic bone substitutes have advantages in the formation of nucleation sites for cell adhesion and bone formation (2,3). Nowadays, several bone substitutes are used to improve bone healing and the materials can be classified according to their origin as autogenous, xenogenous, allogenuous and synthetic or alloplastic (1,4–7). Autogenous bone graft (autograft) material is considered the first-choice materials due to their osteoinductivity and osteoconductivity, as well as providing osteogenic cells and bone growth factors (5). Autografts confer a lower risk of immunological rejection and a strong healing mechanism with osteogenesis, osteoinduction and osteoconduction. Still, they have disadvantages such as the limited amount of graft material available, additional surgical site, donor site morbidity, and extra surgical expenses (1,4,8).

On the other hand, xenogenic materials have been widely used healing tissue procedures considering source of supply, bioactivity, osteoconductivity, and bone stability (2,5,6,9). Also, xenogenic materials have shown low risks of inducing immune responses and disease transmission depending on the thermal laboratory process (6). Deproteinized bovine bone mineral (DBBM) is the most widely used xenograft in dentistry since the success in bone healing is well-reported in literature. The inorganic bone network of DBBM reveal three-dimensional morphological features similar to that found in human cancellous bone. The elimination of organic components is achieved through chemical and thermal treatments that preserve the trabecular joint and porosity of the natural bone tissue composed mainly of hydroxyapatite (Hap). Thus, DBBM acts as an osteoconductive material, with a porosity of 75%, providing the ideal environment for angiogenesis and new bone formation (6,10,11). Block or granules of DBBM have been used in surgical procedures that require an enhanced ridge contour or volume stability of the damaged site. Several studies found that block-based bone substitutes provide higher volume stability when compared to granules. However, block-based bone substitutes showed less new

bone ingrowth in comparison to the particulate materials (2,4–7,9,10). Such difference in the percentage of new bone can be partially explained due to differences in the morphological aspects and contact area for blood vessel infiltration (angiogenesis) and new bone ingrowth (5,12,13). DBBM granules could be more densely filled into the same size defect when compared to DBBM blocks regarding volume and surface area of bioactive inorganic material (4,6,11).

The extracted tooth of patients has been considered an attractive source of bone substitute since it consists of an autogenous origin free of a secondary harvesting surgery (1,6,14,15). The dentin tissue is composed of approximately 70% minerals (Hap), 20% organic materials and 10% water that depends on the tooth region. The organic matrix is composed of collagen fibers and proteins such as growth factors and BMP (16–19). The demineralization process of the dentin graft maintains the bioavailability of non-collagenous proteins that increase osteoinductivity. However, excessive demineralization can damage the dentin structure and lead to resorption, resulting in insufficient bone substitute. Also, an inadequate demineralization process produces a bone substitute with weaker osteogenic properties (14,16). Micro-scale pores derived from dentin tubules with diameter at 1-5 μm are too small for cell ingrowth although osteogenic cells used the pores for adhesion and spreading over the particles' surfaces. After demineralization, dentin tubules become channels which adsorb and release proteins for the process of adhesion, proliferation and differentiation of osteogenic cells (8). Then, the success of bone healing also depends on the capability to oxygenate, supply nutrients and remove waste products from the graft material.

Several studies have shown that particle size strongly influences osteoconduction and new bone quality (6,11,16). Thus, a highly porous three-dimensional network allows mesenchymal cells to infiltrate, attach, proliferate, and differentiate (6,7,15). Besides physicochemical nature, strength, and biocompatibility of bone substitutes, the investigation of morphological aspects is crucial for correlation with enhanced bioactivity and bone healing (20,21). In this way, in vitro studies are required to evaluate the morphological aspects and distribution of particulate bone graft prior to the surgical application.

2. Objective and hypothesis

The purpose of this study was to inspect the morphological aspects and distribution of human dentin-derived bone graft (HDBG) or deproteinized bovine bone mineral (DBBM) particles on mixing with alginate-based hydrogels. It is hypothesized that the dimensions, content, and pores' size of DBBM and HDBG vary into a putty mixture regarding the clinical handling, volume and morphological aspects of the particulate materials.

3. Materials and Methods

3.1. Search of previous studies

A literature search on PubMed will be conducted using the following search terms: “dentin graft” OR “deproteinized bovine bone material” OR “DBBM” AND “collagen” AND “guided bone regeneration” OR “bone healing” OR “bone repair”. Inclusion criteria were articles on bone graft materials to support bone formation in cases of bone defects. The inclusion criteria involved articles published in English language within the last 5 years on the morphological aspects of DBBM or HDBG particulate mixed into a putty block for bone repair. The eligibility inclusion criteria used for article searches also involved in vitro studies, meta-analyses, randomized controlled trials, and prospective cohort studies. Also, a hand-search was performed on the reference lists of all primary sources and eligible studies of this systematic bibliographic search for additional relevant publications. Studies based on publication date were restricted during the search process. The present search of studies was carried out in accordance with previous integrative or systematic review studies (22–25).

3.2. Preparation of the specimens

Deproteinized bovine bone mineral (DBBM) (Biograft™, Ossmed, Cantanhede, Portugal) was assessed in this study. DBBM was submitted to a thermal treatment up to 1200° C to remove the organic compounds and maintain the hydroxyapatite network. Then, the biomaterial was milled to produce particles (granules) ranging from 300 up to 1200 µm in diameter. The chemical composition (%wt) of the DBBM particles was the following: 32 C, 9.2 O, 8.1 Ca, 3.3P and has a Ca/P ratio of 2.45.

On harvesting human dentin-derived bone graft (HDBG), extracted third molars were firstly immersed in distilled water for 10 min and then in a solution of 2% sodium hypochlorite (NaOCl) for 10 min. Afterwards, teeth were immersed in a 10% formalin solution for 7 days. Finally, teeth were stored in 0.9% NaCl solution for rehydration over a period of 7 days prior to the cementation procedure. Each tooth was stored in separate sterilized crystal containers at room

temperature, labelling each container with the characteristics of the teeth (type, weight, dimensions). Diamond burs were used to remove remnant periodontal ligament, tissue, and debris from the tooth surfaces. Teeth roots and enamel were removed to harvest the dentin tissue. Then, teeth were immediately milled with the Smart Dentin Grinder™ apparatus (KometaBio Inc., Cresskill, NJ, USA). The milling process resulted in dentin particles (granules) ranging from 300 up to 1200 µm. The dental particles were then immersed in an isopropyl alcohol solution in a sterile container for 10 min to dissolve all organic debris and bacteria. Then, dentin granules were placed in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) for 2 min for partial demineralization and then washed in sterile saline solution for 3 min. Thus, microorganisms were eradicated after the cleaning procedure due to a strong alkali combination between sodium hydroxide and ethanol.

All procedures performed involving human participants followed the ethical standards of the research committee of the University Institute of Health Sciences (IUCS, Portugal) and therefore with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical Standards (Ethical Protocols Number 13/CE-IUCS/2022). The project was previously reviewed and approved by an institutional review board. Each participant was in good oral health, with no history of antibiotic treatment during the previous 6 months.

In this study, 6 groups of specimens were prepared as follow: 2 control groups with DBBM or HDBG granules without mixing with alginate-based hydrogel; 4 test groups with DBBM and HDBG granules mixed with alginate-based hydrogel into putty mixture at different proportions (Figure 1). For test groups, DBBM or HDBG was mixed with alginate-based hydrogel (Orthoprint™, Zhermack, Germany) at bone graft/hydrogel ratio of 1:1 and 1:3 vol/vol under the sterile condition at room temperature. The volume of the materials was controlled using a sterile spoon. The materials were mixed for 30 s and placed in a moulding container over a period of 2 min. After the setting time, bone substitutes/hydrogel assemblies were placed in storage in sterile polyester well-plates. Then, substitutes/hydrogel assemblies were embedded in autopolymerizing polyether-modified resin (Technovit 400™; Kulzer GmbH, Germany) for later analyses by scanning electron microscopy (SEM), as illustrated in Figure 2.







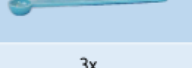
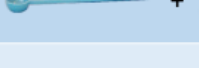
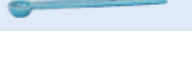
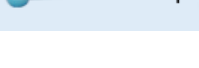
		DBBM	HDBG	Alginate Hydrogel
Control groups	Group 1: DBBM granules			
	Group 2: HDBG granules			
Study groups	Group 3: DBBM/alginate 1:3			 + 2x
	Group 4: DBBM/alginate 1:1	 3x		 + 2x
	Group 5: HDBG/alginate 1:3			 + 2x
	Group 6: HDBG/alginate 1:1		 3x	 + 2x

Figure 1. Schematics of the groups of materials.

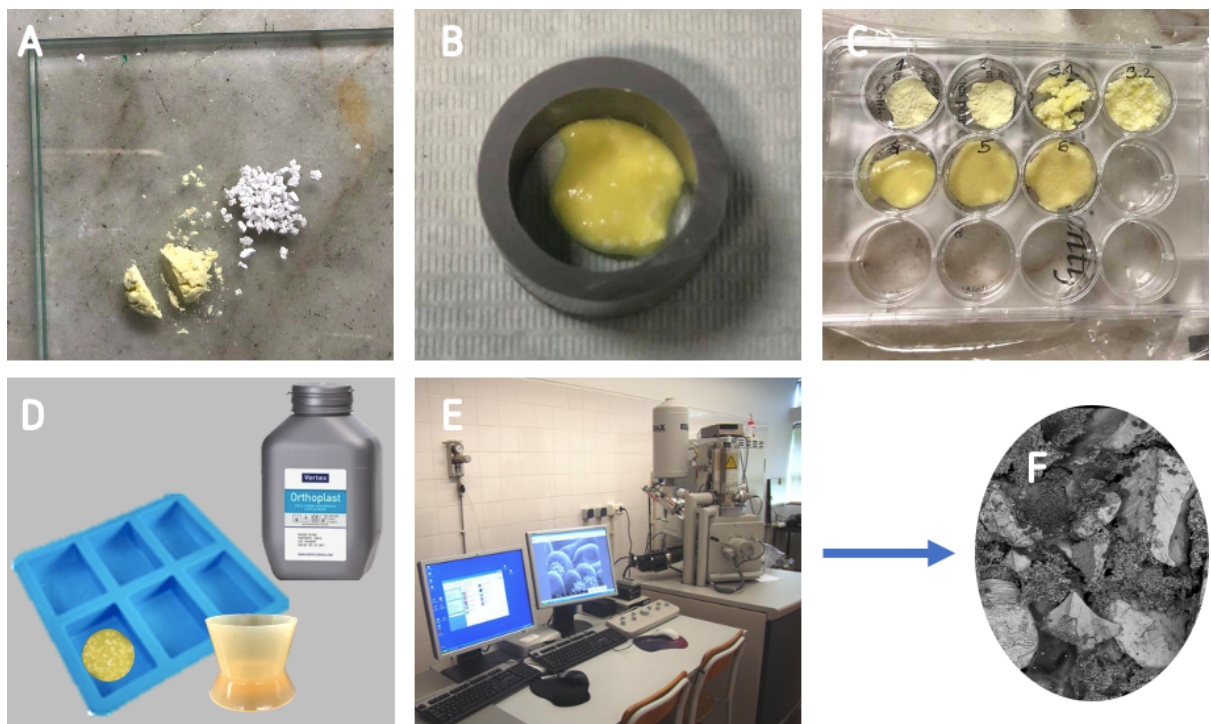


Figure 2. Preparation of specimens. (A) Mixture of the materials, (B) agglutination and setting time, and (C) storage in sterile well-plates. (D) Embedment of materials were autopolymerizing polyether-modified resin for (E) SEM analyses. (F) Image acquired by scanning electron microscopy.

3.3. Scanning electron microscopy

Groups of DBBM or HDBG granules embedded in autopolymerizing polyether modified resin were cross-sectioned by using a high-precision cutting machine. Surfaces were wet ground down to 2400 Mesh using SiC abrasive papers. Surfaces were ultrasonically cleaned in isopropyl alcohol for 10 min and then in distilled water for 10 min. Surfaces of the cross-sectioned specimens were sputter coated with a AgPd thin layer for scanning electron microscopy (SEM) analyses by using a SEM unit (JSM-6010 LV™, JEOL, Japan) coupled to energy dispersive spectroscopy (EDS) (Figure 2E). Also, DBBM or HDBG granules without mixture with alginate-based hydrogel were analyzed. The dimensions of pores and the distribution of particulate material were evaluated at high magnification ranging from x1000 up to x20000 under (SE) secondary and (BSE) backscattered electrons. The software Adobe Photoshop™ (Adobe Systems Software, Ireland) was used to analyze black and white images, with the black regions representing the pores and the white regions representing the bulk material. Image J™ software (National Institutes of Health, USA) was used to quantify the dimensions of the granules and pores on the SEM images. The cross-sectioning of specimens and SEM analyses were performed at the CMEMS laboratories at the University of Minho (Portugal).

