



**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**UTILIZAÇÃO DE MATERIAL DE ORIGEM CORALINA EM  
REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA**

Trabalho submetido por  
**Charley Maurice Ananou**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**Setembro de 2020**





**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**UTILIZAÇÃO DE MATERIAL DE ORIGEM CORALINA EM  
REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA**

Trabalho submetido por  
**Charley Maurice Ananou**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por  
**Prof. Doutor. José Silva Marques**

**Setembro de 2020**



# Agradecimentos

Quero agradecer o meu orientador, o professor José Silva Marques, para a sua ajuda e a sua simpatia assim como a sua disponibilidade e os seus grandes conhecimentos teóricos, que me permitiram realizar um trabalho.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz, aos seus docentes e funcionários, por me ter acolhido e me ter permitido assimilar os conhecimentos da profissão e valores éticos.

Quero agradecer a minha família, o meu pai, a minha mãe e aos meus irmãos e irmãs por todo o apoio que recebi apesar da minha falta de presença durante esses anos.

Aos meus amigos Patou, Roro, Cam, Thom, Dam, Nico, Phil, Juju, Maud, Sarah, Anne-B, Marc, François, Henry, Max, Lélé, Théophile, Mehdi, Kim, Polo, Nassim, Coco, Faust, Théo, Emeline, Myriam por todos os anos que passámos juntos, as nossas festas e nossas atividades.

À João que sempre esteve presente para nos ajudar a nós, franceses. Espero que venha a trabalhar em França.

À Mathieu, alias Ethi, tu que me fizeste rir tanto graças à sua originalidade.

À Claire et Manon, Johny está de volta meninas.

À Alex et Marie que eu não consegui ver tanto quanto queria.

À Laura, com quem descobri centenas de coisas, que me abriu os olhos e que sempre acreditou em mim. Ficarás nos meus pensamentos. Obrigado por todo o amor que me deu.



## Resumo:

A perda óssea, fisiológica ou patológica, é um processo inerente à vida do ser humano. O envelhecimento, o trauma, doenças infecciosas, degenerativas ou oncológicas, entre outros fatores, motivam a necessidade de terapêuticas regenerativas do tecido duro mineralizado especializado que designamos por osso, sendo esta necessidade por demais premente nas estruturas maxilares, onde avultam especialmente razões relacionadas com os dentes e os seus tecidos de suporte.

Procedimentos regenerativos ósseos podem incluir a utilização de osso autólogo, produtos modificados com origem em osso humano ou animal, e ainda materiais naturais ou de síntese, todos com diferentes capacidades e desempenhos, o que motiva o estudo aturado por forma a otimizar a sua utilização.

Pesquisas desenvolvidas permitiram a identificação e a purificação de extratos de coral, produzindo biomateriais com capacidades regenerativas sobre o tecido ósseo.

**Palavra-chaves:** Biomateriais; Regeneração óssea guiada; Regeneração tecidual guiada; Coral



## Abstract

Bone loss, physiological or pathological, is an inherent process in human life. Aging, trauma, infectious, degenerative or oncologic diseases, among other factors, motivate the need for regenerative therapies of the specialized mineralized hard tissue that we call bone, being this need too urgent in the maxillary structures, where there are especially reasons related to the teeth and their supporting tissues.

Bone regenerative procedures can include the use of autologous bone, modified products from human or animal bone, and also natural or synthetic materials, all with different capacities and performances, which motivate the thorough study in order to optimize its use.

Researches developed have allowed the identification and purification of coral extracts, producing biomaterials with regenerative capacities over bone tissue.

**Keywords:** Biomaterials; Guided bone regeneration; Guided tissue regeneration; Coral



# Índice geral

Resumo: .....	1
Abstract.....	3
Índice geral .....	5
Índice de figuras .....	7
Lista de siglas .....	9
Introdução .....	11
Desenvolvimento .....	13
1) Tecido e biologia óssea .....	13
1.1) As células ósseas.....	13
1.1.1) As células osteoprogênicas .....	13
1.1.2) Os osteoblastos .....	14
1.1.3) Os osteócitos.....	14
1.1.4) Os osteoclastos .....	15
1.2) Matriz óssea .....	16
1.2.1) As fibras de colágeno.....	16
1.2.2) As proteínas não colágenicas .....	17
1.2.3) A parte mineral .....	17
1.3) Reconstrução óssea .....	18
1.3.1) Osteogenicidade.....	19
1.3.2) Osteocondução .....	20
1.3.3) Osteoindução.....	20
2) Materiais utilizados na regeneração óssea guiada.....	23
2.1) Objectivo da regeneração óssea guiada .....	23
2.2) As membranas .....	24
2.2.1) Membranas não reabsorvíveis .....	25
2.2.2) Membranas reabsorvíveis .....	27
2.2.2.1) As membranas de colágeno.....	28
2.2.2.2) As membranas sintéticas .....	29
2.3) Materiais de enxerto ósseo .....	30
2.3.1) Os autoenxertos.....	30
2.3.2) Os aloenxertos.....	31
2.3.3) Os xenoenxertos.....	32
2.3.4) Os materiais aloplásticos.....	34
3) Utilização do coral em medicina dentária .....	37
3.1) Características do coral.....	37

3.1.1) Apresentação Biologica e histologica do coral .....	37
3.1.2) Características físico-química .....	40
3.1.3) Princípios de reformação óssea a partir de materiais coralina .....	42
3.2) Aplicação preclínica e clínica .....	43
3.2.1) Hidroxiapatite coralina .....	45
3.2.2) Composito de colagénio-hidroxiapatite .....	47
3.2.3) Materiais à base de carbonato de cálcio coralino .....	47

## Índice de figuras

Figura 1 : Esquema simplificado das diferentes células ósseas (adaptada de Proenem, 2009).....	13
Figura 2 : Esquema de um osteoclasto (adaptada de Catala, 2007) .....	16
Figura 3 : Fases de remodelação óssea (adaptada de Marie, 2001).....	19
Figura 4 : Esquemática de papéis das membranas utilizadas em ROG (adaptada de Meyer, 2012) .....	24
Figura 5 : Membrana de titânio (adaptada de Sagheb, 2017).....	26
Figura 6 : Membrana de titânio fixado com parafusos (adaptada de Butz, 2011).....	26
Figura 7 : Parafusos de osteossíntese na área do futuro enxerto ósseo (adaptada de Butz, 2011).....	27
Figura 8 : Membrana de colagénio (adaptada de Davarpanah, 2014) .....	29
Figura 9 : Organização da estrutura em duas folhas de corais (adaptada de Robin, 1980) .....	38
Figura 10 : Secção longitudinal esquemática representando a estrutura dos pólipos (adaptada de H. Schuhmacher, 1977) .....	39
Figura 11 : Imagem bidimensional dos três espécimes com câmara digital, scanning electron microscope (SEM) e microtomografia (Micro-CT) (adaptada de Wu, 2009)...	41
Figura 12 : Laminas histológicas de controle, de coral e de coral CEM (adaptado de Petite, 2000).....	44
Figura 13 : Imagens radiográficas da substituição óssea como coral + CEM (adaptada de Petite, 2000).....	44
Figura 14 : Resistências biaxiais do coral, coral convertido hidrotermicamente, coral convertido e revestido com hidroxiapatite (adaptada de Ben-Nissan, 2004) .....	46
Figura 15 : Imagens de raios X do paciente com cisto mandibular antes (esquerda) e após 90 dias com enxerto de cHA (direita) (adaptada de McPherson, 2019) .....	46



## Lista de siglas

BCP : fosfato bifásico de cálcio

BMP : proteínas morfogenéticas ósseas

$\beta$ -TCP :  $\beta$ -fosfato tricálcico

HA : hidroxiapatite

IGFs : fatores de crescimento insulínico

PGA : ácido poliglicólico

PLA : ácido polilático

PTFE : polytetrafluoroetileno

ROG : regeneração óssea guiada

RTG : regeneração tecidual guiada



## **Introdução**

Atualmente e tendo em vista possíveis reabilitações protéticas, a perda de osso maxilar é um dos maiores problemas causando a impossibilidade de um tratamento óptimo para o paciente.

A perda óssea associada aos maxilares é um problema conhecido, que ganhou particular relevância com o advento das técnicas de reabilitação com recurso a implantes dentários. Juntamente com necessidades reconstrutivas em cirurgia maxilofacial ou cirurgia oncológica cervicofacial, motivaram a investigação e desenvolvimento de materiais substitutos ósseos otimizados para o complexo bucomaxilofacial, bem como de técnicas cirúrgicas para os utilizar.

Defeitos ósseos isolados, localizados nos maxilares e correlacionados diretamente com a área médico dentária foram descritos na literatura por Abrams em 1980 (um dos primeiros a apresentar um método reconstrutivo envolvendo material de enxerto). (1)

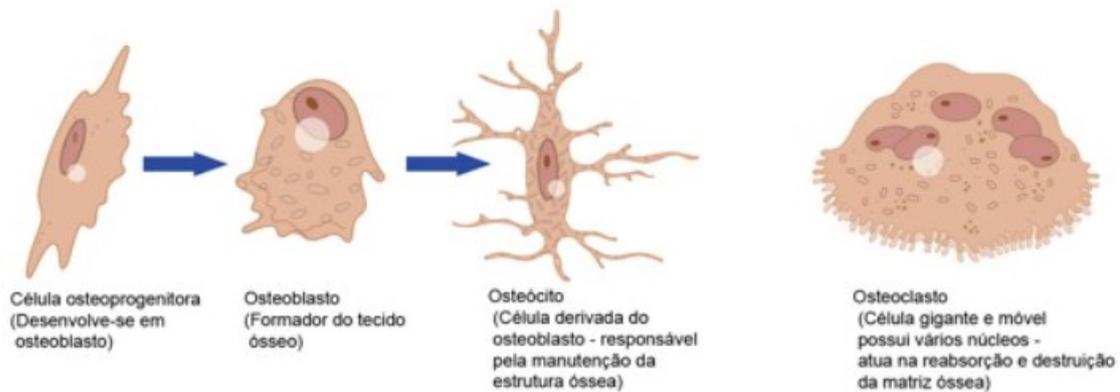


## Desenvolvimento

### 1) Tecido e biologia óssea

#### 1.1) As células ósseas

O osso é um tecido altamente especializado que tem uma função de suporte interno em todos os vertebrados. Este tecido complexo possui uma matriz extracelular mineralizada que lhe permite manter uma estabilidade dimensional. Apesar de ser sólido, o tecido ósseo é um tecido dinâmico, ou existem vários tipos de células ósseas responsáveis pela sua formação, que podem ser divididas em duas famílias em função da sua origem. Os osteoblastos, os osteócitos que derivam de células estaminais mesenquimatosas e as pluripotentes que derivam da linhagem hematopoiética monocítica. (3)



*Figura 1 : Esquema simplificado das diferentes células ósseas (adaptada de Proenem, 2009)*

#### 1.1.1) As células osteoprogenitoras

Estas são células estaminais não especializadas derivadas do mesênquima que se desenvolverão em células ósseas. Estas são as únicas células ósseas capazes de se dividirem. Durante a mitose, uma das duas células filhas continuará a ser uma célula osteoprogenitora enquanto a outra evoluirá para um pré-osteoblasto e depois para um osteoblasto (3)

No osso maduro com baixa renovação, estas células são em forma de fuso, muito

pequenas e localizadas perto da superfície óssea. No entanto, no caso de crescimento ósseo activo ou remodelação intensa, são muito maiores e mais numerosos. (4)

### 1.1.2) Os osteoblastos

Os osteoblastos têm diferentes funções, incluindo a síntese e a mineralização da matriz óssea durante o crescimento do esqueleto. Também permitirão a renovação da matriz óssea em adultos, bem como a reparação desta matriz durante a vida (5).