4. Results

Scanning electron microscopy (SEM) images of DBBM granules are shown in Figure 3.

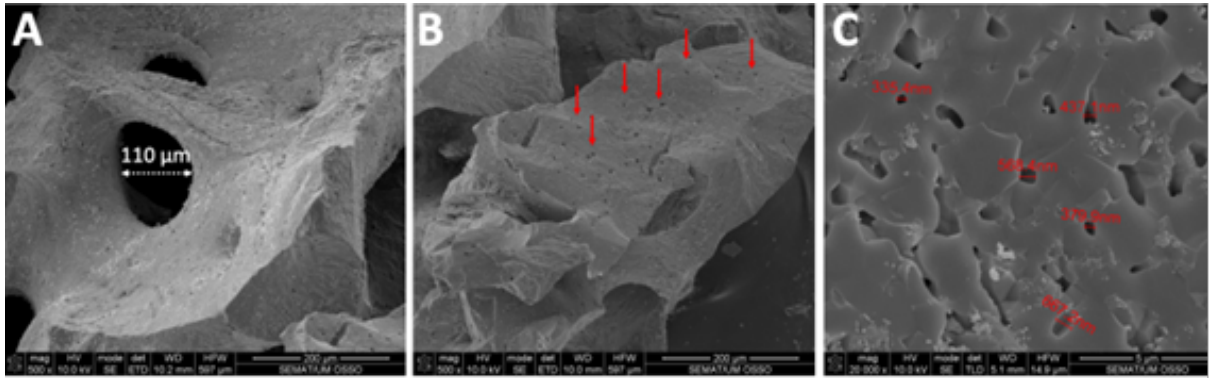


Figure 3. SEM images of DBBM granules at (A,B) x500 and (C) x20000 magnification. Red arrows indicate micro-scale pores present on the surface of DBBM granules.

As seen in Figure 3A and B, SEM images at x500 magnification showed the morphological aspects of the DBBM granules without alginate-based hydrogel. DBBM granules showed irregular morphological aspects with macro-scale pores ranging between 50 and 460 μm in diameter (Figure 3A). Micro-scale pores were inspected on the surface of DBBM granules ranging as seen in Figure 3C. Micro-scale pores ranged from approximately 300 up to 700 nm in diameter (Figure 3C).

SEM images of different concentrations of DBBM granules mixture with alginate-based hydrogel into putty mixture are shown in Figure 4.

SEM images revealed a mean size of DBBM granules ranging from 350 up to 1600 μm as seen in Figure 4. The highest distance among particles was recorded around 1000 μm for groups mixed a ratio of 1:3 (Figure 4A) when compared with the maximum distance of 500 μm among particles mixed at a ratio of 1:1 (Figure 4B). The lowest distance among particles was recorded at 125 μm for particles mixed at a ratio of 1:1 when compared with particles mixed at a ratio of 1:3 that revealed a minim distance at 250 μm . In Figure 4B, the maximum size of the DBBM macro-pores can be noted at around 460 μm .

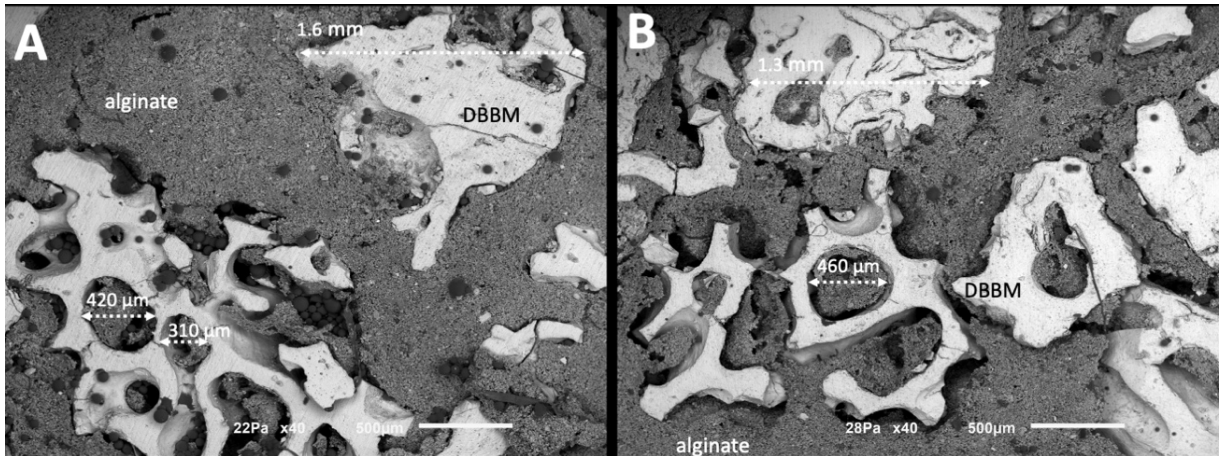


Figure 4. SEM images of DBBM granules into a mixture with alginate-based hydrogel at the DBBM/alginate ratio of 1:3 (A) and 1:1 (B) vol/vol. SEM images at 40x magnification.

SEM images revealed a mean size of DBBM granules ranging from 350 up to 1600 μm as seen in Figure 4. The highest distance among particles was recorded around 1000 μm for groups mixed a ratio of 1:3 (Figure 4A) when compared with the maximum distance of 500 μm among particles mixed at a ratio of 1:1 (Figure 4B). The lowest distance among particles was recorded at 125 μm for particles mixed at a ratio of 1:1 when compared with particles mixed at a ratio of 1:3 that revealed a minim distance at 250 μm . In Figure 4B, the maximum size of the DBBM macropores can be noted at around 460 μm .

SEM images of HDBG granules are shown in Figure 5.

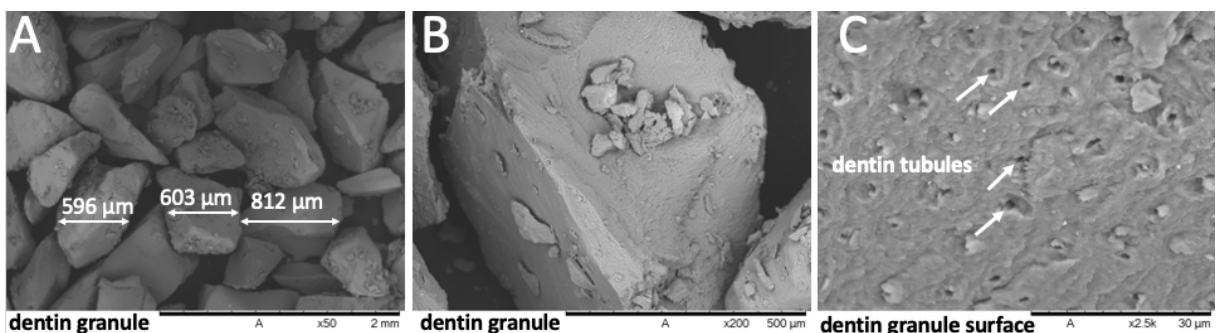


Figure 5. SEM images of HDBG granules at different magnification: (A) x50, (B) x200 and (C) x2500 magnification. (C) Dentin tubules can be seen on the surface of dentin granule.

In Figure 5A, SEM images at x50 magnification revealed the morphological aspects of the HDBG granules without alginate-based hydrogels. HDBG granules showed irregular morphological aspects with different dimensions ranging from 375 up to 1500 μm after the milling procedure. Clusters of small fragments were detected on the dentin granule surface at x200 magnification (Figure 5B). Dentin tubules were also detected on the dentin granule surface at x2500 magnification with pores' size of around 1-3 μm (Figure 5C).

SEM images of different concentrations of HDBG granules mixed with alginate-based hydrogel into putty mixture are shown in Figures 6 and 7.

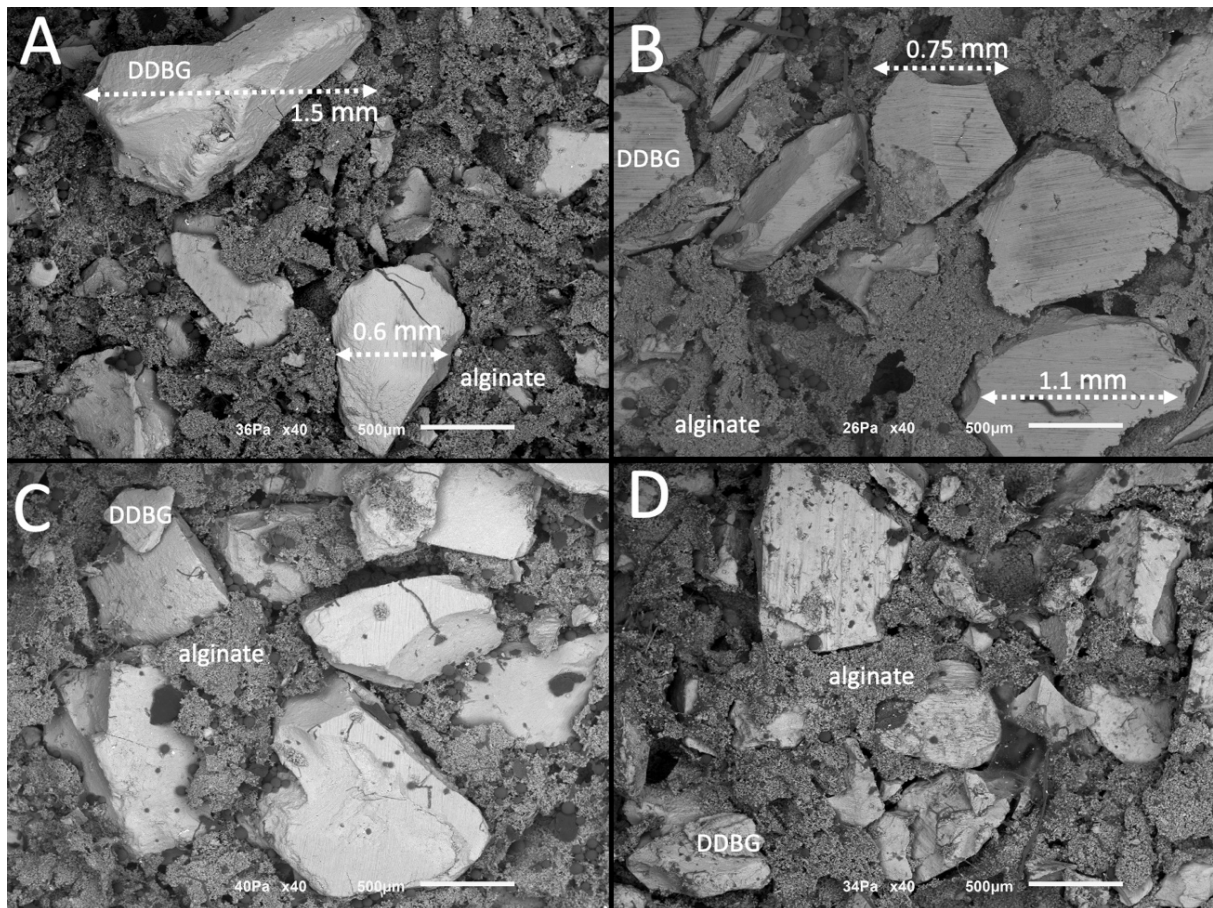


Figure 6. SEM images of HDBG granules mixture with alginate-based hydrogel at the proportions DBBM/alginate 1:3 (A,B) and 1:1 (C,D) vol/vol. SEM images at 40x magnification.

In Figure 6, SEM images validate a size of HDBG granules ranging from 375 up to 1500 μm .

The highest distance among particles was recorded around 1100 μm for groups mixed a ratio of 1:3 (Figure 6A) when compared with the maximum distance of 625 μm among particles mixed at a ratio of 1:1 (Figure 6B). The lowest distance among particles was recorded at 125 μm for both mixture proportions.

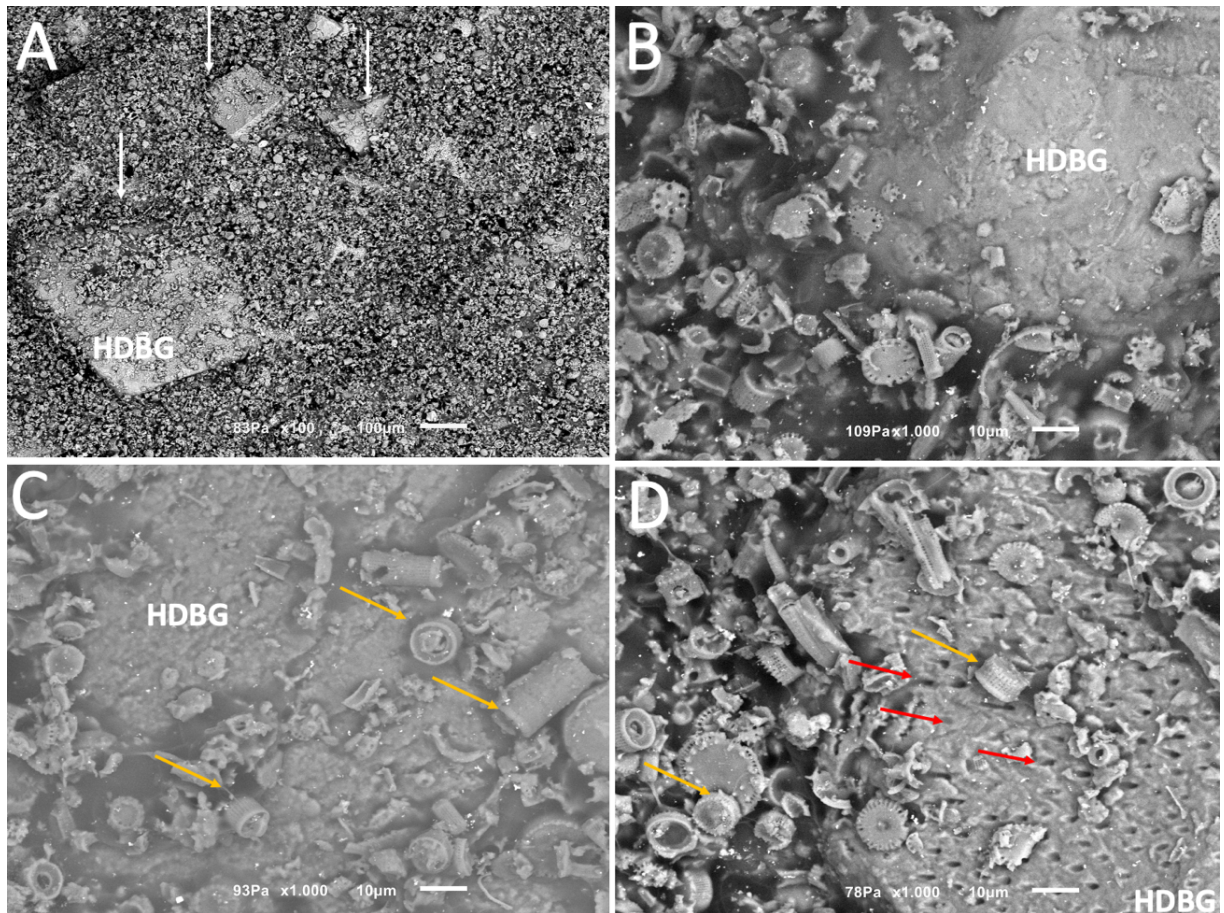


Figure 7. SEM images of HDBG granules (white arrows) into a mixture with alginate-based hydrogel at DBBM/alginate ratio of 1:1 vol/vol. Diatoms (yellow arrows) and dentin tubules (red arrows) can be seen on the surface of the HDBG granules. SEM images at x100 (A) and x1000 (B, C, D) magnifications.

In figure 7, HDBG granules (white arrows) mixed with alginate-based hydrogel were detected by SEM images at x100 magnification. At high magnification, HDBG granules were noticed surrounded by numerous unicellular cells, named diatoms (yellow arrows), which composed the alginate-based hydrogel. Dentin tubules were also detected on the surface of the HDBG granules.

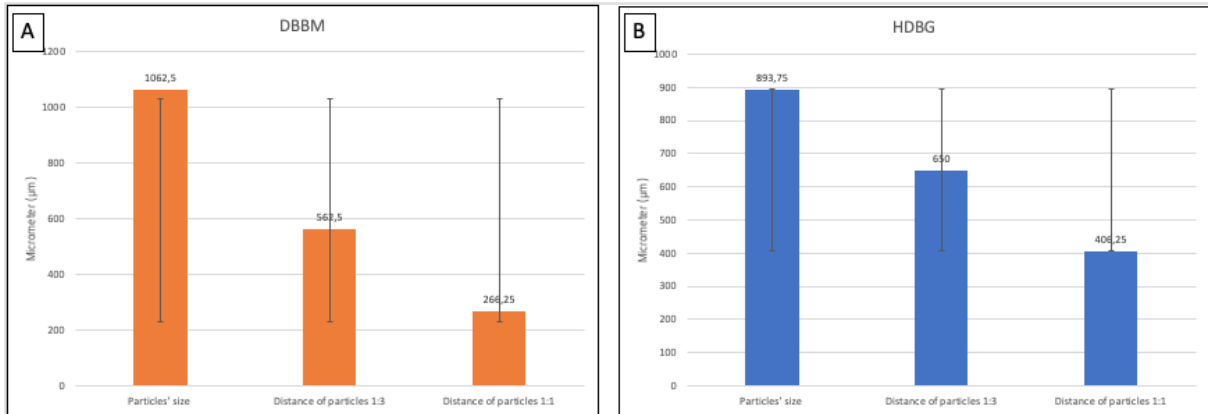


Figure 8. Mean values and standard deviation recorded for size of granules and distance among granules.

Mean values and standard deviation of granule size recorded for DBBM and HDBG, are shown in Figure 8 A and B. The mean size values of DBBM granules was recorded at 1063 μm while HDBG granules showed a mean size of 894 μm. There was no statistically differences between both groups ($p < 0.05$). The mean distance among DBBM granules mixed at 1:1 was recorded at 267 μm while DBBM mixed at 1:3 showed a mean distance among granules at 563 μm. The mean distance among HDBG granules mixed at 1:1 was recorded at 406 μm while HDBG mixed at 1:3 showed a mean distance among granules at 650 μm. There was a significantly increase in the distance of granules for both groups ($p < 0.05$).

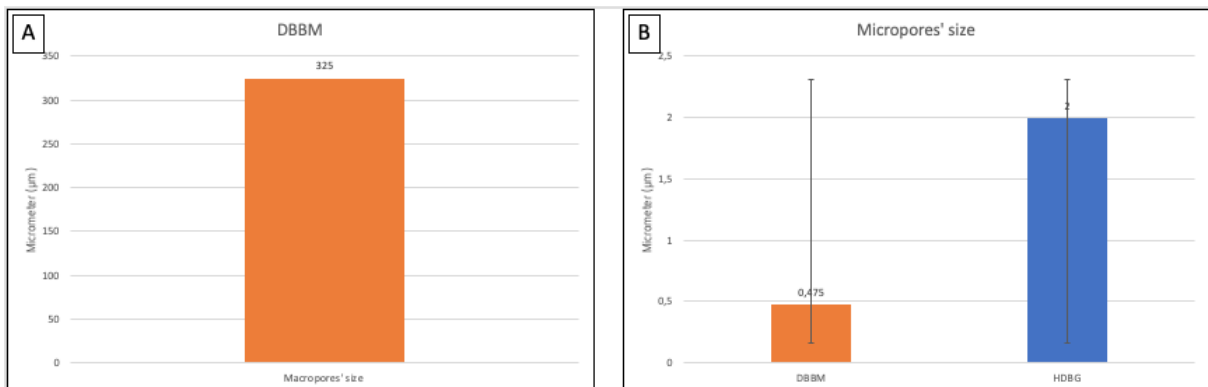


Figure 9. Mean values and standard deviation recorded for size of macro-scale pores and micro-scale pores.

Mean size values of macro-scale pores recorded for DBBM granules are shown in Figure 9A. Micro-scale pores measured on DBBM and HDBG are shown in Figure 9B. Mean size values of macro-scale pores on DBBM were recorded at 325 μm while submicron-scale pores' mean size was recorded at 0.475 μm. HDBG revealed a mean size of micro-scale pores at 2 μm.

5. Discussion

The morphology and distribution of DBBM and HDBG particles into putty mixture were analyzed under a scanning electron microscopy. The results of the present study support the hypothesis that the dimensions, content, and pores' size of DBBM and HDBG vary into a putty mixture regarding the clinical handling, volume, and morphological aspects of the particulate materials.

In the present study, DBBM and HDBG particles (granules) showed dimensions ranging from 350 up to 1600 μm although smaller granules could be found within the powders. A previous study reported small inorganic bovine bone granules $<450 \mu\text{m}$ are adequate for bone formation when compared with wider granules ranging from 450 up to 749 μm or 750 up to 1000 μm (11). Small granules provide higher surface area for interaction with the surrounding media which includes proteins, osteogenic cells, and blood products (6,11). A previous study demonstrate that small particle fragments attract more mono and multinucleated giant cells when compared to regular DBBM granules (4). Thus, small fragments of hydroxyapatite ($<20 \mu\text{m}$) strongly induce a transient inflammatory response. However, a chronic inflammation causes osteolysis and suppresses bone formation, compromising the tissue healing. Another previous study reported that both small (0.25-1 mm) and large (1-2 mm) granules composed of DBBM were equally effective in bone formation (26). Thus, the migration of cells and formation of blood vessels prior to bone formation also depends on the distance of the granules or else on the size of macro-scale pores (7,27) as investigated in the present study (Figure 3 and 4).

As seen in Figure 3, the size of macro-scale pores recorded for DBBM ranged from 50 up 460 μm in diameter that is proper for the formation of blood vessels while the micro-scale pores ranging between 0.3 and 0.7 μm are retaining spots for adhesion of osteogenic cell as well as the adsorption and gradually delivery of molecules, minerals, and proteins. A schematic illustration of the bone formation pathways surrounding DBBM surfaces is shown in Figure 10A.

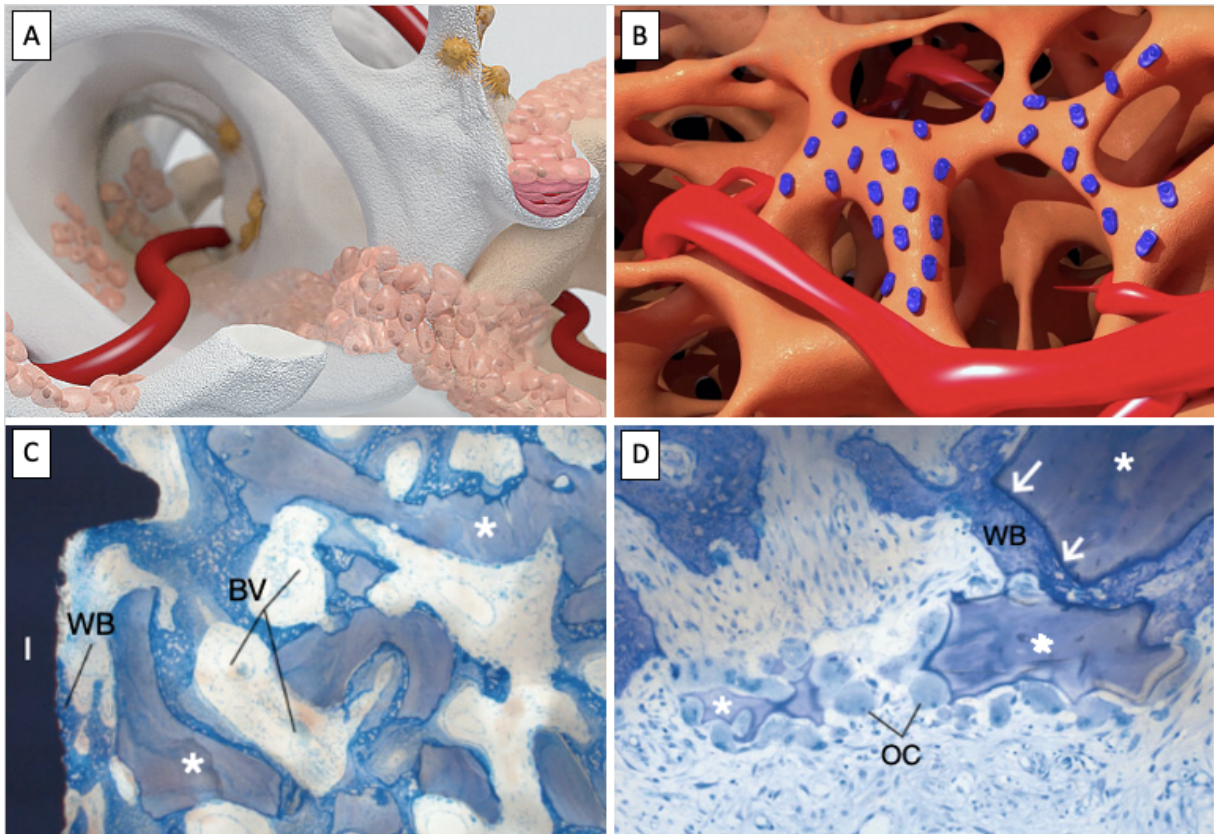


Figure 10. (A, B) Schematics of bone ingrowth on DBBM bone. Proliferation of osteogenic cells and formation of blood vessels into macro-scale pores. (C) Formation of woven bone (WB) and blood vessels (BV) surrounding the DBBM (*) after 6 weeks of bone healing. (D) Details on the integration between DBBM (*) particles and branches of woven bone (WB) and the high number of blood vessels (BV) and multiple multinucleated osteoclast-like cells (OC). Adapted from Jensen SS. et al. (26).