Os osteoblastos estão presentes de duas formas: uma forma ativa e outra inativa. Na sua forma inativa, os osteoblastos estão presentes como uma monocamada de células esmagadas ou em forma de fuso. Nas suas formas ativas, os osteoblastos têm uma forma cúbica e as interações são preservadas graças ao sistema de junções. A sua ativação será induzida ou por stress mecânico ou por um estímulo hormonal. (5)

Os osteoblastos sintetizam o componente orgânico da matriz óssea, chamado matriz osteóide, que é chamado tecido ósseo após a calcificação e está envolvido na sua mineralização por depósitos de cristais de hidroxiapatite. (5)

### 1.1.3) Os osteócitos

Uma vez que a matriz óssea é sintetizada e mineralizada, a maioria das células aplacam-se e bordejam a superfície óssea. Alguns dos osteoblastos sofrem de apoptose, enquanto os restantes se tornam parte da matriz que sintetizaram, tornando-se osteócitos ligados por uma rede de extensões citoplasmáticas presentes nos canalículos.

As suas extensões citoplasmáticas finas estão ligadas através de junções comunicantes ao prolongamento dos osteócitos vizinhos, aos osteoblastos, às células fronteiriças vizinhas e ao canal ósteon central (6).

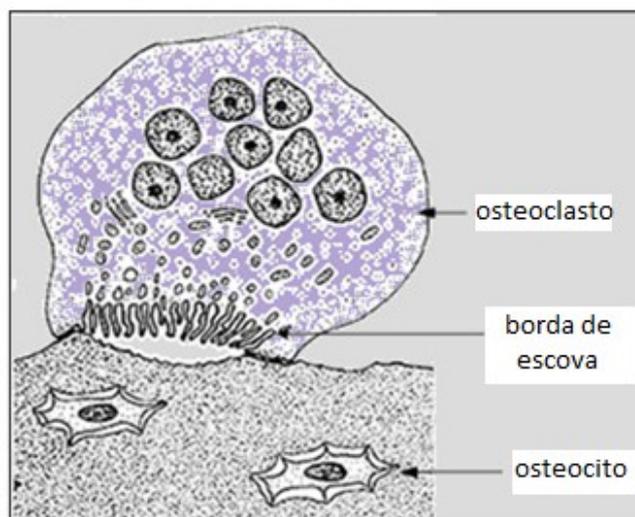
Assim, embora já não segreguem matriz extracelular, os osteócitos desempenham um papel muito importante na manutenção do tecido ósseo e contribuem para a homeostasia do cálcio sérico. (3)

Estas células são também capazes de sintetizar certas moléculas, particularmente em resposta a um estímulo mecânico, e de desempenhar um papel nas trocas de cálcio entre tecido ósseo e sangue. Finalmente, os osteócitos expressam especificamente esclerostina, um poderoso/potente agente que inibe a formação óssea, assim como várias proteínas matriciais. (3)

#### 1.1.4) Os osteoclastos

O osteoclasto maduro é uma célula gigante multinucleada. Caracteriza-se pela presença de fosfatase ácido tartarato resistente (TRAcP) contida nos seus lisossomas, de recetores de calcitonina e também pela sua capacidade de reabsorver a matriz óssea mineralizada.

O pólo basal tem uma membrana plissada denominada bordura de escova em contacto com a qual a matriz é reabsorvida. A reabsorção inicia-se com a adesão do osteoclasto na trave óssea com a formação de uma "bolsa" hermética entre a membrana plissada e o osso em que o osteoclasto liberta iões  $H^+$  graças a uma bomba de prótons. Segue-se a dissolução da fase mineral do tecido ósseo, seguida de uma fase de digestão da matriz de colagénio sob o efeito de enzimas lisossómicas, tais como a catepsina K e as metaloproteínases matriciais libertadas por exocitose. O osso reabsorvido deixa, ao longo do tempo, um espaço para uma lacuna de reabsorção (ou "Howship gap"). O pH ácido desta lacuna promove a atividade destas enzimas. A vida média de um osteoclasto humano é de 2 semanas, após as quais o osteoclasto entra em apoptose (7).



*Figura 2 : Esquema de um osteoclasto (adaptada de Catala, 2007)*

## 1.2) Matriz óssea

É a parte não celular do tecido ósseo, o osteoblasto é responsável pela sua síntese e regula a sua mineralização. A matriz óssea é composta por uma rede extremamente complexa de fibras proteicas de colagénio impregnadas com sais minerais que incluem fosfato de cálcio, carbonato de cálcio e pequenas quantidades de fluoreto de cálcio e fluoreto de magnésio . Os minerais presentes nos ossos apresentam-se principalmente sob a forma de hidroxiapatites. O osso também contém pequenas quantidades de proteínas não colágenas incorporadas na sua matriz mineral, incluindo proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). A matriz óssea é em forma de trabéculas dispostas de forma variada; por vezes, parecem estar organizadas em filas ortogonais, mas muitas vezes estão dispostas de forma aleatória (6).

### 1.2.1) As fibras de colagénio

O colagénio representa 90% da matriz orgânica. É uma glicoproteína, rígida, formando uma tripla hélice, rica em prolina e hidroxiprolina. As fibras de colagénio estão associadas a proteínas não secretadas pelos osteoblastos, a proteínas plasmáticas e fatores de crescimento. Esta matriz recentemente formada, denominado tecido osteoide, é mineralizada numa segunda etapa (7).

### 1.2.2) As proteínas não colagénicas

Representam 10% do tecido orgânico do osso e 2% do peso total do osso. As proteínas não colagénicas podem ser classificadas em três grupos:

- As proteínas ósseas não colagénicas, quantitativamente as mais importantes, que fazem parte integrante da matriz óssea. Algumas são específicas do tecido ósseo, como a osteocalcina, cuja síntese depende da vitamina K. A sua concentração no sangue é utilizada como um indicador da formação óssea.
- As proteínas plasmáticas, que são sintetizadas noutros órgãos e que se acumulam no osso a partir do plasma e dos fluidos intersticiais.
- Os fatores de crescimento, alguns dos quais podem ter sido isolados na matriz óssea, tais como TGF-beta ou certos membros da família dos fatores de crescimento insulínico (IGFs).

As proteínas não colágenicas não só participam na organização macromolecular do tecido ósseo, como também intervêm em muitos processos na fisiologia óssea (mecanismos de mineralização, quimiotatismo celular, fenómenos de ligação entre reabsorção e formação óssea, etc.). (6)

### 1.2.3) A parte mineral

Os minerais no osso consistem principalmente em cristais de hidroxiapatita, que formam depósitos densos ao longo das fibras osteocolágenas. (6)

São formados por pequenas placas hexagonais organizadas em lamelas nas quais são distribuídos os iões OH<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup> e PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>.

Entre as enzimas associadas à diferenciação osteoblástica, a fosfatase alcalina é responsável pela clivagem das ligações organofosfatos que liberta o fosfato inorgânico no meio e participa no processo de mineralização. Está localizada na membrana plasmática dos osteoblastos e o seu local ativo encontra-se disponível a partir da superfície extracelular. Esta enzima é também libertada na circulação sanguínea e o aumento da concentração sérica é um marcador da atividade osteoblástica. (7)

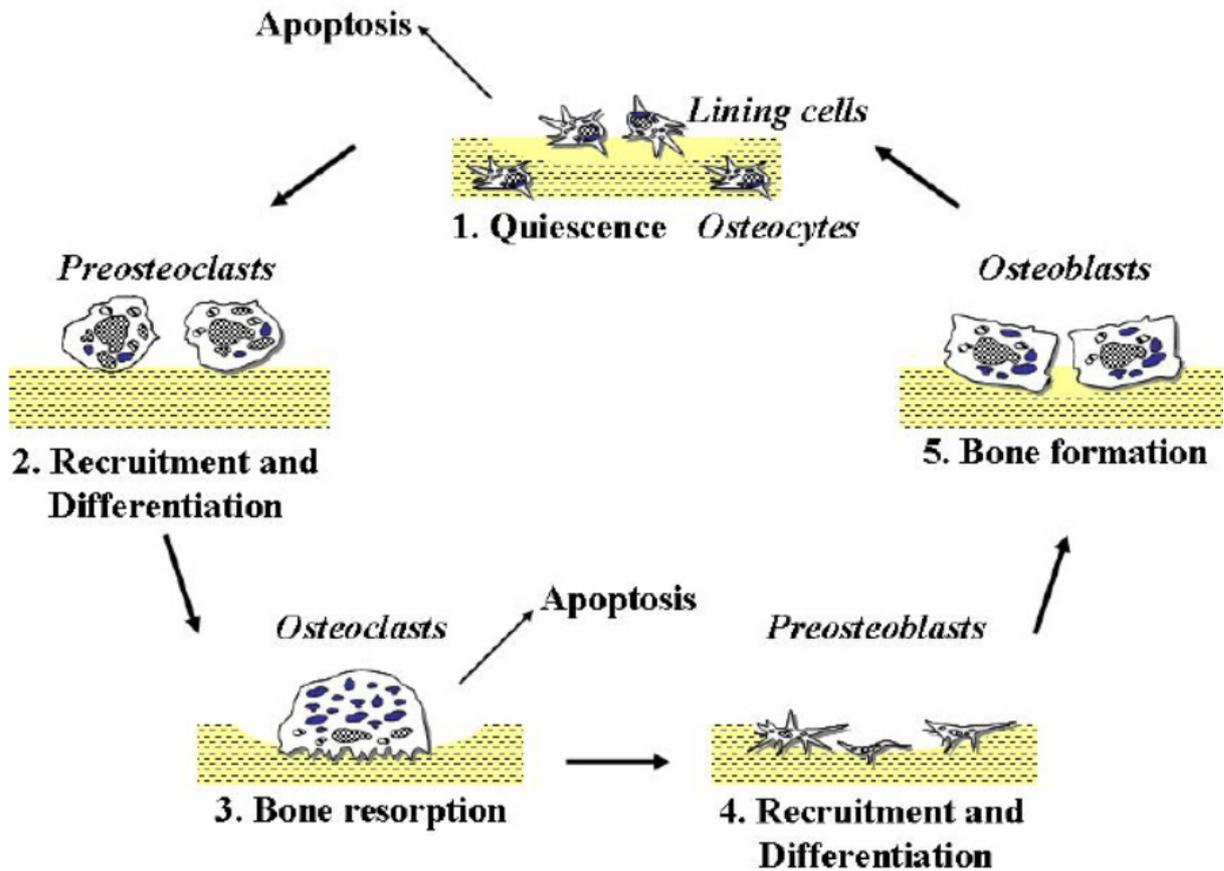
### 1.3) Reconstrução óssea

A reconstrução óssea é um processo dinâmico no qual a matriz óssea mineralizada é constantemente reabsorvida e reconstituída, de modo a assegurar três funções principais ao longo da vida:

- Permite ao organismo regular o equilíbrio mineral (homeostasia do cálcio e do fosfato).
- Adaptação da geometria e da massa óssea às restrições do crescimento, da locomoção e do exercício, reduzindo assim o risco de fratura.
- É também um mecanismo de renovação tecidual e de reparação de microdanos intra-ósseos criados em particular durante o stress cíclico. (77)

Em condições normais, a remodelação óssea mantém um equilíbrio mineral neutro, ou seja, a quantidade de osso remodelado é igual à quantidade de osso removido por reabsorção. No entanto, este equilíbrio pode ser alterado através do aumento de massa óssea, por exemplo durante o crescimento, ou uma perda de massa, especialmente após a menopausa. (77)

A remodelação óssea é o resultado da atividade de um conjunto de células no qual atuam osteoclastos que reabsorvem os ossos antigos e os osteoblastos que afixam uma matriz osteóide que vai mineralizar-se. (77)



*Figura 3 : Fases de remodelação óssea (adaptada de Marie, 2001)*

### 1.3.1) Osteogenicidade

A osteogenicidade refere-se à capacidade de um suporte para promover a formação de novo osso, o que ocorreria na ausência de invasão das células hospedeiras (65).