Studies have shown that osteogenic cells with size ranging between 10 and 50 μm size prefer macro-scale pores a round 200 μm leading to an enhanced bone formation (13,15) (6,7,15). In osteogenesis, osteoblasts and pre-osteoblasts present in the material stimulate an ossification reaction (Figure 10). Therefore, porous materials work as a scaffold that allows cell adhesion and formation of blood vessels (4–6,9). Several studies have shown that particle size, porosity and size of the pores strongly influences osteoconduction and new bone quality as well as the migration of osteoblasts and mesenchymal cells into the graft material (6,7,15). Macro-scale pores also allow the infiltration of macrophages to combat bacteria and stimulate the infiltration of blood cells and osteogenic cells. Pro-inflammatory cytokines are also secreted at higher levels in macro-scale pores, that can trigger bone healing. On the other hand, smaller pores decrease the cell aggregation and proliferation although micro-scale pores are associated with a hypoxic state

that stimulates endothelial cell proliferation (27). Micro-scale pores are retaining spots for the retention and gradually delivery of molecules, minerals, and proteins such as bone morphogenic proteins (BMP) and growth factors (27). Additionally, micro-scale pores are retentive regions for the adhesion and spreading osteogenic cells.

Regarding the HDBG assessed in the present study, granules were found ranging from 375 up to 1500 μm (Figure 5). Clusters of small fragments were detected on the surface of dentin granules at x200 magnification (Figure 4B). Small fragments affect the magnitude of inflammatory response that is also dependent on the bioactivity and resorption rate of the fragments. A previous study reported that particles of partially demineralized dentin matrix (PDDM) or completely demineralized dentin matrix (CDDM) of larger size (800-1200 μm) showed enhanced bone formation when compared with granules at smaller size (180-212 μm or 425-600 μm). However, PDDM or CDDM granules were reabsorbed even before bone formation began. Adequate rate of resorption and bone formation were recorded for small granules of highly mineralized bone substitutes such as DBBM or HDBG. Indeed, the balance between matrix resorption and bone formation is vital for enhanced bone healing (19).

As seen in Figures 5 and 7, HDBG granules showed only the presence of micro-scale pores as a result from the dentin tubules. Micro-scale pores derived from dentinal tubules of 1-3 μm (6,8,18) are too small for cell infiltration and growth. However, dentinal tubules of HDBG granules are enlarged after the deproteinizing procedures and can serve as channels to exchange of proteins and ions from blood fluids which are essential for osteoblast growth and differentiation (8). Micro-scale pores are still important for the pathways of adsorption and delivery of molecules, minerals, and proteins including growth factors. In osteoinduction, chemotactic materials capable of attracting other cells such as BMP can induce migration and differentiation of mesenchymal cells into chondroblasts or osteoblasts. Limited porous granules work as an impermeable wall that prevents cell infiltration and vascularization (7,18) and therefore the formation of blood vessels could occur only among the granules since the minimum distance was recorded at 250 μm . A previous study promoted macro-scale pores at 1 mm in diameter in root dentin matrix blocks that enhanced active bone growth (18). The increase in the pores' size and overall macro-scale porosity induced the osteoconductivity of the scaffold leading to adequate space for the fixation, differentiation, and proliferation of osteoblasts (8).

Regarding the proportion of granules into a putty mixture, a decrease of DBBM or HDBG provided a large distance among particles leading to a contact osteogenesis (Figure 9A). In this study, the distance among DBBM particles at a 1:3 ratio (DBBM/hydrogel) ranged from 250 up to 1000 μm while a 1:1 ratio (DBBM/hydrogel) provide distances at a range from 125 up to 500 μm . The distance among HDBG particles in the 1:3 ratio (HDBG/hydrogel) ranged from 125 up to 1100 μm while a 1:1 ratio (HDBG/hydrogel) provide distances at a range from 125 up to 625 μm . A large distance among particles provides a high content of the hydrogel which is rapidly absorbed leading to a high shrinkage of the tissue during the bone healing process. A short distance among particles below 1 mm is proper for the performance of osteogenic cells and the pathways of bone healing by contact osteogenesis (Figure 9B). According to some studies, spaces among granules of around 300 to 500 μm promoted a higher bone formation when compared with spaces of 50 to 100 μm among granules (6). Spaces among granules must be wider than 100 μm for adequate formation of vessels and new bone (13). Taking into account the literature data, an increase in the bone substitute content in putty mixture provide proper spaces among granules. Thus, an increase in DBBM or HDBG in the mixture also maintain the bone volume for further oral rehabilitation procedures.

In our study, the space between the bone graft particles was considered two-dimensional and measured as such. Therefore, future studies should consider a three-dimensional space assessment, as well as other options to determine the amount of materials needed for successful bone formation. A Micro-CT analysis allows the analysis of density, volume and surface area of materials in 3D. As it is an in vitro study, our study has limitations that go through the lack of cells, proteins and ions necessary for bone remodeling to occur. Thus, it would be important to carry out cell cultures of osteoblasts and macrophages to evaluate their behavior and viability in the bone graft. The analysis of the adsorption and release of ions and proteins by the bone graft material is also an important parameter and can be done using atomic force microscopy (AFM) and mass spectrometry. It would also be important to evaluate particles of different sizes for the same defect fill size. Furthermore, the use of a collagen hydrogel would be important to observe its interaction with the graft material and the behavior of the cells.

6. Conclusions

Within the limitations of the present in vitro study, the concluding remarks can be drawn as follow:

- Deproteinized bone biomaterial mineral (DBBM) and human dentin-derived bone graft (HDBG) can be produced with particles' size at similar dimensions ranging from 350 up to 1600 μm . However, some particles (granules) can reach small or higher dimensions considering the processing parameters;
- The size of pores of DBBM granules were found at macro-scale dimensions ($\sim 50\text{-}460\ \mu\text{m}$) as well as at micro-scale dimensions ($\sim 0.3\text{-}0.7\ \mu\text{m}$). On HDBG, the pores were found only at micro-scale dimensions (1-3 μm) that was represented by dentin tubules. Micro-scale pores are important for adsorption of proteins and adhesion followed by spreading of osteogenic cells while macro-scale pores are crucial for angiogenesis and bone formation;
- The distance of particles was higher (around 1 mm) for mixtures containing a high content of alginate-based hydrogel. The decrease of DBBM or HDBG negatively affect the mechanical stability of the bone defects. Also, the lower content of bone substitute can induce the tissue shrinkage during the bone healing process. Thus, an increase in the content of bone substitute in the mixture maintain the bone volume for further oral rehabilitation procedures.

References

1. Santos A, Botelho J, Machado V, Borrecho G, Proença L, Mendes JJ, et al. Autogenous Mineralized Dentin versus Xenograft granules in Ridge Preservation for Delayed Implantation in Post-extraction Sites: A Randomized controlled clinical trial with an 18 months follow-up. *Clin Oral Implant Res*. 2021 Aug;32(8):905–15.
2. Chen CL, Tien HW, Chuang CH, Chen YC. A comparison of the bone regeneration and soft-tissue-formation capabilities of various injectable-grafting materials in a rabbit calvarial defect model. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2019;107(3):529–44.
3. Zhang Y, Li Z, Guan J, Mao YJ, Zhou P. Hydrogel: A potential therapeutic material for bone tissue engineering. *AIP Adv* [Internet]. 2021;11(1). Available from: <https://doi.org/10.1063/5.0035504>
4. Kuchler U, Heimel P, Stähli A, Strauss FJ, Luza B, Gruber R. Impact of dbbm fragments on the porosity of the calvarial bone: A pilot study on mice. *Materials (Basel)*. 2020;13(21):1–9.
5. Fujioka-Kobayashi M, Marjanowski SD, Kono M, Katagiri H, Miron RJ, Schaller B. In vitro comparison of macrophage polarization and osteoblast differentiation potentials between granules and block forms of deproteinized bovine bone mineral. *Materials (Basel)* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2021 Nov 27];13(12):1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32545502>
6. JW N, MY K, SJ H, Nam J-W, Kim M-Y, Han S-J, et al. Cranial bone regeneration according to different particle sizes and densities of demineralized dentin matrix in the rabbit model. *Maxillofac Plast Reconstr Surg* [Internet]. 2016 Dec;38(1):27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27441186/>
7. Antunes AA, Grossi-Oliveira GA, Martins-Neto EC, Almeida ALG De, Salata LA. Treatment of circumferential defects with osseoconductive xenografts of different porosities: a histological, histometric, resonance frequency analysis, and micro-CT study in dogs. *Clin*

Implant Dent Relat Res. 2015 Jan;17 Suppl 1:e202-20.

8. Um I-W, Kim Y-K, Mitsugi M. Demineralized dentin matrix scaffolds for alveolar bone engineering. *J Indian Prosthodont Soc.* 2017;17(2):120–7.
9. Fujioka-Kobayashi M, Katagiri H, Kono M, Schaller B, Iizuka T, Safi AF. The impact of the size of bone substitute granules on macrophage and osteoblast behaviors in vitro. *Clin Oral Investig.* 2021 Aug 1;25(8):4949–58.
10. Paknejad M, Rokn A, Rouzmeh N, Heidari M, Titidej A, Kharazifard MJ, et al. Histologic evaluation of bone healing capacity following application of inorganic bovine bone and a new allograft material in rabbit calvaria. *J Dent (Tehran).* 2015 Jan;12(1):31–8.
11. Klüppel LE, Antonini F, Olate S, Nascimento FF, Albergaria-Barbosa JR, Mazzonetto R. Bone repair is influenced by different particle sizes of anorganic bovine bone matrix: A histologic and radiographic study in vivo. *J Craniofac Surg.* 2013;24(4):1074–7.
12. Laass A, Eisner B, Hämmerle C, Jung R, Thoma D, Benic G. Histologic Outcomes After Guided Bone Regeneration of Peri-implant Defects Comparing Individually Shaped Block Versus Particulate Bone Substitutes. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2020 Jul;40(4):519–27.
13. Davies J. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ.* 2003;67(8):932–49.
14. P F, T L, A A-A, L A, C D, Farzad P, et al. Integration of Dental Implants in Conjunction with EDTA-Conditioned Dentin Grafts: An Experimental Study. *Dent J [Internet].* 2021 Jun;9(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34206029/>
15. JL C-G, A B-M, P NDA, M F-D, S AG, P C-DP, et al. Particulated, Extracted Human Teeth Characterization by SEM-EDX Evaluation as a Biomaterial for Socket Preservation: An in vitro Study. *Mater (Basel, Switzerland) [Internet].* 2019 Jan;12(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30691075/>
16. FS T, S T, R S, M T, Tabatabaei FS, Tatari S, et al. Surface characterization and biological properties of regular dentin, demineralized dentin, and deproteinized dentin. *J Mater Sci*

- Mater Med [Internet]. 2016 Nov;27(11):164. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27655430/>
17. G L, Y W, Y Y, Z L, J L, X G, et al. Dentin-Derived Inorganic Minerals Promote the Osteogenesis of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: Potential Applications for Bone Regeneration. *Stem Cells Int* [Internet]. 2020;2020:8889731. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33293964/>
 18. Kabir MA, Murata M, Shakya M, Yamada K, Akazawa T. Bio-absorption of human dentin-derived biomaterial in sheep critical-size iliac defects. *Materials (Basel)*. 2021;14(1):1–10.
 19. Koga T, Minamizato T, Kawai Y, Miura KI, Takashi I, Nakatani Y, et al. Bone regeneration using dentin matrix depends on the degree of demineralization and particle size. *PLoS One*. 2016;11(1):1–12.
 20. Kabir MA, Murata M, Akazawa T, Kusano K, Yamada K, Ito M. Evaluation of perforated demineralized dentin scaffold on bone regeneration in critical-size sheep iliac defects. *Clin Oral Implants Res*. 2017 Nov 1;28(11):e227–35.
 21. Gurumurthy B, Griggs JA, Janorkar A V. Optimization of collagen-elastin-like polypeptide composite tissue engineering scaffolds using response surface methodology. *J Mech Behav Biomed Mater* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2021 Nov 29];84:116–25. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.04.019>
 22. Lopes-Rocha L, Ribeiro-Gonçalves L, Henriques B, Özcan M, Tiritan ME, Souza JCM. An integrative review on the toxicity of Bisphenol A (BPA) released from resin composites used in dentistry. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2021;109(11):1942–52.
 23. Deschamps IS, Magrin GL, Magini RS, Fredel MC, Benfatti CAM, Souza JCM. On the synthesis and characterization of β -tricalcium phosphate scaffolds coated with collagen or poly (D, L-lactic acid) for alveolar bone augmentation. *Eur J Dent*. 2017;11(4).
 24. Messous R, Henriques B, Bousbaa H, Silva FS, Teughels W, Souza JCM. Cytotoxic effects of submicron- and nano-scale titanium debris released from dental implants: an integrative review. *Clin Oral Investig*. 2021 Feb;

25. Tafur-Zelada CM, Carvalho O, Silva FS, Henriques B, Özcan M, Souza JCM. The influence of zirconia veneer thickness on the degree of conversion of resin-matrix cements: an integrative review. *Clin Oral Investig*. 2021;25(6):3395–408.
26. Jensen SS, Aaboe M, Janner SFM, Saulacic N, Bornstein MM, Bosshardt DD, et al. Influence of particle size of deproteinized bovine bone mineral on new bone formation and implant stability after simultaneous sinus floor elevation: A histomorphometric study in minipigs. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2015;17(2):274–85.
27. Abbasi N, Hamlet S, Love RM, Nguyen NT. Porous scaffolds for bone regeneration. *J Sci Adv Mater Devices* [Internet]. 2020;5(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2020.01.007>

Anexos

Anexo 1: Comunicações Científicas em Congressos na Forma de Poster

Combination of bone graft materials and type I collagen to enhance bone healing

Inês S. Pimentel¹, Ana H. Borges¹, João Caramês², Júlio C. M. Souza^{*1}

¹University Institute of Health Sciences (IUCS), CESPU, Gandra, Portugal; *email: julio.souza@iucs.cespu.pt

²School of Dentistry, University of Lisbon, Portugal

Introduction

Following tooth extraction, bone grafts are commonly used to prevent incomplete healing and to optimize the surgical site for implant placement. Several particulate, composite, and putty-like bone grafting materials either with or without a membrane have been used as grafts materials (1-3). Anorganic bone matrix (ABM) composed of hydroxyapatite (Fig. 1), has become widely used as a bone xenograft leading to rapid vascular and hard tissue ingrowth (3-6). The osteoinductive process occurs as a result of exposure of bone morphogenic proteins during the allograft demineralization process. The incorporation of collagen type I or protein-like peptides has been studied to improve bone healing (7-10) (Fig. 2).

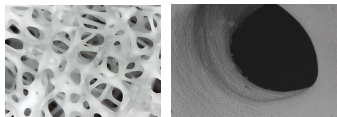


Fig 1. Scanning electron microscopy (SEM) images of a xenograft material (Courtesy of Osmed, Portugal).



Fig 2. Sinus augmentation using PepGen P-15 Putty.

Hypothesis and aim

It was hypothesized that the addition of type I collagen or protein-like peptides into xenogenic bone graft materials can enhance the bone healing process.

The main aim of this study was to perform an integrative review on the combination of collagen and bone graft materials to enhance the bone healing.

Methods and Materials

Identification

- Search on PUBMED
- Key terms: "Collagen AND putty or xenograft or xenogenic graft bovine bone AND bone healing or bone regeneration;"
- Total of articles: 54

Screening

- Duplicates: 15
- Selected articles by title and abstract: 39

Eligibility

- Inclusion criteria: articles in English language involving the combination xenograft materials and collagen to enhance bone healing; in vitro and in vivo studies.

Included

- Selected articles: 10

Fig 3. Schematics on the search strategy.

Results

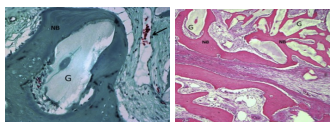


Fig 4. Histomorphometric analysis.

- Dense graft particles were surrounded by newly formed vital bone in an interconnecting trabecular pattern, lined with an active osteoblastic layer (4).
- The presence of multinucleated cells (arrows) invading the graft particles, suggestive of an ongoing resorptive process (Fig. 4, left).
- Goldenar's stain demonstrated angiogenesis and new bone formation (Fig. 4, right).

Table I. Measurements (mean values +/- standard deviation) at 6 months – inter-group comparison: (8)

Parameters	Test (n=20)	Control (n=20)	P
Mean PPD reduction (mm)	4.15±1.04	3.25±0.84	<0.05*
Mean CAL gain (mm)	3.10±1.71	2.60±1.46	0.328
Mean RDD reduction (mm)	1.90±0.72	0.63±0.53	<0.001**
Defect resolution (%)	50.06	16.73	<0.001**

*Statistically significant difference at P<0.05. **Statistically highly significant at P<0.001. PPD – Probing depth; CAL – Clinical attachment level; GR – Gingival recession; RDD – Radiographic defect depth; n – Number of sites treated for each group; P – P value

Results

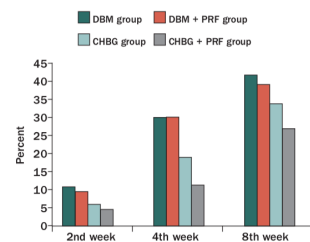


Fig. 5 Quantitative analysis of bone formation area. DBM - Demineralized bone matrix; PRF - Platelet-rich fibrin; CHBG - Collagenated heterologous bone graft. (10)

Tooth #	Time (Months)	Vital Bone	RBG
45	4	17%	38%
23	6	22%	26%
13	6	19%	24%
11	6	24%	20%
35	5	26%	26%
33	6	26%	22%
44	4	18%	32%
15	6	21%	28%
24	6	27%	18%
25	6	22%	23%

Fig 6 Vital Bone and Residual Graft values for the BO Group (anorganic bovine bone substitute). (3)

Conclusion

The combination of xenogenic bone graft and collagen (putty graft) has proven to be a promising material for bone healing once the xenograft maintain the bone volume and the collagen enhance the biological response. The bone fill achieved in a short time frame by the putty graft material is highly encouraging for its use as bone augmentation material in periodontal and implant dentistry.

References

- (1) Fassbender et al. Int Orthop. 2014; 38(9):1963-9
- (2) Schmitz. Tex Dent J. 2013; 130(1):21-9
- (3) Mahesh et al. J Oral Implantol. 2015; 41(2):178-83
- (4) Ennam et al. Int J Oral Maxillofac Surg. 2015; 44(10):1287-94
- (5) Neiva et al. J Periodontol. 2008; 79(2):291-9
- (6) Banjar et al. Int J Periodontics Restorative Dent. 2013; 33(5):567-73
- (7) Mishra et al. Journal of Indian Society of Periodontology. 2019; 23(1):42-47
- (8) Artzi et al. J Periodontol. 2006; 77(10):1658-64
- (9) Vance et al. Int J Oral Maxillofac Implants. 2004; 19(4):491-7
- (10) Peker et al. Int J Oral Maxillofac Implants. 2016; 31(2):24-31



Anexo 2: Publicações Científicas

Artigos Científicos

Biomateriais sintéticos e xenógenos com alto potencial clínico para reparo tecidual

Ana Vieira Borges¹, Inês Teixeira-Pimentel¹, Oscar Carvalho², Bruno Henriques^{2,3}, Filipe Silva², Hassan Bousbaa¹, João Caramês⁴, Júlio C. M. Souza^{1,2*}

¹Instituto Universitário de Ciências da Saúde (IUCS), CESPU, 4585-116 Gandra PRD, Portugal

²Center for Microelectromechanical Systems (CMEMS-UMINHO), University of Minho, 4800-258 Guimarães, Portugal

³Programa de Pós-graduação em Engenharia Mecânica, Departamento de Engenharia Mecânica (EMC), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

⁴Faculdade de Medicina Dentária, Universidade de Lisboa, Lisboa, 1649-003, Portugal

* j.souza@dem.uminho.pt

Resumo

Introdução: O objetivo do presente trabalho foi realizar uma revisão da literatura sobre o uso de biomateriais de origem animal (xenógeno) e sintética para o reparo do tecidual. Diferentes materiais cerâmicos e poliméricos sintéticos e xenógenos são aplicados para o reparo ósseo. Dentre os cerâmicos, a mistura de hidroxiapatite e β -TCP (60-70/40-30 wt%), apatite carbonada e hidroxiapatite de origem bovina ou suína são comumente aplicados, no entanto a taxa de absorção dos materiais sintéticos é lenta quando comparado ao processo de cicatrização na presença dos xenógenos. Além disso, a resposta biológica de materiais sintéticos ainda é inferior à resposta aos materiais xenógenos. Tendo em consideração os diversos polímeros, os materiais xenógenos (ex. colagénio, quitosana) têm apresentado uma resposta biológica mais adequada quando comparado aos sintéticos (ex. PLGA, PLDLA). A cicatrização tecidual óssea é um processo que envolve fases de migração celular, deposição de proteínas e minerais, formação vascular, e desenvolvimento de tecidos conectivo e ósseo. O desenvolvimento de polímeros sintéticos com taxa de absorção adequada ao processo de reparo tecidual associada a uma alta bioatividade e promoção da angiogénese tem sido o alvo de estudos recentes. Além disso, combinação de sintéticos e xenógenos também torna-se uma alternativa com alto potencial de sucesso clínico.

Palavras-chave: Biomateriais, sintéticos, xenógeno, reparo tecidual.

Summary

Introduction The main aim of the present study was to perform a literature review on the use of xenogenic and synthetic biomaterials for tissue healing. Regarding ceramic materials, hybrid hydroxyapatite and β -TCP (60-70/40-30 wt%), apatite carbonate, demineralized bovine bone mineral (DBBM) are ordinary bone graft materials. However, the absorption rate and biologic response of synthetics is slower than those for xenogenic graft materials. Regarding several polymers, xenogenic materials (e.g. collagen, chitosan) have shown a biologic response proper for tissue healing when compared to synthetic polymers (e.g. PLGA, PLDLA). Thus, the bone healing involves cell migration, protein and mineral adsorption, angiogenesis, and the tissue formation. The development of synthetic polymers with a bio-absorption rate in synergism with the tissue healing and angiogenesis has been the focus of recent studies. Therefore, the combination of synthetic and xenogenic graft materials become a strategy for enhanced tissue healing.

Keywords: Biomaterials, polymers, ceramics, bone graft, tissue healing.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o desenvolvimento tecnológico de materiais compatíveis com os tecidos do corpo humano, denominados biomateriais, tem mobilizado mundialmente grupos multidisciplinares de pesquisadores e indústrias trabalhando para obter as características necessárias para aplicação como: alta compatibilidade com os tecidos do corpo humano; alto desempenho; conforto e menor custo financeiro ao paciente (Palmer, L.C., et al. 2008; Arcos, D. et al. 2009; Vallet-Regí, M. & Arcos, D., 2008; Uchino, T., et al. 2010; Talebian et al. 2019). Diversos biomateriais baseados em metais (ex. titânio), cerâmicas (ex. zircônia, hidroxiapatite e β -TCP), polímeros (ex. PLGA, PEEK, celulose) e compósitos (ex. PLGA/Hidroxiapatite) estão disponíveis no mercado sendo aplicados em várias áreas

da Medicina (Palmer, L. C., Newcomb, C. J., Kaltz, S. R., Spoerke, E. D. & Stupp, 2008; Korzinskas, T. et al., 2018).

A reabsorção e remodelação óssea alveolar que ocorre em áreas após extrações dentárias, infecções ou traumas podem causar limitações dimensionais para a instalação de implantes osseointegráveis (Davies, J. E., 2003; Albrektsson, T. & Johansson, 2001). Apesar da sua alta previsibilidade, o uso de enxertos autógenos (tecido ósseo do próprio paciente) para estas reconstruções apresenta grandes desvantagens com relação à quantidade limitada de osso disponível nas áreas doadoras, e às frequentes morbidades e complicações associadas à sua remoção (Pretorius, P.J., et al. 2005; Chiapasco, M., et al. 2009). A busca por biomateriais que possam atuar de maneira semelhante ao osso autógeno, promovendo ao



mesmo tempo osteocondução, osteoindução e osteogênese, fomenta pesquisas na Engenharia de tecidos com resultados promissores ao associar os seguintes aspectos: biomateriais para arcabouços (*scaffolds*); fatores de crescimento; e células estaminais capazes de se diferenciarem em osteoblastos e consequentemente formar tecido ósseo (Griffin, L.C., et al, 2016). Os arcabouços são atualmente desenvolvidos à base de hidroxiapatite e β -TCP, com o objetivo de apresentarem os seguintes requisitos: alta biocompatibilidade, permitir adesão, migração e proliferação celular, facilitar a invasão vascular bem como dar suporte à angiogênese, devem permitir a sinalização bioquímica intercelular, devem possuir propriedades mecânicas semelhantes ao osso, e taxa de reabsorção correspondente ao reparo ósseo (Albrektsson, T. & Johansson, C., 2001; Jones, J. R., 2009; Kinoshita, Y. & Maeda, H., 2013). Estes tipos de estruturas para enxertos necessitam de grande avanço tecnológico para atingir os resultados esperados.