Um material osteogénico é, portanto, um material com células osteocompetentes capazes de formar tecido ósseo. Por outras palavras, este material fornece osteoblastos viáveis para a neoformação do tecido osteóide e para a sua posterior substituição por tecido ósseo. Assim, as células vivas num enxerto autógeno capaz de formar diretamente osso são osteogénicas (35).

Ao nível do osso autógeno, o material mais capaz de induzir a osteogénese é o osso medular, representando o compartimento com maior densidade celular, que

consequentemente tem o maior potencial osteogénico (contudo é mais difícil de obter e a maioria dos enxertos utilizados em implantologia serão corticais ou cortico-esponjosos) (10,11).

Os enxertos ósseos esponjosos promoverão uma osteogénese mais rápida do que os enxertos corticais porque são mais eficazes para a revascularização e permitem também uma melhor adaptação à localidade cirúrgica e por outro lado, os enxertos corticais têm mais resistência mecânica devido à sua constituição. Serão também fornecedores de proteínas osteoindutoras (Bone Morphogenetic Protein, BMPs) (10,11).

### 1.3.2) Osteocondutividade

A osteocondução refere-se à capacidade de um suporte de promover a fixação de células osteoblásticas na superfície e em todo o interior do suporte (65). Segundo Khoury e Günzl (2006), trata-se da repopulação da parte mineral, ou esqueleto, do enxerto que servirá de suporte para os osteoblastos provenientes do local receptor do enxerto. (9)

De acordo com Valentini e Abensur (2007), o sucesso da osteocondução parece estar fundamentalmente ligado ao respeito de dois imperativos cirúrgicos. Por um lado, para obter o máximo contacto entre o enxerto e o osso do local receptor, e por outro lado para assegurar a perfeita estabilidade do enxerto (13).

### 1.3.3) Osteoindutividade

Segundo Habal (2004), a osteoindução foi entendida como o processo pelo qual o enxerto ósseo mediado quimicamente poderia induzir a formação óssea através do recrutamento de células com potencial de formação óssea.

A osteoindução refere-se à capacidade de um suporte de promover a diferenciação de células estaminais mesenquimais ao longo de uma linhagem

osteoblástica, levando finalmente à formação de tecido mineralizado (65). Segundo Kneser (2002), a osteoindução também pode ser vista como uma capacidade de promover a progressão fenotípica de um osteoblasto desde um osteoblasto precoce até um osteoblasto maduro, seguido de diferenciação para um osteócito.

Exemplo: quando há uma fratura com perda de substância óssea é possível, obter a consolidação por osteoindução e formação óssea em qualquer ponto do hematoma perilesional. Esta propriedade foi revelada pela identificação de fatores osteoindutores dentro da matriz óssea, sendo estes fatores geralmente designados por proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs).

Um material osteoindutor é, portanto, um material contendo fatores de crescimento, incluído os BMPs, os TGFbeta (Transforming Growth Factor beta), e outros, que podem recrutar e causar a diferenciação de células mesenquimais pluripotentes em células osteocompetentes, tais como osteoblastos, induzindo neoformação óssea. Colocado num sítio ectópico na ausência de osso, um material osteoindutor é capaz de induzir neoformação óssea. (10,12)



## **2) Materiais utilizados na regeneração óssea guiada**

### 2.1) Objetivo da regeneração óssea guiada

Qualquer extração dentária resulta em reabsorção fisiológica da crista óssea alveolar com cicatrização de primeira intenção devido ao afastamento das margens da ferida. Segundo Schroeder (1987), o processo de cicatrização depende, em grande, parte da formação de um coágulo sanguíneo a partir dos vasos danificados do rebordo alveolar. Gradualmente, este coágulo deixa espaço para um tecido de granulação, enquanto que a reconstrução óssea começa no fundo do alvéolo. Esta reparação pode demorar entre seis e oito semanas. A reabsorção pode ser acompanhada por uma maior perda de substância em várias circunstâncias.

A regeneração óssea guiada baseia-se nos princípios da regeneração tecidual guiada (RTG) estabelecidos pelo Nyman em 1982. É de facto difícil falar de regeneração óssea guiada (ROG) sem abordar alguns dos conhecimentos sobre RTG.

Melcher (1976) demonstrou a existência de uma competição celular. Podem estar envolvidos quatro tipos de células, as do epitélio gengival, do tecido conjuntivo gengival, do desmodonte ou do tecido ósseo. Os primeiros a diferenciar-se e invadir uma ferida são as células epiteliais e as células do tecido conjuntivo.

Segundo Gottlow (1986), o isolamento por uma barreira (membrana) de uma ferida periodontal após a cirurgia, para evitar a migração apical do epitélio durante o período de cicatrização e para excluir tecido conjuntivo, constitui a base da RTG.

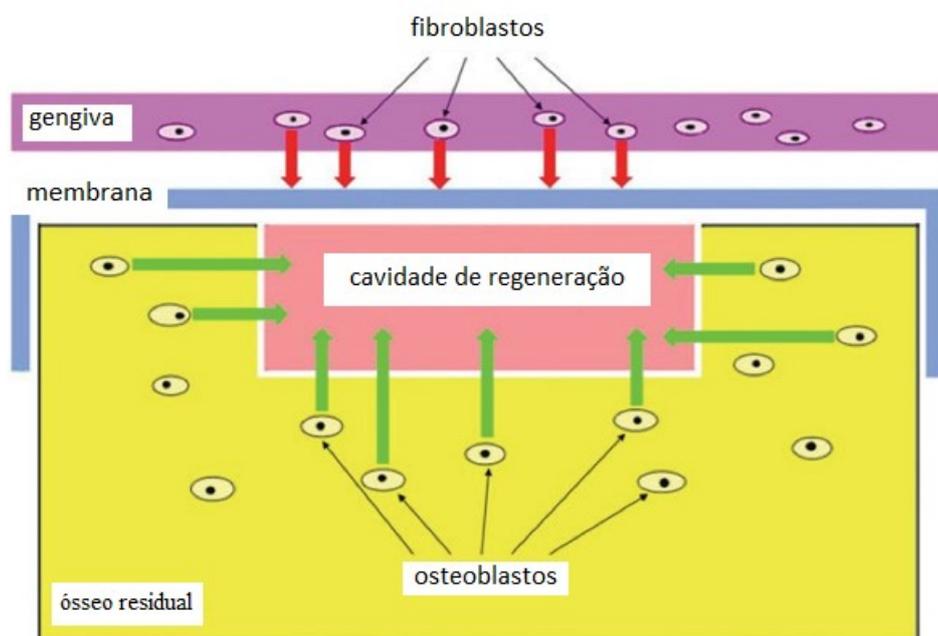
O conceito de regeneração óssea guiada foi baseado na interposição de uma membrana para proteger o coágulo sanguíneo e guiar as células ósseas durante o período de cicatrização. (15,16)

## 2.2) As membranas

Segundo Hardwick (1994), na prática, uma membrana protetora concebida para indicações dentárias deve satisfazer os seguintes critérios: integração do tecido hospedeiro, biocompatibilidade, oclusividade celular, permeabilidade dos nutrientes e facilidade de utilização.

A função primária da membrana é impedir a colonização do coágulo sanguíneo que preenche o defeito pelas células epiteliais limítrofes do defeito durante um período de tempo suficiente para que as células endo-ósseas colonizarem sob a membrana do coágulo. As células epiteliais e conectivas têm ciclos rápidos de 6 a 12 dias em comparação com 3 a 6 meses para os osteoblastos. (24)

Tem duas outras funções importantes que são: orientar as células responsáveis pela regeneração óssea, mas também assegurar a manutenção dos materiais de substituição óssea utilizados. Para tal, deve ser suficientemente rígido para manter o espaço em que a regeneração óssea tem lugar, bem como para manter a sua estabilidade ao longo do tempo, não se degradando demasiado rapidamente para permitir a reestruturação óssea. Relativamente à biocompatibilidade, a membrana deve ser composta por materiais que minimizem o risco de inflamação. (24)



*Figura 4 : Esquematização de papéis das membranas utilizadas em ROG (adaptada de Meyer, 2012)*

### 2.2.1) Membranas não reabsorvíveis

Estas membranas foram as primeiras a ser utilizadas em ROG. As características das membranas não reabsorvíveis são principalmente a inércia biológica, a flexibilidade, a estabilidade química e para algumas delas, a microporosidade assimétrica que permite a passagem de fluidos de origem vascular ao mesmo tempo que impede a passagem de células epitélia conjuntivas.

São geralmente fáceis de manusear, podem ser reforçados com um reforço de titânio, melhorando assim as suas propriedades mecânicas de modo a evitar o colapso do coágulo sanguíneo, são, portanto, indicados na correção de defeitos planos e permanecem no lugar durante muito tempo, permitindo assim uma regeneração a longo prazo.

Por outro lado, este tipo de membrana tem algumas desvantagens tais como: a necessidade de fixação por parafusos e uma segunda intervenção para a remover, assim como o risco de exposição da membrana e a infecção que pode resultar. (18)

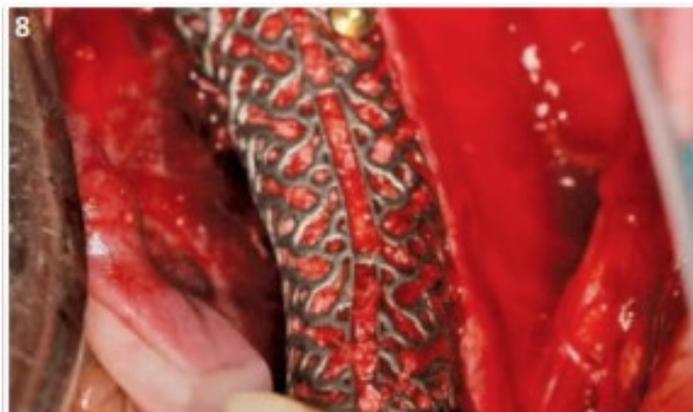
O seu risco de exposição é elevado porque alguns deles impedem a vascularização dos tecidos periféricos e levam à sua necrose e, em caso de operculização, são rapidamente colonizados por bactérias no ambiente oral, o que pode levar à infecção e eventualmente à perda óssea.

Há um grande número de diferentes membranas não reabsorvíveis com capacidades mais ou menos semelhantes, mas as duas mais utilizadas são as membranas PTFE (Polytetrafluoroetileno) e titânio:

A membrana PTFE foi a primeira membrana de regeneração de tecido guiada aprovada para uso clínico nos anos 90 (63). Também utilizado no ROG, tem uma microestrutura que impede o crescimento celular através dele, permitindo ao mesmo tempo a infiltração de fluidos.

Os resultados de experiências com animais mostraram que a regeneração de cimento e osso é relevante. Existe membranas PTFE que têm uma estrutura de duas camadas: a primeira camada, que é porosa e com cerca de 1 mm de espessura, pode promover o crescimento celular, enquanto a segunda camada (espessura 0,15 mm, porosidade de 30% ) atua como um fornecedor de espaço para regeneração, inibindo o crescimento celular epitelial e proporcionando estabilidade estrutural. (64)

Relativamente as membranas de titânio, existem dois tipos principais utilizadas no ROG, as membranas pré-formadas e as que podem ser moldadas de acordo com o defeito ósseo a preencher. As membranas de titânio pré-formadas têm a vantagem de ter uma resistência à compressão superior às que podem ser adaptáveis e, portanto, proporcionam uma melhor proteção para o enxerto (25).



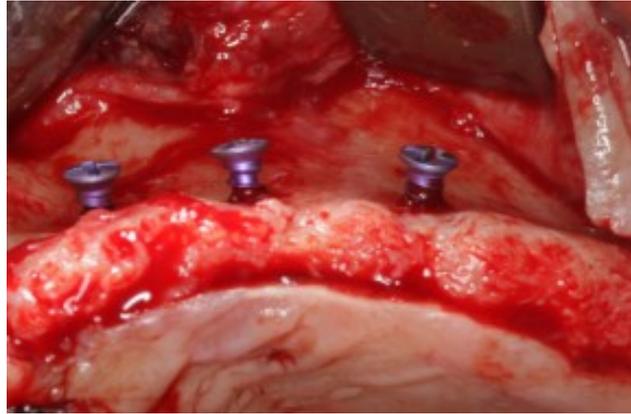
*Figura 5 : Membrana de titânio (adaptada de Sagheb, 2017)*

As membranas modeláveis são fixadas ao osso com parafusos de titânio para manter a estabilidade da membrana e do coágulo subjacente e para assegurar a hermeticidade do local a reconstruir.



*Figura 6 : Membrana de titânio fixado com parafusos (adaptada de Butz, 2011)*

Podem também requerer parafusos de osteossíntese para manter o espaço de regeneração.



*Figura 7 : Parafusos de osteossíntese na área do futuro enxerto ósseo (adaptada de Butz, 2011)*

O principal risco na utilização de matrizes de titânio é a exposição do enxerto. De acordo com a literatura, o risco de exposição varia entre 5% e 32% (26).

### 2.2.2) Membranas reabsorvíveis

As membranas reabsorvíveis utilizadas para ROG são de dois tipos: colagénicas e sintéticas. Devem ter um tempo de degradação compatível com o tempo necessário para a formação óssea.

Vantagens:

- A membrana é mais fácil de instalar
- Não é necessário levantar um retalho para remover a membrana.
- Diminuição das complicações pós-operatórias
- Melhor relação custo-eficácia

Desvantagens:

- Nenhum controlo do tempo da função de barreira;
- Possibilidade de interferência entre a reabsorção/cicatrização e a regeneração óssea;
- Necessidade de material de suporte de membrana.

A literatura mostra resultados mais ou menos favoráveis com o uso de membranas reabsorvíveis (27) (28) (29).

A diferença entre membranas reabsorvíveis e não reabsorvíveis reside na resposta dos tecidos à exposição da membrana e a necessidade de enxerto ósseo. Um estudo de Moses et al (2008) comparando diferentes tipos de membranas no tratamento de deiscência mostra que a exposição prematura das membranas resulta numa cicatrização óssea deficiente. Segundo Chiapasco et al. (2009), a taxa de exposição e infecção é mais elevada no caso de membranas não absorvíveis (20%) do que no caso de membranas reabsorvíveis (5%), e segundo os mesmos autores, em quase todos os casos, a utilização de membranas reabsorvíveis exigia a interposição de um material de preenchimento ósseo. (32)

#### 2.2.2.1) As membranas de colagénio

Segundo Kadler (2007) e Sakar (2012), o colagénio está envolvido em muitas atividades biológicas, incluindo a matriz extracelular e formação de vasos sanguíneos, a adesão e migração celular, e a morfogénese e reparação.

As membranas de colagénio são utilizadas desde 1996 (31). Segundo Rothamel (2004) elas são altamente biocompatíveis e suportam bem a opercularização e o contacto com o meio da cavidade oral. As suas fibras podem ou não ser reticuladas.

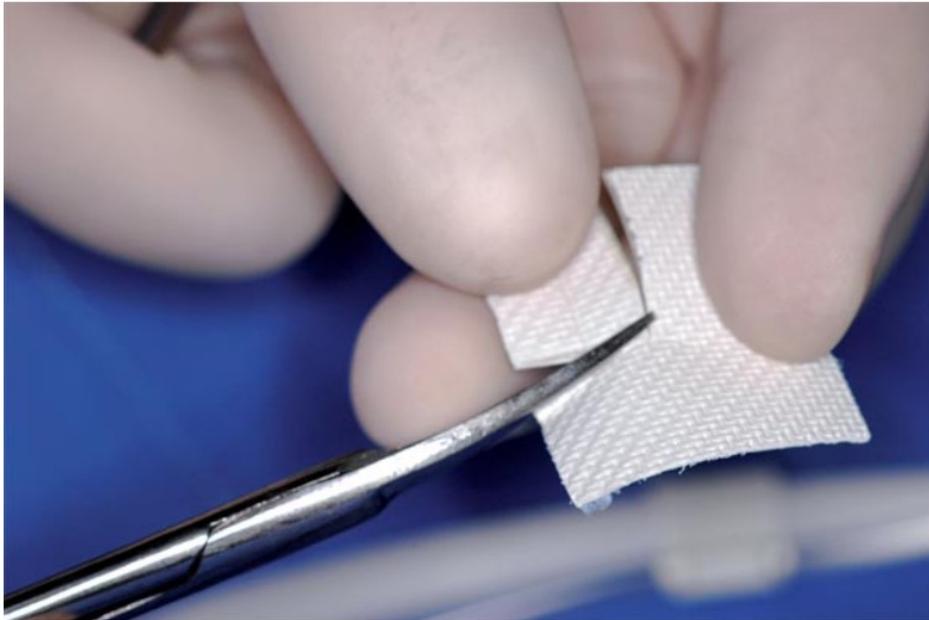
O colagénio contido nestas membranas provém de várias fontes:

- De origem bovina ou suína: pericárdio, tendão de Aquiles, derme
- De origem humana: dura-máter e placenta
- De origem vegetal: na fase de investigação

As membranas reabsorvíveis com fibras reticuladas reabsorvem mais lentamente do que aquelas com fibras não reticuladas.

Filogeneticamente, o colagénio suíno é o mais próximo do colagénio humano. O tecido suíno é considerado o material de escolha em muitos procedimentos médicos de xenotransplantação (33).

Exemplo: A membrana de colagénio



*Figura 8 : Membrana de colagénio (adaptada de Davarpanah, 2014)*

#### 2.2.2.2) As membranas sintéticas

As membranas sintéticas são compostas por polímeros sintéticos: copolímeros de ácido poliláctico (pLA) e ácido poliglicólico (pGA) mostrando uma excelente biocompatibilidade. São flexíveis, fáceis de manusear e algumas delas têm uma estrutura de dois lados: um lado denso e liso que impede a invaginação do tecido epitelial e um lado mate com microfibras não tecidas que promovem a regeneração óssea.

São reabsorvidos por hidrólise e a sua taxa de reabsorção depende do pH e da composição química do local implantado. Segundo Schliephake (2000) Os produtos de degradação destas membranas sintéticas podem provocar uma reação inflamatória nos tecidos circundantes com efeitos negativos na regeneração óssea. (33)

Num estudo de Gibert (2012) (74) os resultados mostraram que a degradação da membrana sintética reabsorvível por hidrólise leva a uma inflamação maior do que a degradação enzimática que se segue à colocação de uma membrana colagénica.

Contudo, após 1 mês, o aspeto da gengiva em termos de cor, volume e textura é o mesmo quer se trate de uma membrana de colagénio ou de uma membrana sintética reabsorvível.

### 2.3) Materiais de enxerto ósseo

Segundo Jovanovic (1995), a utilização exclusiva de membrana em ROG pré-implantar está indicada para pequenos defeitos ósseos não superiores a 3 mm (34). No entanto, é preciso lembrar que para a reconstrução de grandes defeitos ósseos, segundo a maioria dos estudos, a utilização de uma membrana por si só não é suficiente devido ao risco de colapso da membrana.

Os materiais de preenchimento ósseo são portanto utilizados na regeneração óssea guiada, principalmente para manter o espaço que proporcionam na área com o defeito e para ajudar na regeneração do defeito através de fatores de osteocondução, osteoindução ou osteogénese. (34)

#### 2.3.1) Os autoenxertos

Um enxerto autógeno é um material vivo composto por um esqueleto mineralizado que aprisiona a matriz orgânica e a medula óssea vascularizada (11). É a parte orgânica do enxerto que contém as proteínas (BMP e colagénio) e as células especializadas na formação óssea. A presença de células osteo-indutoras e de fatores de crescimento estimularão a proliferação de osteoblastos e a aposição óssea. Como resultado, o enxerto autógeno é o único a ter as três propriedades: osteoindução, osteocondução e osteogénese.

No final, é devido às suas muitas propriedades que o enxerto ósseo autógeno, entre os vários materiais que podem ser utilizados para obturações e enxertos, é a técnica de escolha (36)(37).

Com respeito ao osso autógeno como biomaterial para regeneração óssea, Schenk et al. 1994, mostram que todas as células ósseas autógenas que estão a mais de um milímetro de uma fonte vascular não serão capazes de sobreviver.

### 2.3.2) Os aloenxertos

O termo alogénico significa material da mesma espécie e não de um animal diferente. Em termos concretos, este material provém de doadores humanos, vivos ou não.

O osso é libertado do seu componente orgânico e depois esterilizado por irradiação gama. Depois, o osso é liofilizado e pode ser desmineralizado passando-o através de ácido clorídrico. (11)

Os ossos alogénicos dividem-se em três famílias:

- Osso liofilizado: os quadros minerais e orgânicos são preservados; o material é submetido a lavagem e esterilização por raios gama (Irradiated Cancellous Bone).
- Osso desmineralizado: a desmineralização permite a libertação de proteínas morfogenéticas indutoras (DFDBA)
- Osso delipidado-deproteínizado: apenas a estrutura mineral é preservada com resíduos de colagénio.

Estes materiais têm como vantagens serem fáceis de utilizar e estarem disponíveis em grandes quantidades. Além disso, são osteocondutivos e alguns autores atribuem ao osso liofilizado propriedades osteoindutoras (40).

No entanto, a utilização de produtos derivados de cadáveres humanos revela uma série de problemas do ponto de vista ético e sanitário com a transmissão de agentes infecciosos, por exemplo. Contudo, estes produtos são ainda amplamente utilizados em certas cirurgias (cirurgia ortopédica e cirurgia dentária). (40)

Um estudo retrospectivo de Carini et al, onde a indicação dos autores foi encontrar uma alternativa real ao osso autógeno, demonstrou, em 69 pacientes que foram seguidos durante 4 anos com 287 implantes colocados, uma taxa de sobrevivência de 98,3%, o

que permite considerar que o osso alógeno pode ser uma alternativa fiável ao osso autógeno (47).

Apesar disto, em comparação com os autoenxertos, os aloenxertos são menos osteocondutores, menos osteoindutores e não são osteogénicos (65).

### 2.3.3) Os xenoenxertos

Estes enxertos são feitos com material de um indivíduo pertencente a uma espécie diferente da do recetor (6). Os materiais xenogénicos devem portanto ser tratados, termicamente e quimicamente, para remover todos os vestígios de elementos orgânicos, fatores de crescimento e proteínas matriciais, de modo a estarem livres de elementos antigénicos. No campo da regeneração óssea em cirurgia dentária, o osso de origem bovina é o mais popular (6), mas também pode ser de origem suína, ovina, equina ou coralina.