O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão narrativa da literatura sobre recentes biomateriais sintéticos e xenógenos com alta capacidade de reparo tecidual.

2. CERÂMICAS BIOATIVAS

O osso é composto por uma porção inorgânica maioritariamente 33% de cálcio e aproximadamente 17% de fosfato, formando cristais de hidroxiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) em aproximadamente 70% em peso aglomerado por uma matriz orgânica à base de fibras de colagénio e proteínas. A hidroxiapatite (HAp) sintética pode ser obtida através do processamento do fosfato de cálcio. Além disso, o fosfato de cálcio sintético tem uma similaridade química com a componente mineral dos ossos e dentes dos mamíferos, o que potencializa o seu uso como um material de substituição óssea (Palmer, L.C., et al, 2008; Arcos et al, 2009; Brogini et al, 2015; Veis, A.A., et al, 2004; Canillas et al, 2017). Sendo assim, os compostos à base de fosfatos de cálcio têm sido utilizados com diferentes formas e funcionalidades no campo biomédico (Brogini et al, 2015; Canillas et al, 2017). As principais razões para o seu vasto uso são a bioatividade, estímulo celular (osteocondução), e formação vascular (angiogénese), o que conduz a uma ligação físico-química íntima entre o implante e o osso. Vários trabalhos de implantes à base de fosfato de cálcio, na forma de *scaffold* ou partículas, demonstraram a sua capacidade para fins de reparo ósseo e suporte na adesão dos osteoblastos.

Várias formas de HAp sintética não reproduzem exatamente a estrutura dos cristais naturais de HAp de osso, no entanto, eles são absorvidos pelo organismo a uma taxa que depende da estrutura, composição química e área de superfície específica do biomaterial (Antoniac, I., 2016). A HAp tem uma maior estabilidade no meio aquoso do que outras cerâmicas de fosfato de cálcio dentro de um pH que varia de 4.2 até 8, sendo que estequiometria determina esta estabilidade. Variações na proporção de Ca/P (1.67) podem levar ao aparecimento de diferentes fases. O α - ou β -TCP podem estar presentes após o processamento se a razão Ca/P for menor que 1.67 (Best et al, 2015; Canillas et al, 2017). Sendo a razão Ca/P maior que 1.67, óxido de cálcio (CaO) pode formar-se junto com a fase de HAp (Best et al, 2015). A presença de diferentes fases podem adversamente afetar a formação de tecido ósseo e na taxa de absorção do biomaterial. No entanto, é necessário combinar a

taxa de absorção do biomaterial com o reparo de tecido ósseo esperado. Compostos à base de TCP com a razão Ca/P de 1.5, são mais rapidamente absorvidas do que a HAp. Têm sido investigadas misturas de HAp e TCP, conhecidas como fosfato de cálcio bifásico (BCP), como substitutos ósseos; entretanto, a taxa de absorção pode ser acelerada com a maior presença de TCP (Best et al, 2015; Canillas et al, 2017).

O β -TCP é amplamente utilizado como substituto ósseo, no entanto o comportamento do TCP no ambiente corporal é afetado não apenas pelo conteúdo da fase, mas também pela porosidade da cerâmica. Grânulos porosos bioativos e absorvíveis constituem as formas comerciais usadas para preencher defeitos ósseos (Sheikh, Z. et al., 2015; Uchino, T. et al., 2010). O material deve ser modelado com poros interconectados e hierárquicos dentro da escala micro- e macrométrica. A estrutura óssea exibe uma porosidade hierárquica que varia de um micron a centenas de microns. Na concepção de materiais porosos para reparo ósseo, é muito importante ter em consideração a porosidade hierárquica que pode ser encontrada na natureza. Ao imitar uma estrutura porosa hierárquica, esses materiais podem desempenhar um papel similar aos materiais naturais porosos (Vallet-Regí, M. & Ruiz-Hernández, E., 2011; Jones, J. R., 2009). Quanto à aplicação de biomateriais, é necessário atender aos fatores que regem a formação de novo osso. Três elementos são críticos na reparação e regeneração óssea: migração de células osteogénicas, presença de fatores de crescimento para osteoindução, e espaço necessário para a angiogénese (Vallet-Regí, M. & Ruiz-Hernández, E., 2011). Portanto, existem vários elementos a considerar, com dimensões muito diferentes: ossos com poros em microescala; apatita nanométrica (25-50 nm); células, proteínas, péptidos, e fatores de crescimento ósseo (Vallet-Regí, M. & Ruiz-Hernández, E., 2011). Os cristais de apatita formam-se a partir de núcleos de mineralização ao redor de moléculas de colagénio e agregadas em fibras de colagénio. No entanto, uma das principais limitações do fosfato de cálcio é a sua baixa resistência mecânica, especialmente pela sua fragilidade e resistência à fadiga. Isto é ainda mais evidente para cerâmicas e *scaffolds* bioativos altamente porosos, onde os poros ultrapassam 100 μm (Arcos et al, 2009; Dechamps et al, 2017).

Os vidros bioativos também têm a capacidade de reparar defeitos ósseos devido à sua capacidade de estabelecer ligações químicas com o tecido ósseo e interagir com o ambiente circundante (Ohtsuki, C., Kamitakahara, M. & Miyazaki, T., 2009; Liu, X., Chu, P. & Ding, C., 2004). O primeiro material cerâmico de vidro bioativo desenvolvido foi o Bioglass, que é composto em peso por 45% de SiO_2 , 24.5% de CaO , 24.5% de Na_2O , e 6% de P_2O_5 , e, portanto, denominado 45S5. Estudos anteriores relataram as propriedades e o desempenho de vários tipos de cerâmicas bioativas, como fosfatos de cálcio, tais como hidroxiapatite sintetizada $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, vitrocerâmica de apatita-volastonita e cimentos de fosfato de cálcio.

A história do Bioglass começou em 1969, quando o professor Larry Hench avaliou os enormes custos relativos ao tratamento de feridas de amputação durante a Guerra do Vietname (Best et al, 2015; Canillas et al, 2017). Alguns anos depois, Hench e colaboradores (Hench et al, L., 1991) relataram que a formulação específica do sistema $\text{Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$ com a adição de B_2O_3 e CaF_2 resultou numa ligação forte e

aderente ao osso (Best, S. M., Porter, A. E., Thian, E. S. & Huang, J., 2008). O diagrama da fase de equilíbrio de $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2$ mostra um eutético ternário próximo da composição 4555, que foi a base original para a seleção de tal composição para investigação (Best et al., 2015; Canillas et al., 2017). Testes *in vitro* mostraram que a composição de 4555 sofre uma reação superficial que ocorre muito rapidamente. A reação superficial é um processo complexo de vários estágios que resulta na formação de uma camada de apatita de hidroxycarbonato (HCA) biologicamente ativa. A fase HCA é química e estruturalmente semelhante à fase mineral óssea e, portanto, fornece uma ligação direta ao unir o tecido do hospedeiro com o biomaterial particulado (Best et al., 2015; Canillas et al., 2017). A magnitude da ligação óssea e a força e a estabilidade da ligação variam com a composição e microestrutura dos materiais bioativos. Hench et al. (Hench, L. L., 1991) relataram que, para a sua formulação específica de BG usando o processamento de vidro derivado de fusão, o osso formou uma rápida ligação quando os níveis de sílica estavam na faixa de 42% a 53%; vidros com 54% a 60% de sílica requerem 2-4 semanas para a adesão do osso, e o osso não formou uma ligação direta com o vidro contendo mais do que 60% de sílica.

3. SCAFFOLDEPARTIGULADOS CERÂMICOS XENÓGENOS PARA REPARO ÓSSEO

Um xenoinxerto é um material de substituição proveniente de uma espécie animal diferente do recetor. Atualmente, diversos xenoinxertos de tecido ósseo são comercializados para o manejo de defeitos ósseos periodontais e procedimentos de aumento ósseo, como terapia de implantes. As fontes de matriz óssea variam desde espécies bovinas, porcinas, equinas e mesmo de exosqueletos de certas espécies de corais marinhos (Galarraga-Vinueza, M.E. et al., 2017; Fujjoka-Kobayashi, M. et al., 2017). Os materiais xenogénicos têm a vantagem de serem uma fonte altamente bioactiva e incapaz de promover uma reação inflamatória excessiva. Além disso, são considerados seguros na indução de respostas imunológicas e transmissão de doenças, desde que o processo laboratorial seja adequado. No entanto, apesar de desprezível, o risco potencial de transmissão de doença (encefalopatia espongiiforme bovina) não é completamente eliminado (Ohtsuki, C. et al., 2017; Jones et al., 2009; Kinoshita, Y.

& Maeda, H., 2013).

O xenoinxerto mais comumente utilizado no mercado é o mineral ósseo desproteínizado de origem bovina (DBBM). Esta matriz óssea inorgânica é obtida após a eliminação dos componentes orgânicos do osso bovino medular por meio de tratamentos químicos e térmicos eficientes (Gardin, C., et al., 2015). O DBBM consiste principalmente em hidroxiapatite (HAp) e preserva a porosidade do tecido ósseo natural. A estrutura porosa ocupa 75% de todo o volume, proporcionando o ambiente ideal para a vascularização e nova adesão óssea. Desta forma, atua como um material osteocondutor ao fornecer uma matriz estável que permite a proliferação das células da linha osteoblástica do hospedeiro, os osteoblastos, para a deposição de novo osso (Kinoshita, Y. & Maeda, H., 2013; Ohtsuki, C., Kamitakahara, M. & Miyazaki, T., 2009; Galarraga-Vinueza, M. E. et al., 2017; Hum, J. & Boccaccini, A. R., 2012).

O DBBM é um material bastante utilizado no aumento ósseo da crista alveolar e no preenchimento de defeitos intraósseos devido à sua capacidade de manutenção do volume por apresentar um potencial de reabsorção limitado. Estudos reportam uma quantidade significativa de DBBM residual após anos de reparo ósseo (Hum, J. & Boccaccini, A., 2012; Broggin, N., et al., 2015). A diminuição da altura é cerca de 10%, apresentando uma excelente resistência à pneumatização do seio maxilar (Hum, J. & Boccaccini, A. R., 2012). Noutro estudo realizado também se verifica a manutenção do volume de tecido no qual DBBM foi utilizado (Ohtsuki, C. et al., 2009). Em análise microscópica do tecido 3 meses após o enxerto (Figura 1), foram observadas partículas de material xenogénico rodeadas por tecido conjuntivo denso, altamente celular e com a presença de infiltrado inflamatório granulomatoso composto por linfócitos, células plasmáticas e macrófagos. No entanto, na análise realizada no tecido 6 meses após o enxerto (Figura 1), foi encontrado um tecido conjuntivo denso, no qual havia fragmentos de partículas de biomateriais xenogénicos. Nas regiões periféricas é possível observar-se a deposição de material basófilo, indicando a formação de partículas minerais e tecido mineralizado (Ohtsuki, C., Kamitakahara, M. & Miyazaki, T., 2009).

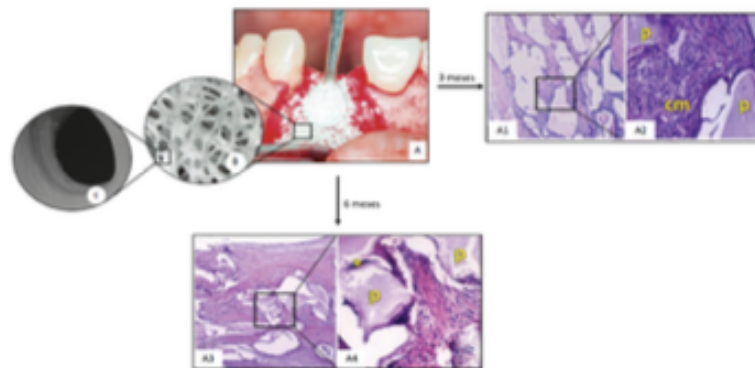


Figura 1: Biomaterial A: Preenchimento de defeitos ósseos com DBBM. B e C - Imagens SEM das partículas de DBBM, cortesia de Osmed, Portugal. A1 e A2 - Imagens histológicas da matriz óssea desproteínizada de osso bovino 3 meses após o enxerto; A3 e A4 - Imagens histológicas da matriz óssea desproteínizada de bovino 6 meses após o enxerto (Ohtsuki, C., Kamitakahara, M. & Miyazaki, T., 2009).