Não têm potencial osteoindutor ou osteogénico, mas constituirão uma matriz que servirá de guia para o crescimento ósseo e permitirá a aposição a partir do osso existente (osteocondução). As vantagens deste biomaterial são que tem uma estrutura porosa que facilita a osteoindução, que está disponível em grande quantidade e que é fácil de preservar.

Segundo Schlegel e Donath (1998), existe uma matriz mineral óssea porosa, natural e não-antigénica produzida pela remoção de todos os elementos orgânicos do osso bovino, constituída por osso de origem bovina que foi libertado de todo o material orgânico através do seu aquecimento durante 15 horas a mais de 300°C e depois tratado com soluções alcalinas. A estrutura cristalina do osso é preservada. (80)

O material é comercializado de várias formas:

- Em forma de grânulos que existem em duas granulometrias diferentes, para serem adaptados à dimensão do defeito a preencher.
- Em forma de esponja, contendo 10% de colagénio porcino, este material composto apresentado desta forma é, portanto, mais fácil de manusear e aplicar. Esta forma é particularmente adequada para o preenchimento pós-extração de uma cavidade alveolar.

O material deve ser previamente embebido em sangue ou soro fisiológico e pode ser misturado com osso autógeno. Deve ser aplicado no defeito em contacto direto com o osso, tendo o cuidado de não o comprimir demasiado e depois coberto com uma membrana para proteger da invasão tecidual.

A formação óssea ocorre através do aparecimento de neo-vasos na matriz formada pelo material e depois através da colonização por células osteóides. Posteriormente o material será reabsorvido por osteoclastos durante a remodelação óssea.

Estudos realizados sobre este material mostram que a sua colocação abaixo de uma membrana irá melhorar a osteocondução (38) e permitir uma regeneração óssea de melhor qualidade do que se uma membrana for utilizada sozinha (39). No entanto, este material parece dar resultados mais pobres do que o osso autógeno (39).

Apesar de tudo, parece de ser uma boa alternativa, uma vez que permite, em alguns casos, evitar um segundo sítio cirúrgico ligado à recolha de osso autógeno.

Outra hipótese de xenoexerto é a utilização do coral.

O coral é um material pertencente à família dos poritos. É composto de carbonato de cálcio na forma de cristais de aragonite, é biocompatível (42) e é progressivamente reabsorvido pelos osteoclastos. Desempenhará um papel osteocondutor formando um suporte para as células osteoformadoras e para a neo-vascularização (43). Este material será descrito de forma mais precisa num capítulo futuro.

#### 2.3.4) Os materiais aloplásticos

Os materiais aloplásticos são substitutos ósseos sintéticos, utilizados em forma de cerâmicas e de biovidros.

As cerâmicas são compostos principalmente de fosfato de cálcio com uma proporção de cálcio e fósforo semelhante à do osso (41). As mais utilizadas são: hidroxiapatite sintética densa ou porosa (HA),  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) e o fosfato bifásico de cálcio (BCP), fabricado pela combinação de HA e  $\beta$ -TCP (48,49).

Outro material que tem sido objeto de muitos estudos é o gesso de paris, que na realidade é sulfato de cálcio. Este material encontrado na natureza contém certas impurezas, pelo que é tratado para se tornar biocompatível. O sulfato de cálcio não tem as propriedades mecânicas necessárias para ser um bom suporte estrutural, sendo por isso utilizado com a adição de outros materiais de modo a ter a resistência necessária (76).

Os primeiros estudos sobre a utilização deste material como material de regeneração óssea, realizados em 1892, não demonstraram vantagem clínica (75) e, segundo os autores, mesmo os resultados de estudos mais recentes foram contraditórios e nunca foi na verdade aceite como material de enxerto ósseo, em especial devido a toxicidade para o tecido ósseo (69,75,76). Foi contudo desenvolvida uma formulação deste material com aplicabilidade como produto de interposição entre tecidos, com características aparentadas com membranas reabsorvíveis (capset)

A hidroxiapatita sintética é uma cerâmica fosfocálcica e quimicamente relacionada com apatitas biológicas. É considerado osteocondutor, mal reabsorvido ou mesmo não reabsorvível (50). De facto, as partículas de hidroxiapatite são integradas no tecido regenerado, mas não completamente reabsorvidas. Esta característica limita a utilização destes materiais em implantologia, bem como em ROG, sendo a qualidade do tecido ósseo obtido demasiado incerta (44).

São comercializados em diferentes formas (grãos de diferentes tamanhos, blocos), a fim de cobrir um número máximo de indicações.

Os fosfatos tricálcicos cerâmicos são compostos por fosfato de cálcio, obtido por sinterização. Este material é osteocondutor e totalmente reabsorvível e a sua relação cálcio/fosfato é idêntica à do osso (3/2).

Existem materiais bifásicos compostos por 60% de hidroxiapatite e 40% TCP. Este biomaterial, para além das suas capacidades osteocondutoras, teria propriedades osteoindutoras quando é utilizado sozinho (45) ou com um selante de fibrina, tornando-o um material de preenchimento ideal.

Foram realizados mais estudos sobre um substituto ósseo injetável composto por fosfato dicálcico e uma solução polimérica. Mostraram resultados positivos relativamente à preservação do volume ósseo após a extração (46). É necessária mais investigação para determinar se tal material pode ser utilizado de forma benéfica na ROG.

Os biovidros são materiais à base de sílica contendo cálcio e fósforo. Não são reabsorvíveis em forma de bloco e lentamente reabsorvíveis em forma de partícula. Os biovidros podem ser submetidos a translocações iónicas. Como resultado, podem trocar iões ou grupos moleculares com fluidos biológicos e formar uma camada de apatite carbonatada inorgânica na sua superfície, permitindo-lhes aderir quimicamente ao osso. Segundo Shapoff (1997), são considerados hemostáticos e fáceis de manusear e têm a capacidade de promover o desenvolvimento ósseo através das suas propriedades osteocondutoras. (56)



### **3) Utilização do coral em medicina dentária**

#### 3.1) Características do coral

A ideia de utilizar materiais coralina na medicina surgiu de White et al. em 1972 com um processo inovador para transformar e gerar cópias de alta fidelidade de esqueletos marinhos como o coral.

O primeiro estudo em que o coral tratado e transformado foi utilizado numa aplicação clínica teve lugar em 1985 (53).

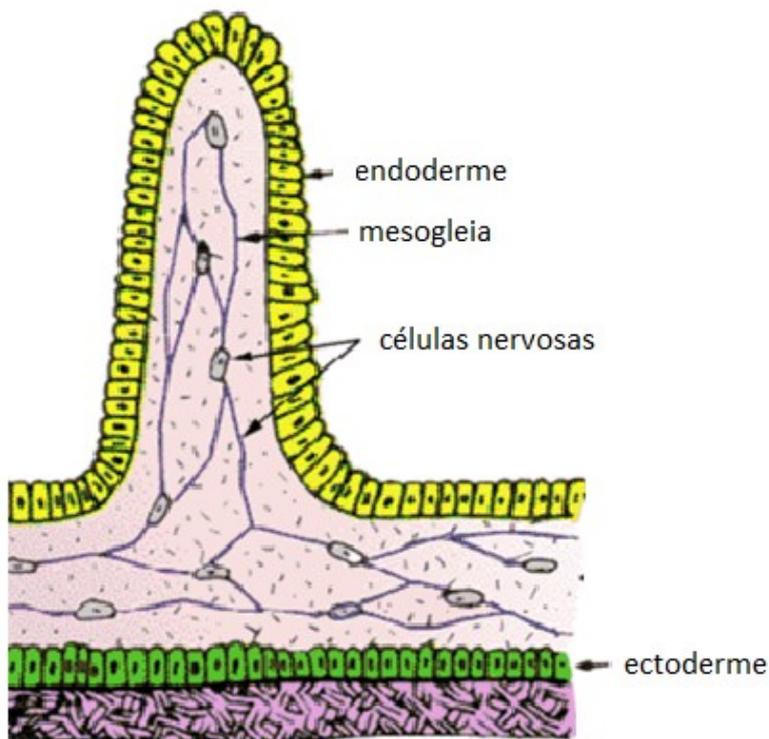
Só nos anos 90 é que os esqueletos de coral foram utilizados como substitutos ósseos em cirurgia, tornando-se comercialmente disponíveis sob os nomes Biocoral e ProOsteo.

Existe agora um grande conjunto de estudos publicados que mostram níveis variáveis de eficácia clínica no tratamento de fraturas amplamente separadas e no preenchimento de vazios ósseos naturalmente não bridados causados por tumores (58).

#### 3.1.1) Apresentação Biológica e histológica do coral

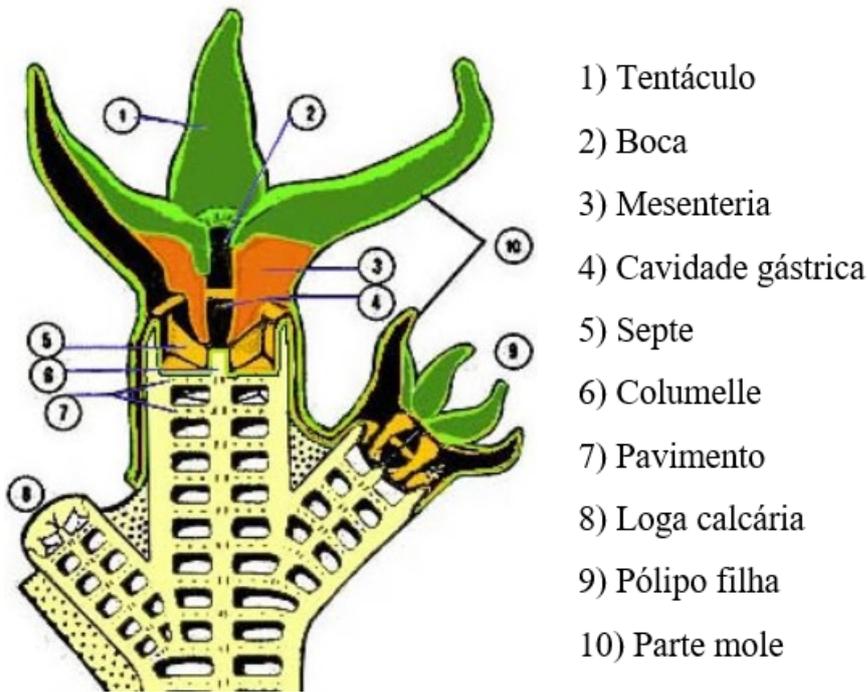
Ao contrário das aparências, os corais não são plantas aquáticas, mas sim animais cujas células estão organizadas em duas folhas ou tecidos.

Uma das folhas, externa, é chamada ectoderme, a outra interna é chamada endoderme. São separados por uma geleia, ou mesogleia, que contém elementos celulares tais como células nervosas.



*Figura 9 : Organização da estrutura em duas folhas de corais (adaptada de Robin, 1980)*

A maioria dos corais esqueléticos calcários são constituídos por milhares de pólipos, pequenos organismos que segregam cada um deles um exoesqueleto, o alojamento calcário, com uma estrutura porosa, constituído por carbonato de cálcio na forma de aragonite, semelhante ao osso esponjoso humano.



*Figura 10 : Secção longitudinal esquemática representando a estrutura dos pólipos (adaptada de H. Schuhmacher, 1977)*

O pólipo tem uma forma de ânfora cujo tamanho varia de 1 mm a alguns cm como no caso do *Goniopora*. A volta de um único orifício encontra-se uma coroa de tentáculos, que pode ser 6, 12, 24, etc. A barriga da ânfora corresponde à cavidade gástrica que dá origem às dobras verticais internas, a mesenteria. As septas são lamelas verticais que reforçam a estrutura do pólipo e a columela é uma pequena coluna calcária.

O coral tem um exoesqueleto que a torna interessante para o enxerto ósseo. Segundo Tambutté (2011), o tecido em contacto com a água do mar é chamado tecido bucal, é composto por cnidócitos, mucócitos e células epiteliais-musculares e o tecido em contacto com o esqueleto é o tecido aboral, também chamado tecido esquelético. É constituído por células calicoblásticas e desmócitos.

Segundo Demers (2002), as células calicoblásticas cobrem o esqueleto calcário e têm a particularidade de secretar a aragonite que irá calcificar e assim permitir a formação do esqueleto.

As células calicoblásticas são as únicas células capazes de sintetizar e secretar a matriz orgânica. Também controlam a entrada e saída de iões para formação do esqueleto (61) e podem variar em tamanho, variando de 10  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$ . Esta variação

deve-se às diferentes fases de esqueletogênese.

Os desmócitos permitem a ligação entre os calicoblastos e o esqueleto (61).

Entre estes dois tipos de células coexistentes no tecido esquelético esta a matriz orgânica, cujo nome varia de acordo com a literatura científica. (61).

A construção do exosqueleto de coral se faz durante o dia, permitindo que os corais tenham uma posição fixa e rígida. Segundo Demers (2002) Esta construção do esqueleto é semelhante à formação óssea.

A matriz contém lípidos, proteínas e polissacáridos, cuja proporção varia de acordo com as diferentes espécies de coral.

### 3.1.2) Características físico-química

O coral tem sido descrito como biocompatível e reabsorvível (59), bem como considerado osteocondutor (73), é bem tolerado pelos osteoblastos e proporciona uma superfície para colonização, fixação e diferenciação celular.

Apenas algumas das muitas espécies de coral listadas satisfazem os critérios para a regeneração óssea (50). Estas espécies foram definidas com base em experiências específicas em modelos animais e aplicações clínicas em seres humanos. As experiências em animais e as aplicações clínicas permitem uma adaptação direcionada dos corais selecionados às indicações selecionadas.

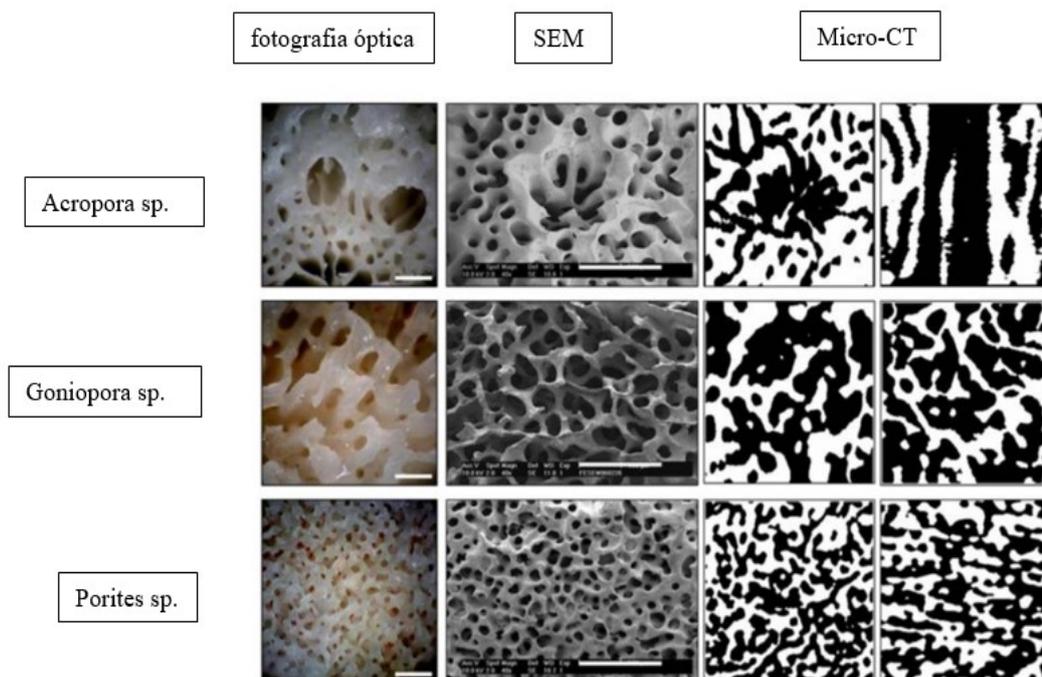
Num estudo de Wu et al. 2009 foram analisados o tamanho dos poros, porosidade, permeabilidade e propriedades mecânicas de três espécies de coral, *Acropora*, *Goniopora* e *Porites*.

*Goniopora* e *Porites* foram encontrados estruturalmente homogêneos e *Acropora* tinha a maior permeabilidade, mas a secção transversal foi fechada e o tamanho efetivo

foi limitado devido ao seu tipo de habitat. Em termos de tamanho dos poros destes três corais; *Acropora* tinha o maior tamanho médio de poros ( $412 \pm 212 \mu\text{m}$ ), *Goniopora* tinha o segundo maior tamanho ( $314 \pm 116 \mu\text{m}$ ), e *Porites* tinha o menor ( $154 \pm 53 \mu\text{m}$ )(57) , no entanto, um tamanho de poros superior a  $100 \mu\text{m}$  foi anteriormente reportado como um requisito mínimo para o crescimento de tecido fibrovascular e ósseo (55).

A porosidade dos corais foi avaliada utilizando medições de densidade no ar e água destilada: *Acropora* foi 60,72%, *Goniopora* 73,80% e *Porites* 64,04% (57).

Este último é considerado o principal fator na engenharia tecidual, uma vez que determina parcialmente a capacidade de carga com células (56).



*Figura 11 : Imagem bidimensional dos três espécimes com câmara digital, scanning electron microscope (SEM) e microtomografia (Micro-CT) (adaptada de Wu, 2009)*

Os Poritos têm a menor permeabilidade e o menor tamanho de poros entre as três espécies de coral avaliadas e embora o *Acropora* tivesse a maior permeabilidade, a secção transversal era fechada e o tamanho útil era limitado devido ao seu tipo de local e tem a menor porosidade.

Os dados indicam, portanto, que a *Goniopora* pode ser considerada a fonte mais promissora para a regeneração do tecido ósseo devido à sua elevada porosidade (73%) e que a sua permeabilidade e mecânica eram semelhantes às do osso esponjoso humano. (57)

### 3.1.3) Princípios de reformação óssea a partir de materiais coralina

O curso da remodelação óssea variará consoante a lesão óssea seja ou não preenchida com material coralino. Um estudo mostrou este mecanismo a partir de lesões ósseas em tíbias de cães, sem a utilização de materiais de preenchimento, e demonstrou a reparação a partir das extremidades endósseas da lesão óssea, bem como do perióstio num modelo membranoso.

No entanto, durante a utilização do material esquelético de coral, observou-se o seguinte:

- Invasão dos poros por elementos celulares extravasados da medula óssea
- Reabsorção osteoclástica do esqueleto coral concomitante com a aposição osteoblástica
- Remodelação óssea

O aparecimento de osteoclastos na interface osso-coral é observado desde o início do processo de reparação. Permanecem presentes nas secções histológicas até à reabsorção completa do implante coralino em oito semanas (59). Relativamente às substituições, a evolução dos sítios sem preenchimento leva principalmente à uma consolidação parcial e fraca. A regeneração dos locais implantados com um fragmento de esqueleto de coral segue o mesmo processo que os preenchimentos, mas durante um período mais longo: colonização do biomaterial por elementos extravasados da medula óssea, vascularização precoce seguida de reabsorção gradual e substituição progressiva por osso esponjoso.

Mais tarde, este tecido ósseo esponjoso é reabsorvido ao nível medular e evolui para osso compacto ao nível cortical. O aparecimento do osso esponjoso é observado a partir da 6ª semana e até um ano. Alguns raros ilhéus de esqueleto de coral ainda persistem. Ficou demonstrado que o coral implantado reabsorve gradualmente para dar lugar a novo tecido ósseo.

O mecanismo subjacente a este fenómeno parece estar dependente da ação dos osteoclastos que se encontram constantemente nos bordos dos fragmentos de coral implantados. Esta ação tem estado relacionada com a atividade da anidrase carbónica que contém porque a intervenção da anidrase carbónica na destruição dos substratos carbonatados já foi demonstrada (60).

De facto, estudos com animais mostraram que a injeção de inibidores específicos de anidrase carbónica resultou num abrandamento significativo na reabsorção do coral implantado, em comparação com o caso não tratado com este inibidor. Este abrandamento foi associado à necrose óssea na extremidade do implante, levando em todos os casos à má regeneração. Acredita-se que a anidrase carbónica atua como uma bomba de prótons dentro do osteoclasto, aumentando o pH extracelular e promovendo a dissolução mineral.

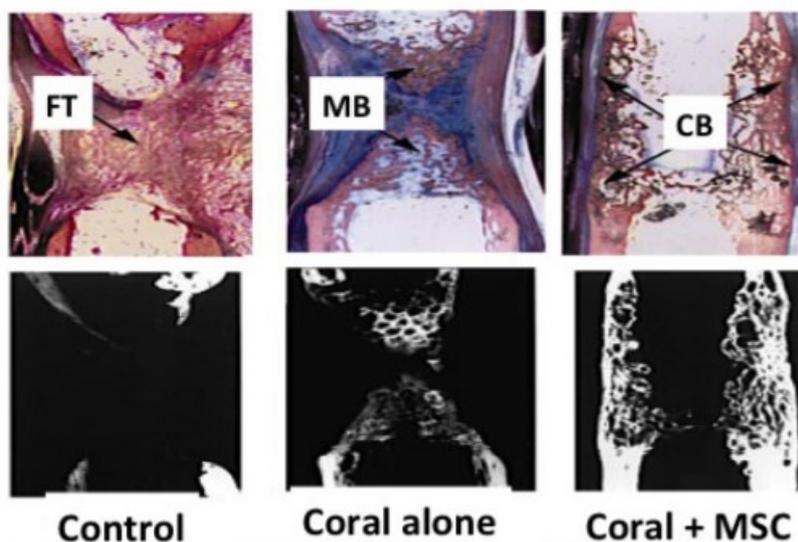
### 3.2) Aplicação experimental e clínica

A morfogénese óssea foi aumentada no estudo do esqueleto do coral, incorporando células estaminais mesenquimatosas (CEM) da medula óssea, com resultados favoráveis:

A reparação óssea em animais vivos foi observada utilizando esqueletos de coral carregados com células estaminais mesenquimatosas (62).

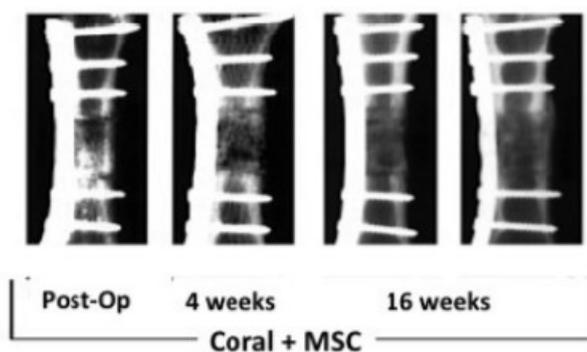
Podemos observar, sobre a figura 14, a comparação das respostas ósseas do hospedeiro utilizando várias secções histológicas coloridas a partir de um controlo. A segunda lamina é um defeito ósseo preenchido apenas com um esqueleto de coral e a terceira lamina é um defeito ósseo preenchido com um esqueleto de coral misturada com CEM. No grupo que contém coral com CEM, o defeito é preenchido e reparado a toda a espessura e só nos corais com CEM é que se obtém uma nova substituição óssea

madura (62).