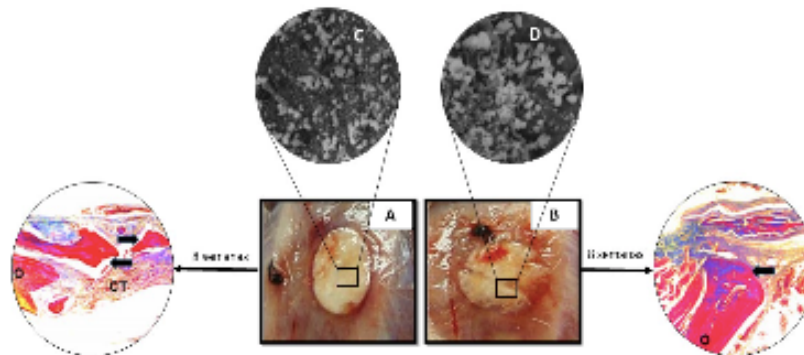


Figura 2: Defeitos ósseos calvariais de rato cobertos por membrana derivada de pericárdio e membrana derivada de serosa intestinal (A e B, respectivamente); Imagens SEM da superfície das membranas (C e D), ampliação 5000x; fotomicrofotografia das margens do defeito ósseo (BD) e formação de tecido ósseo novo (seta) e tecido conjuntivo (CT) em redor do osso original (O), 8 semanas pós-cirurgia. (Hirata et al (2015)).

4. POLÍMEROS E HIDROGÉIS BIOATIVOS

Os hidrogéis são materiais constituídos por polímeros sintéticos ou naturais que foram concebidos para imitar as propriedades naturais da matriz extracelular (ECM), nomeadamente o suporte mecânico e a libertação de fatores de crescimento (GF) implicados na regeneração tecidual. Estes materiais encerram a vantagem de poderem ser produzidos à medida pretendida, ou mesmo polimerizados *in situ* (Oliveira, M. B., Bastos, H. X. S. & Mano, J. F., 2018).

Polímeros de origem natural, como gelatina e quitosana, têm uma biocompatibilidade mais elevada, tornando-os mais atrativos do que polímeros sintéticos. A gelatina é uma proteína natural que deriva da hidrólise do colagénio da ECM que, por isso, contém a sequência peptídica arginina-glicina-aspartato (RGD) responsável pela adesão celular e exibe antigenicidade limitada (Talebian, S. et al, 2019; Hwang, J.W., et al, 2016). De igual forma, a quitosana é um aminopolissacarídeo derivado da desacetilação de quitina, composto por glucosamina unida a N-acetilglucosamina por ligações β-(1-4) glicosídicas. Devido à sua origem natural e tal como a gelatina, apresenta elevada biocompatibilidade, fácil degradação e baixa toxicidade, caracterizando-se adicionalmente pela termossensibilidade: gelifica à temperatura fisiológica, podendo ser um material injetável com potencial para polimerização *in situ* (Fu, J., Yang, F. & Guo, Z., 2018; Min, Q. et al, 2019). A adição de outras substâncias permite otimizar as propriedades mecânicas do hidrogel (Santo, V. E., Gomes, M. E., Mano, J. F. & Reis, R. L., 2012). Por exemplo, Nie et al demonstrou que a adição de nanopartículas bifásicas de fosfato de cálcio (BCP-NPs) a hidrogéis de quitosana-gelatina permitiram a sua otimização física, no que resultou em um aumento da concentração dos BCP-NPs associado a um aumento da resistência a forças compressivas. Este estudo comprovou também *in vivo* a capacidade osteogénica dos hidrogéis de quitosana (Nie, L. et al, 2019).

Poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) é um copolímero fabricado a partir de ácidos láctico (LA) e glicólico (GA), que tem sido adotado em bioengenharia de tecidos devido à

sua excelente biocompatibilidade, taxas de degradação controláveis, termossensibilidade e adequadas mecânicas (Sun, X., et al, 2017; Li, G., et al, 2015; Gentile, P., et al, 2014). Embora sintético, este polímero não apresenta toxicidade significativa e é eliminado pelas vias de degradação naturais, devido à sua estrutura química simples (Gentile, P., et al, 2014), fator que pode ser negativo por levar a uma hidrólise ou metabolização celular demasiado rápida das membranas de PLGA (Korzinskas, T. et al, 2018). O PLGA tem, no entanto, poucos grupos bioativos, o que limita a sua osteocondutividade e osteoindutividade, problema que pode ser solucionado através da adição, por exemplo, de partículas cerâmicas, como hidroxiapatite (Hap) (Sun, X., Xu, C., Wu, G., Ye, Q. & Wang, C., 2017). Rahman et al demonstraram que também a adição do fator de proteína morfogenética óssea (BMP-2), fator de crescimento com elevada osteoindutividade, a hidrogéis de PLGA/polietilenoglicol (PEG) revelou um aumento de significativo (55%) de crescimento ósseo *in vivo* relativamente ao volume ósseo formado na ausência de BMP-2 (31%) (Rahman, C.V., et al, 2014).

Um polímero sintético utilizado no fabrico de membranas de barreira não-absorvíveis, as quais têm como desvantagem a necessidade de uma segunda cirurgia para a sua remoção, é o politetrafluoretileno (PTFE), que se caracteriza pela excelente biocompatibilidade e por ser relativamente rígido, conferindo maior eficácia à sua função de impedir o crescimento de tecido conjuntivo na área de crescimento ósseo (Korzinskas, T. et al, 2018). Apesar destas membranas poderem ser expandidas (e-PTFE) ou densas (n-PTFE), apenas as últimas continuam a ser comercializadas, uma vez que a sua porosidade é comparativamente menor, não apresentando, por isso, o mesmo risco de infeção quando expostas ao ambiente oral e permitindo assim uma regeneração óssea bem-sucedida (Soldatos, N. K. et al, 2017). Num estudo comparativo de membranas de PTFE e PGA/PLA, Simion et al demonstraram que a densidade óssea obtida utilizando as membranas não absorvíveis era significativamente superior à das absorvíveis, sugerindo que as primeiras serão mais adequadas quando um aumento vertical de osso é requerido (Simion, M., et al, 1996).



Outro polímero sintético, não tóxico, solúvel em água é o álcool polivinílico (PVA), um derivado da hidroxilação parcial ou total do acetato polivinílico. Diversos estudos *in vivo* confirmaram a sua biocompatibilidade, sendo utilizado por exemplo no fabrico de lentes de contacto (Baker, M.J., et al, 2012; Song, W., et al, 2012; Li, G., et al, 2015). Devido às ligações hidrogénio entre os diversos grupos hidroxilo e aos micro-núcleos cristalinos, esta substância pode comportar-se como um gel antes de lhe ser aplicado um método de polimerização, dependendo da sua concentração e peso molecular. Desta forma, a polimerização reforça esta estrutura, tornando os hidrogéis de PVA fisicamente mais resistentes (Li, G., et al, 2015). Song et al desenvolveram um hidrogel composto de PVA associado a hidroxiapatite (HAp) e colagénio tipo I (Col) que revelou uma resposta inflamatória diminuída devido à adição destas duas substâncias ao PVA. A fraca adesão celular do PVA foi também compensada pela presença de HAp (Song, W., et al, 2012).

Poliétileno glicol (PEG) é outro polímero sintético que tem sido utilizado em vários estudos e é um material vastamente utilizado em regeneração óssea guiada (GBR), devido à sua biocompatibilidade, ausência de imunogenicidade e propriedades físicas versáteis (Dreifke, M. B., Ebraheim, N. A. & Jayasuriya, A. C., 2013). No entanto, é um polímero notoriamente conhecido pela baixa taxa de adesão celular devido à superfície lisa dos hidrogéis resultantes, pelo que a adição da sequência de péptidos RGD é um exemplo de uma modificação frequente, para facilitar as ligações célula-gel. Como já tinha sido demonstrado previamente com hidrogéis de PVA, foi também confirmado por Yang et al que a presença da sequência peptídica RGD em gel de PEG, além de uma maior adesão celular, promove também a diferenciação osteogénica (Yang, F. et al, 2005).

5. MEMBRANAS XENÓGENAS PARA REPARO ÓSSEO

O colagénio está presente em vários tecidos xenógenos, razão pela qual surgiu interesse em produzir-se membranas de colagénio a partir de diversos tecidos animais. Por exemplo, Maurer et al avaliaram quatro tipos de membranas derivadas de tecido suíno: centrum tendineum (CT), pericárdio (PE), prega da veia cava (PL) e submucosa de intestino delgado (SIS), verificando a sua aplicabilidade em regeneração óssea (Maurer, T. et al, 2018). Também Pettian et al produziram uma membrana de colagénio a partir da camada serosa de intestino bovino e avaliaram a sua capacidade de reparação óssea *in vivo*, num modelo de ratos com defeito ósseo craniano. A partir de análise morfológica, os autores verificaram um aumento significativo de volume ósseo nos grupos de teste (Pettian, M. S. et al, 2018), resultados em conformidade com aqueles obtidos por Hirata et al num estudo semelhante, em que analisaram membranas da serosa intestinal e membranas de pericárdio de bovino (Hirata, H. H. et al, 2015).

Também a derme apresenta características favoráveis: Fujioka-Kobayashi et al avaliaram a capacidade osteogénica de membranas derivadas de derme suína (PDCM) e de membranas derivadas de pericárdio suíno (PPCM), em conjugação com fatores de crescimento (rhBMP-2 e rhBMP-9). Os testes *in vitro* realizados indicaram uma adsorção de 90% das proteínas às membranas e que a sua libertação ocorreu gradualmente ao longo de 10 dias (Fujioka-Kobayashi, M. et al, 2017). Embora

os resultados mostrem uma maior adesão celular nas PDCM, o potencial osteogénico das membranas foi eficazmente aumentado em ambas com esta associação, especialmente na presença de rhBMP-950.

Um exemplo específico de uma membrana xenógena muito utilizada é a Bio-Gide®, uma membrana patenteada de colagénios tipo I e III de origem suína com vasta evidência de incrementar a ossificação (Schlegel, A.K., et al, 1997; Wu, H. & Hu, G., et al, 2007). Wu et al verificaram a degradação precoce da membrana de colagénio comercial (Wu, H. & Hu, G., et al, 2007). Num modelo testado em defeitos ósseos de mandíbula de coelho, os autores compararam a eficiência da membrana de pericárdio bovino relativamente à eficiência de uma membrana de colagénio comercial na formação de tecido ósseo. Não só o novo osso se revelou histologicamente mais uniforme quando formado na presença da membrana de pericárdio bovino, como o reparo ósseo foi significativamente mais elevada neste grupo (82%) do que na presença da membrana de colagénio comercial (76,35%), a qual se verificou completamente degradada logo na 8ª semana (Wu, H. & Hu, G., 2007).

Assim, dada a preferência atribuída às membranas bioabsorvíveis, e atendendo à rápida degradação das membranas de colagénio, vários estudos *in vitro* e *in vivo* reforçam as vantagens das membranas de colagénio derivadas de pericárdio, pela sua estrutura em multicamada que retarda a degradação do colagénio. Este é um tecido de natureza elástica, tomando-o de fácil manuseio e ideal para ser aplicado em GBR, de forma a impedir a invasão de tecidos não-osteogénicos competitivos na zona do defeito ósseo (Maurer, T. et al, 2018; Bai, M. et al, 2014). A biocompatibilidade destes materiais xenógenos está, no entanto, dependente da sua purificação, pelo que vários protocolos têm vindo a ser desenvolvidos nesse âmbito, de forma a manter apenas a estrutura tridimensional e a ECM acelular do pericárdio (Gupta, S. & Gupta, D., 2014; Gardin, C. et al, 2015). A fixação destas membranas com glutaraldeído após a purificação já demonstrou vantagens adicionais, como otimização das suas propriedades mecânicas, sem apresentar citotoxicidade. Bai et al realizaram testes *in vitro* e *in vivo* em que foram comparadas as características mecânicas de membranas de pericárdio não purificadas e membranas de pericárdio tratadas com glutaraldeído. As últimas não demonstraram citotoxicidade e apresentaram adicionalmente maior rigidez após o procedimento (Bai, M., et al, 2014). Neste estudo, a aplicação da membrana em defeitos ósseos de mandíbula de coelho revelou-se eficaz no aumento de deposição de tecido mineralizado (Bai, M. et al, 2014). No entanto, num outro estudo *in vivo*, Miguel et al compararam a performance de membranas de pericárdio bovino com (ACSHGA) e sem tratamento de glutaraldeído (ACSH), tendo-se observado maiores osteo e angiogénese no grupo ACSH (Miguel, F. B. et al, 2013).