*Figura 12 : Laminas histológicas de controle, de coral e de coral CEM (adaptado de Petite, 2000)*

Aqui podemos ver imagens radiográficas comparando a substituição do osso mineralizado com o esqueleto de coral carregado de MSC às 4 semanas e 16 semanas. Os corais com CEM permitem uma nova substituição óssea madura.



*Figura 13 : Imagens radiográficas da substituição óssea com coral + CEM (adaptada de Petite, 2000)*

### 3.2.1) Hidroxiapatite coralina

O coral não convertido não é adequado para a maioria dos enxertos de longo prazo devido à sua alta taxa de dissolução, baixa longevidade e baixa estabilidade (66). Isto estimulou métodos para aumentar a resistência dos esqueletos de coral para que possam suportar as altas forças de compressão exercidas em ossos longos portadores de carga, por exemplo.

Para ultrapassar esta limitação, os corais foram convertidos em hidroxiapatite coralina por tratamento hidrotérmica ou tratamento por microondas, resultando em produtos com melhores taxas de reabsorção e melhor osteointegração (67).

Este tratamento permite a substituição parcial da aragonite por hidroxiapatite, preservando a sua estrutura porosa. Contudo, em certas circunstâncias, pode ser observada uma diminuição da resistência estrutural. Este problema pode ser reduzido através da utilização de técnicas de dupla conversão.

Muitos dos atuais materiais de enxerto ósseo são produzidos a partir de hidroxiapatite coralina (HA). Devido à natureza do processo de conversão, a coralina comercial HA reteve o coral ou  $\text{CaCO}_3$ , e a estrutura tem nanoporos nas trabéculas interporosos, resultando em altas taxas de dissolução. Sob certas condições, estas características reduzem a durabilidade e a resistência e não são utilizadas quando é necessária uma resistência estrutural elevada. Para ultrapassar estas limitações, foi desenvolvida uma nova técnica de dupla conversão de coral (81).

Esta técnica envolve um caminho de aplicação em duas etapas onde, na primeira etapa, é alcançada a conversão completa do coral em HA puro. No segundo, um novo revestimento de nanopartículas de HA derivadas de um sol-gel é aplicado diretamente para cobrir os micro e nanoporos dentro do material intraporoso, mantendo ao mesmo tempo os grandes poros.

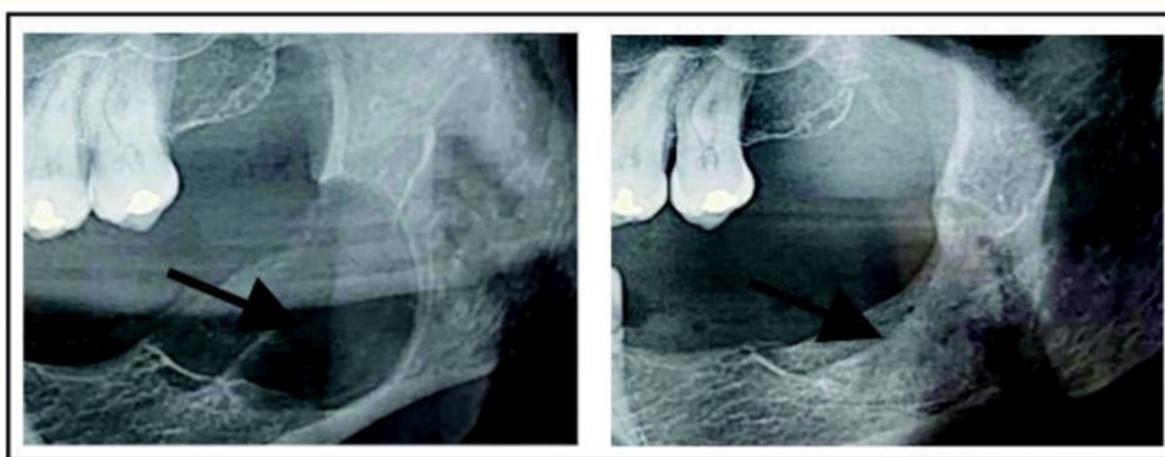
	Biaxial strength (MPa)
Coral	6.5±2.9
Converted coral	7.6±1.4
Converted and HAp coated coral	13.3±6.5

*Figura 14 : Resistências biaxiais do coral, coral convertido hidrotermicamente, coral convertido e revestido com hidroxiapatite (adaptada de Ben-Nissan, 2004)*

A resistência biaxial foi duplicada graças a este tratamento duplo único. Espera-se que esta aplicação resulte numa maior durabilidade e longevidade devido à estrutura monofásica da hidroxiapatite e à sua resistência no ambiente fisiológico.

Num estudo sobre os enxertos ósseos com a hidroxiapatite coralina, o termo "osteostimulante" é utilizado para definir a hidroxiapatite coralina (cHA). Embora seja utilizado principalmente no marketing, define, na ciência, um material que melhora a osteoindução sem ser ela própria osteoindutora (70).

O cHA não é apenas osteocondutivo, mas também promove inerentemente a formação de nova estrutura óssea. Os resultados clínicos de um dos autores demonstram uma cura rápida com cHA (70).



*Figura 15 : Imagens de raios X do paciente com cisto mandibular antes (esquerda) e após 90 dias com enxerto de cHA (direita) (adaptada de McPherson, 2019)*

### 3.2.2) Compósito de colagénio-hidroxiapatite

O compósito colagénio-hidroxiapatita é um enxerto ósseo sintético que tem propriedades semelhantes às do osso natural.

Num estudo recente, no qual o objetivo era mostrar a biocompatibilidade e osteocondutividade do compósito colagénio-hidroxiapatite, a hidroxiapatite de coralina foi sintetizada a partir de hidróxido de cálcio de coral e ácido fosfórico. O colagénio foi recolhido de pedaços de garra de frango, esmagado e misturado e embebido numa solução de Cloreto de Hidrogénio (HCl). Soluções de hidroxiapatita e colagénio foram formadas por algum processo e depois misturadas e congeladas para formar o compósito colagénio-hidroxiapatita (68).

Este biomaterial tem sido submetido a vários testes *in vitro*. É realizado um teste MTT para avaliar a atividade metabólica celular e é encontrada uma percentagem de viabilidade celular superior a 100%, indicando a proliferação celular (68).

Estes mostram que o colagénio, a hidroxiapatite e o compósito são não tóxicos e biocompatíveis e especialmente uma proliferação de células no colagénio e na hidroxiapatite que pode ser causada por estes dois componentes que têm fatores osteoindutores, nomeadamente as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP). (68)

### 3.2.3) Materiais à base de carbonato de cálcio coralino

Os materiais à base de carbonato de cálcio coralino são compostos de coral na sua forma natural com 99% de carbonato de cálcio e 1% de aminoácidos.

É submetido a um tratamento mínimo para remover os fatores contaminantes e retém a sua morfologia e química originais. É o género *Acropora* que é utilizado pela empresa para fazer este material. É comercializado sob o nome Biocoral®.

Vários estudos clínicos têm mostrado resultados diferentes.

O estudo de Roux et al. apresenta os resultados deste produto em 183 pacientes (71). Eles relataram que o bloco de coral foi deslocado ou parcialmente reabsorvido e dividido em pedaços após 7 a 36 meses em 20% dos casos. Após um ano, observou-se uma taxa de reabsorção de 40-50% e a taxa de infecção global foi de 4%.

Num outro estudo, quando a material coralina foi implantado no maxilar anterior, observou-se uma elevada taxa de reabsorção (83% de reabsorção) em oposição à maxilar posterior e a mandíbula (6% de reabsorção) (72). A sua reabsorção é imprevisível, com alguns autores a relatarem uma reabsorção completa enquanto noutros estudos a reabsorção foi moderada.

Um estudo, impulsionado por Piattelli e al., onde os defeitos foram preenchidos com partículas de gel biocoral, sublinhou que apesar das partículas ainda presentes após 6 meses, quase todas elas estavam completamente rodeadas de osso maduro. (73)

## Conclusão

O objetivo desta tese era demonstrar a eficácia do coral como material de regeneração óssea, a fim de expandir a amostra de biomaterial disponível e potencialmente encontrar um tão eficaz como o osso autógeno, ainda considerado o "gold standard".

Temos demonstrado que este material tem geralmente uma biocompatibilidade muito boa, mas é controverso. A reabsorção completa do coral seguida de uma nova formação óssea foi demonstrada em alguns estudos, enquanto noutros estudos a reabsorção foi fraca, tornando-a infelizmente imprevisível. Estes resultados diferem de acordo com a forma sob a qual é utilizado.

O número de estudos realizados nos últimos 50 anos sobre biomateriais de origem coral em cirurgia dentária e medicina continua a ser demasiado pequeno em número e número de pacientes para se chegar a uma conclusão unilateral.



## Bibliografia

- 1) ABRAMS L. Augmentation of the deformed residual edentulous ridge for fixed protheses. *Compend Contin Educ Dent* 1980 1 : 205-214
- 2) TECIDOS CARTILAGINOSO E ÓSSEO, ProEnem. 2020  
<https://www.proenem.com.br/enem/biologia/tecidos-cartilaginoso-e-osseo/>
- 3) BERKOVITZ, Barry KB, HOLLAND, Graham Rex, et MOXHAM, Bernard J. *Oral Anatomy, Histology and Embryology E-Book*. Elsevier Health Sciences, 2017.
- 4) STEVENS A., LOWE J. *Histologie humaine*. 2ème édition. Paris, Bruxelles : Editions De Boeck Université, 2002, 408p.
- 5) « Brèves », médecine/sciences, vol. 12, no 1, 1996
- 6) GARG AK. *Bone Biology, Harvesting, Grafting for Dental Implants: Rationale and Clinical Applications*. Quintessence Books, 2004 ; 279 p.
- 7) Thomas T., Martin A., Lafage-Proust M.-H. *Physiologie du tissu osseux*. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Appareil locomoteur, 14-002-B-10, 2008.
- 8) 107- Les tissus squelettiques : le tissu osseux, 2009. Disponible en :  
<<http://www.chups.jussieu.fr/polys/histo/histoP1/POLY.Chp.5.2.html> (02.04.2009).
- 9) KHOURY.F, KHOURY.CH. Les greffes osseuses mandibulaires en bloc : instrumentation, techniques de prélèvement et usage chirurgical. *J. Parodontol. Implantol. Orale.*, 2006, 25, 1, p. 15-34.
- 10) COLOMBIER.ML, LESCLOUS.P, TULASNE.JF. La cicatrisation des greffes osseuses. *Rev. Stomatol. Chir. Maxillo-fac.*, 2005, 106, 3, p. 157-164.
- 11) TULASNE, Jean-François et ANDRÉANI, Jean-François. *Les greffes osseuses en implantologie*. Quintessence international, 2005.
- 12) TULASNE.JF. Greffe de sinus : os autogène ou substitut osseux ? Titane, 2005, 2, 1, p. 49-53.