O pericárdio suíno, apesar de conter menor percentagem de colagénio do que o bovino, apresenta valores de calcificação semelhantes. Num modelo de defeito tibial em coelhos, Hwang et al verificaram que a aplicação de membrana de pericárdio acelular, sem utilização de agentes de fixação, demonstrou ser uma membrana de barreira eficaz até 3 meses após a cirurgia, promovendo a osteogénese (Hwang, J.W., et al, 2016). Na medicina dentária, a sua aplicabilidade é suportada por vários artigos. Merli et al descreveram um caso clínico de aumento



ósseo lateral anterior a colocação de implantes em que foi utilizada, num dos defeitos ósseos, uma membrana de pericárdio suína comercial, contrapondo uma membrana de colágeno de origem suína no lado oposto. A regeneração total, após 6 meses, verificou-se apenas nos locais em que a membrana de pericárdio foi aplicada (Merli, M. et al., 2015). Também um estudo realizado por Jimbo et al procurou verificar a eficiência das membranas pericárdicas suínas na osteointegração de implantes colocados imediatamente após extração. No grupo de teste as membranas foram colocadas sobre os implantes e local da osteotomia e em seis semanas verificou-se histologicamente que, não só no grupo controlo ocorreu perda óssea, como o contacto osso-implante (45%) era significativamente maior nos sujeitos tratados com a membrana (75%), reforçando a aplicabilidade da membrana de pericárdio suíno em reparo ósseo (Jimbo, R. et al., 2012).

6. CONCLUSÕES

Tendo em consideração dados relevantes na literatura, diferentes biomateriais têm sido desenvolvidos para acelerar o processo de reparo ósseo. A mistura de hidroxiapatite e β -TCP (60-70/40-30 wt%), apatite carbonada e hidroxiapatite de origem bovina e suína são comumente aplicados no reparo ósseo. Entretanto, a taxa de absorção dos materiais sintéticos é lenta quando comparado ao processo de cicatrização na presença dos xenógenos. A resposta biológica de materiais sintéticos ainda é inferior a resposta aos materiais xenógenos. Em relação aos diversos polímeros, materiais xenógenos (ex. colágeno, quitosana) tem apresentado uma resposta biológica mais adequada quando comparado aos sintéticos (ex. PLGA, PLDLA). O desenvolvimento de polímeros sintéticos com taxa de absorção adequada ao processo de reparo tecidual associada a uma alta bioatividade e promoção da angiogênese tem sido o alvo de estudos recentes. Além disso, combinação de sintéticos e xenógenos também torna-se uma alternativa com alto potencial de sucesso clínico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albrektsson, T. & Johansson, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur. Spine J.* **10**, 596–5101 (2001).

Antonic, I. *Handbook of Bioceramics and Biocomposites*. (Springer International Publishing, 2016). doi:10.1007/978-3-319-12460-5

Arcos, D., Izquierdo-Barba, I. & Vallet-Regí, M. Promising trends of bioceramics in the biomaterials field. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **20**, 447–455 (2009).

Bai, M. et al. Guided bone regeneration using acellular bovine pericardium in a rabbit mandibular model: in-vitro and in-vivo studies. *J. Periodontol.* **49**, 499–507 (2014).

Baker, M. L., Walsh, S. P., Schwartz, Z. & Boyan, B. D. A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.* **100**, 1451–1457 (2012).

Best, S. M., Porter, A. E., Thian, E. S. & Huang, J. Bioceramics: Past, present and for the future. *J. Eur. Ceram. Soc.* **28**, 1319–1327 (2008).

Broggini, N. et al. Bone healing around nanocrystalline hydroxyapatite, deproteinized bovine bone mineral, biphasic calcium phosphate, and autogenous bone in mandibular bone defects. *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.* **103**, 1478–1487 (2015).

Canillas, M., Pena, P., de Aza, A. H. & Rodríguez, M. A. Calcium phosphates for biomedical applications. *Boletín la Soc. Española Cerámica y Vidr.* **56**, 91–112 (2017).

Chiapasco, M., Casentini, P. & Zaniboni, M. Bone augmentation procedures in implant dentistry. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **24**

Suppl. 237–259 (2009).

Davies, J. E. Understanding peri-implant endosseous healing. *J. Dent. Educ.* **67**, 932–49 (2003).

Deschamps, I. S. et al. On the synthesis and characterization of β -tricalcium phosphate scaffolds coated with collagen or poly (D, L-lactic acid) for alveolar bone augmentation. *Eur. J. Dent.* **11**, (2017).

Dreifke, M. B., Ebraheim, N. A. & Jayasuriya, A. C. Investigation of potential injectable polymeric biomaterials for bone regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. A* **101**, 2436–2447 (2013).

Fu, J., Yang, F. & Guo, Z. The chitosan hydrogels: from structure to function. *New J. Chem.* **42**, 17162–17180 (2018).

Fujitaka-Kobayashi, M. et al. Comparison of Two Porcine Collagen Membranes Combined with rhBMP-2 and rhBMP-9 on Osteoblast Behavior *In vitro*. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **32**, e221–e230 (2017).

Galarrraga-Vinueza, M. E. et al. Anti-biofilm properties of bioactive glasses embedding organic active compounds. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **105**, 672–679 (2017).

Galarrraga-Vinueza, M. E. et al. Inhibition of multi-species oral biofilm by bromide doped bioactive glass. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **105**, 1994–2003 (2017).

Gardin, C. et al. Decellularization and Delipidation Protocols of Bovine Bone and Pericardium for Bone Grafting and Guided Bone Regeneration Procedures. *PLoS One* **10**, e0132344 (2015).

Gentile, P., Chiono, V., Camagnola, I. & Hatton, P. V. An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 3640–3659 (2014).

Griffin, M., Kalaskar, D., Seifalian, A. & Butler, P. An update on the Application of Nanotechnology in Bone Tissue Engineering. *Open Orthop. J.* **10**, 836–848 (2016).

Gupta, S. & Gupta, D. Guided bone regeneration with Pericardium membranes. *JOSR J. Dent. Med. Sci.* **13**, 61–65 (2014).

Hench, L. L. Bioceramics: From Concept to Clinic. *J. Am. Ceram. Soc.* **74**, 1487–1510 (1991).

Hirata, H. H. et al. Feasibility study of collagen membranes derived from bovine pericardium and intestinal serosa for the repair of cranial defects in ovariectomized rats. *Injury* **46**, 1215–1222 (2015).

Hum, J. & Boccacini, A. R. Bioactive glasses as carriers for bioactive molecules and therapeutic drugs: a review. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **23**, 2317–2333 (2012).

Hwang, J. W., Kim, S., Kim, S. W. & Lee, J. H. Effect of Extracellular Matrix Membrane on Bone Formation in a Rabbit Tibial Defect Model. *Biomed Res. Int.* **2016**, 6715295 (2016).

Jimbo, R. et al. Bone Morphometric Evaluation around Immediately Placed Implants Covered with Porcine-Derived Pericardium Membrane: An Experimental Study in Dogs. *Int. J. Biomater.* **2012**, 279167 (2012).

Jones, J. R. New trends in bioactive scaffolds: The importance of nanostructure. *J. Eur. Ceram. Soc.* **29**, 1275–1281 (2009).

Kinoshita, Y. & Maeda, H. Recent Developments of Functional Scaffolds for Craniomaxillofacial Bone Tissue Engineering Applications. *Sci. World J.* **2013**, 1–21 (2013).

Korzinskas, T. et al. *In vivo* Analysis of the Biocompatibility and Macrophage Response of a Non-Resorbable PTFE Membrane for Guided Bone Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).

Li, G., Zhang, H., Fortin, D., Xia, H. & Zhao, Y. Poly(vinyl alcohol)-Poly(ethylene glycol) Double-Network Hydrogel: A General Approach to Shape Memory and Self-Healing Functionalities. *Langmuir* **31**, 11709–16 (2015).

Liu, X., Chu, P. & Ding, C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. R Reports* **47**, 49–121 (2004).

Maurer, T. et al. Structural characterization of four different naturally occurring porcine collagen membranes suitable for medical



- applications. *PLoS One* **13**, e0205027 (2018).
- Merli, M. et al. Membranes and Bone Substitutes in a One-Stage Procedure for Horizontal Bone Augmentation: A Histologic Double-Blind Parallel Randomized Controlled Trial. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.* **35**, 463–471 (2015).
- Miguel, F. B. et al. Regeneration of critical bone defects with anionic collagen matrix as scaffolds. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **24**, 2567–2575 (2013).
- Min, Q. et al. Sequential Delivery of Dual Growth Factors from Injectable Chitosan-Based Composite Hydrogels. *Mar. Drugs* **17**, (2019).
- Nie, L. et al. Development of chitosan/gelatin hydrogels in incorporation of biphasic calcium phosphate nanoparticles for bone tissue engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **30**, 1636–1657 (2019).
- Ohtsuki, C., Kamitakahara, M. & Miyazaki, T. Bioactive ceramic-based materials with designed reactivity for bone tissue regeneration. *J. R. Soc. Interface* **6 Suppl 3**, S349–60 (2009).
- Oliveira, M. B., Bastos, H. X. S. & Mano, J. F. Sequentially Moldable and Bondable Four-Dimensional Hydrogels Compatible with Cell Encapsulation. *Biomacromolecules* **19**, 2742–2749 (2018).
- Palmer, L. C., Newcomb, C. J., Kaltz, S. R., Spörcke, E. D. & Stupp, S. I. Biomimetic systems for hydroxyapatite mineralization inspired by bone and enamel. *Chem. Rev.* **108**, 4754–4783 (2008).
- Pettian, M. S. et al. Use of an anionic collagen matrix made from bovine intestinal serosa for *in vivo* repair of cranial defects. *PLoS One* **13**, e0197806 (2018).
- Pretorius, J. A., Melsen, B., Nel, J. C. & Germishuys, P. J. A histomorphometric evaluation of factors influencing the healing of bony defects surrounding implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **20**, 387–398 (2005).
- Quarto, R. & Giannoni, P. Bone Tissue Engineering: Past-Present-Future. *Methods Mol. Biol.* **1416**, 21–33 (2016).
- Rahman, C. V. et al. Controlled release of BMP-2 from a sintered polymer scaffold enhances bone repair in a mouse calvarial defect model. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **8**, 59–66 (2014).
- Santo, V. E., Gomes, M. E., Mano, J. F. & Reis, R. L. Chitosan-chondroitin sulphate nanoparticles for controlled delivery of platelet lysates in bone regenerative medicine. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **6 Suppl 3**, s47–59 (2012).
- Schlegel, A. K., Möhler, H., Busch, F. & Mehl, A. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide®). *Biomaterials* **18**, 535–538 (1997).
- Sheikh, Z. et al. Mechanisms of *in vivo* Degradation and Resorption of Calcium Phosphate Based Biomaterials. *Materials (Basel)* **8**, 7913–7925 (2015).
- Simion, M., Scarano, A., Gionso, L. & Piattelli, A. Guided bone regeneration using resorbable and nonresorbable membranes: a comparative histologic study in humans. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **11**, 735–742 (1996).
- Soldatos, N. K. et al. Limitations and options using resorbable versus nonresorbable membranes for successful guided bone regeneration. *Quintessence Int.* **48**, 131–147 (2017).
- Song, W., Markeel, D. C., Jin, X., Shi, T. & Ren, W. Poly(vinylalcohol)/collagen/hydroxyapatite hydrogel: properties and *in vitro* cellular response. *J. Biomed. Mater. Res. A* **100**, 3071–3079 (2012).
- Sun, X., Xu, C., Wu, G., Ye, Q. & Wang, C. Poly(Lactic-co-Glycolic Acid): Applications and Future Prospects for Periodontal Tissue Regeneration. *Polymers (Basel)* **9**, (2017).
- Talebian, S. et al. Self-Healing Hydrogels: The Next Paradigm Shift in Tissue Engineering? *Adv. Sci. (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Ger.)* **6**, 1801664 (2019).
- Uchino, T. et al. Hydroxyapatite formation on porous ceramics of alpha-tricalcium phosphate in a simulated body fluid. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **21**, 1921–1926 (2010).
- Vallet-Regí, M. & Arcos, D. Biomimetic nanoceramics in clinical use: from materials to applications. (Royal Society of Chemistry, 2008).
- Vallet-Regí, M. & Ruiz-Hernández, E. Bioceramics: from bone regeneration to cancer nanomedicine. *Adv. Mater.* **23**, 5177–5218 (2011).
- Vets, A. A. et al. Osseointegration of Osseotite and machined titanium implants in autogenous bone graft. A histologic and histomorphometric study in dogs. *Clin. Oral Implants Res.* **15**, 54–61 (2004).
- Wu, H. & Hu, G. [Comparison of acellular bovine pericardium material with collagen membrane in guiding bone regeneration]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* **21**, 743–747 (2007).
- Yang, F. et al. The effect of incorporating RGD adhesive peptide in polyethylene glycol diacrylate hydrogel on osteogenesis of bone marrow stromal cells. *Biomaterials* **26**, 5991–5998 (2005).