- 13) VALENTINI.P, ABENSUR.D. Utilisation des biomatériaux dans les greffes de sinus maxillaire. Titane, 2007, 4, 1, p. 21-22.
- 14) NYMAN S, GOTTLow J, KARRING T, LINDHE J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. J Clin Periodontol 1982;9:257-265.
- 15) Dana M., Zenou S., Guez B., Implantologie dans le plan de traitement parodontale, Elvierser Masson, 2008
- 16) Rompen EH, Biewer R, Vanheusden A, Zahedi S, Nusgens B. The influence of cortical perforations and of space filling with peripheral blood on the kinetics of guided bone generation. A comparative histometric study in the rat. Clinical Oral Implants Research. 1999;10(2):85-94
- 17) Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. (1994) Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. Int J Oral Maxillofac Implants 9: 13-29
- 18) Antoun H., Karouni M., Sojod B. la régénération osseuse guidée : résultats, limites et perspectives, AOS 2013;261:11-21
- 20) Gentile et al. Biotechnol J. 2011 Oct;6(10):1187-97.
- 21) Nowzari H, Slots J. Microbiologic and clinical study of polytetrafluoroethylene membranes for guided bone regeneration around implants. Int J Oral Maxillofac Implants 1995;10(1):67-73.
- 22) Machtei EE. The effect of membrane exposure on the outcome of regenerative procedures in humans: a meta-analysis. J Periodontol 2001;72,4;512-6.
- 23) BARTEE BK, BARTEE CM. Textured high density PTFE medical barrier. Brevet US5957690 A. 28 septembre 1999.
- 24) BETTACH R. La régénération osseuse guidée. Fil Dent Spéc greffes osseuses juin 2010 ; (54) : 30-35
- 25) Lee S-H, Moon J-H, Jeong C-M, Bae E-B, Park C-E, Jeon G-R, et al. The Mechanical

- Properties and Biometrical Effect of 3D Preformed Titanium Membrane for Guided Bone Regeneration on Alveolar Bone Defect. *BioMed Res Int.* 2017;2017:1-12.
- 26) Elnayef B, Monje A, Gargallo-Albiol J, Galindo-Moreno P, Wang H-L, Hernández-Alfaro F. Vertical Ridge Augmentation in the Atrophic Mandible: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants.* avr 2017;32(2):291-312.
- 27) Zellin G, Gritli-Linde A, Linde A. Healing of mandibular defects with different biodegradable and non-biodegradable membranes: an experimental study in rats. *Biomaterials* 1995;16:601-9
- 28) Karring T, Nyman S, Gottlow J, Laurell L. Development of the biological concept of guided tissue regeneration—animal and human studies. *Periodontol* 2000 1993;1:26-35.
- 29) Sandberg E, Dahlin C, Linde A. Bone regeneration by the osteopromotion technique using bioabsorbable membranes: an experimental study in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1993;51:1106-14.
- 30) Rothamel et al. Biodegradation of Differently Cross Linked Collagen Membranes: An Experimental Study in the rat. *Clin Oral Impl Res* 2004. 10;1-9
- 31) Miller N et al. Resorption rates of 2 commercially available bioresorbable membranes. A histomorphometric study in a rabbit model. *J Clin Periodontol* 1996;23:1051-1059
- 32) Chiapasco M, Zaniboni M. Clinical outcomes of GBR procedures to correct peri implant dehiscences and fenestrations: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 2009;20 Suppl 4:113-23.
- 33) Delustro, Frank, et al. «Immune responses to allogeneic and xenogeneic implants of collagen and collagen derivatives.» *Clinical orthopaedics and related research* 260 (1990): 263-279.
- 34) Jovanovic SA, Schenk RK, Orsini M, Kenney EB. Supracrestal bone formation around dental implants: an experimental dog study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1995;10(1):23-31.
- 35) PRINC.G, PIRAL.T. Chirurgie osseuse pré-implantaire. *Mémento.* Paris :Cdp, 2008, 121.

- 36) Misch CM., Autogenous bone: is it still the gold standard?; *Implant Dent.* 2010;19(5):361.
- 37) Jaffin RA, Berman CL. The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone: a 5-year analysis. *J Periodontol.* 1991;62:2-4
- 38) NORTON MR,ODELL EW, THOMPSON ID et COOK RJ.  
Efficacy of bovine bone mineral for alveolar augmentation: a human histologic study. *Clin Oral Implants Res*2003;14(6):775-783.
- 39) SCHOU S, HOLMSTRUP P, JORGENSEN T et coll. Anorganic porous bovine-derived bone mineral (Bio-Oss) and ePTFE membrane in the treatment of peri-implantitis in cynomolgus monkeys. *Clin Oral Implants Res*2003;14(5):535-547.
- 40) PIATTELLI A, SCARANO A, CORIGLIANO M et PIATTELLI M.  
Comparison of bone regeneration with the use of mineralized and demineralized freeze-dried bone allografts: a histological and histochemical study in man. *Biomaterials* 1996;17(11):1127-1131.
- 41) Nasr HF, Aichelmann-Reidy ME, Yukna RA. (1999) Bone and bone substitutes. *Periodontol* 2000 19: 74-86.
- 42) SCARANO A, DEGIDI M, IEZZI G et coll.  
Maxillary sinus augmentation with different biomaterials: a comparative histologic and histomorphometric study in man. *Implant Dent* 2006;15(2):197-207.
- 43) PRETORIUS JA, MELSEN B, NEL JC et GERMISHUYS PJ. A histomorphometric evaluation of factors influencing the healing of bony defects surrounding implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20(3):387-398.
- 44) CANCIAN DC, HOCHULI-VIEIRA E, MARCANTONIO RA et MARCANTONIO E JR.  
Use of BioGran and Calcitite in bone defects: histologic study in monkeys (*Cebus apella*). *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14(6):859-864.
- 45) LE NIHOANNEN D, DACULSI G, SAFFARZADEH A et coll.  
Ectopic bone formation by microporous calcium phosphate ceramic particles in sheep muscles. *Bone* 2005;36(6):1086-1093.

- 46) BOIX D, WEISS P, GAUTHIER O et coll. Injectable bone substitute to preserve alveolar ridge resorption after tooth extraction: a study in dog. *J Mater Sci Mater Med* 2006;17(11):1145-1152.
- 47) CARINCI, Francesco, BRUNELLI, Giorgio, FRANCO, Maurizio, et al. A retrospective study on 287 implants installed in resorbed maxillae grafted with fresh frozen allogeneous bone. *Clinical implant dentistry and related research*, 2010, vol. 12(2) p. 91-98.
- 48) Daculsi G, LeGeros RZ, Nery E, Lynch K, Kerebel B. (1989) Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization. *J Biomed Mater Res.* 23: 883-894.
- 49) Nery EB, LeGeros RZ, Lynch KL, Lee K. (1992) Tissue response to biphasic calcium phosphate ceramic with different ratios of HA/beta TCP in periodontal osseous defects. *J Periodontol.* 63: 729-735.
- 50) JORDANA, Fabienne, LE VISAGE, Catherine, et WEISS, Pierre. *Substituts osseux. médecine/sciences*, 2017, vol. 33(1), p. 60-65.
- 51) Figueiredo M, Henriques J, Martins G, Guerra F, Judas F, Figueiredo H. Physicochemical characterization of biomaterials commonly used in dentistry as bone substitutes — comparison with human bone. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010;92(2):409-19
- 52) GREEN, David W., LAI, Wing-Fu, et JUNG, Han-Sung. Evolving marine biomimetics for regenerative dentistry. *Marine Drugs*, 2014, vol. 12(5), p. 2877-2912.
- 53) White, E.W.; Weber, J.N.; Roy, D.M.; Owen, E.L.; Chiroff, R.T.; White, R.A. Replamineform porous biomaterials for hard tissue implant applications. *J. Biomed. Mater. Res.* 1975, 9, 23–27
- 54) Devecioğlu D, Tözüm TF, Sengün D, Nohutcu RM. Biomaterials in periodontal regenerative surgery: Effects of cryopreserved bone, commercially available coral, demineralized freeze-dried dentin, and cementum on periodontal ligament fibroblasts and osteoblasts. *J Biomater Appl* 2004;19(2):107-20.
- 55) S.F. Hulbert, F.A. Young, R.S. Mathews, J.J. Klawitter, C.D. Talbert, F.H. Stelling, J. *Biomed. Mater. Res.* 4, 433 (1970).

- 56) V. Karageorgiou, D. Kaplan, *Biomaterials* 26, 5474 (2005).
- 57) WU, Yu-Chun, LEE, Tzer-Min, CHIU, Kuo-Hsun, et al. A comparative study of the physical and mechanical properties of three natural corals based on the criteria for bone–tissue engineering scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2009, vol. 20, no 6, p. 1273-1280.
- 58) Souyris, F.; Pellequer, C.; Payrot, C.; Servera, C. Coral, a new biomedical material. Experimental and first clinical investigations on Madreporaria. *J. Maxillofac. Surg.* 1985, 13, 64–69.
- 59) GUILLEMIN, G., PATAT, J.-L., FOURNIE, J., et al. The use of coral as a bone graft substitute. *Journal of biomedical materials research*, 1987, vol. 21, no 5, p. 557-567.
- 60) GAY, Carol V. et MUELLER, Werner J. Carbonic anhydrase and osteoclasts: localization by labeled inhibitor autoradiography. *Science*, 1974, vol. 183, no 4123, p. 432-434.
- 61) Tambutté S., Holcomb M., Ferrier-Pagès C., Reynaud S., Tambutté É., Zoccola D., Allemand D., 2011. Coral biomineralization: From the gene to the environment. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 408, 58–78.
- 62) PETITE, Herve, VIATEAU, Veronique, BENSALID, Wassila, et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nature biotechnology*, 2000, vol. 18, no 9, p. 959-963.
- 63) Bartee, B.K.; Carr, J. Evaluation of a high-density polytetrafluoroethylene (n-PTFE) membrane as a barrier material to facilitate guided bone regeneration in the rat mandible. *J. Oral Implantol.* 1995, 21, 88–95.
- 64) IVIGLIA, Giorgio, KARGOZAR, Saeid, et BAINO, Francesco. Biomaterials, current strategies, and novel nano-technological approaches for periodontal regeneration. *Journal of functional biomaterials*, 2019, vol. 10, no 1, p. 3.
- 65) RATNER, Buddy D., HOFFMAN, Allan S., SCHOEN, Frederick J., et al. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine.* Elsevier, 2004.
- 66) Nam SB, Bae YC, Moon JS, Kang YS. Analysis of the postoperative outcome in 405 cases

- of orbital fracture using 2 synthetic orbital implants. *Ann Plast Surg* 2006;56(3):263-7.
- 67) Fu K, Xu Q, Czernuszka J, Triffitt JT, Xia Z. Characterization of a biodegradable coralline hydroxyapatite/calcium carbonate composite and its clinical implementation. *Biomed Mater* 2013;8(6):065007.
- 68) SISWANTO, Siswanto, HIKMAWATI, Dyah, KULSUM, Umi, et al. Biocompatibility and osteoconductivity of scaffold porous composite collagen–hydroxyapatite based coral for bone regeneration. *Open Chemistry*, 2020, vol. 18, no 1, p. 584-590.
- 69) PAOLANTONIO, Michele, PERINETTI, Giuseppe, DOLCI, Marco, et al. Surgical treatment of periodontal intrabony defects with calcium sulfate implant and barrier versus collagen barrier or open flap debridement alone: a 12-month randomized controlled clinical trial. *Journal of periodontology*, 2008, vol. 79, no 10, p. 1886-1893.
- 70) MCPHERSON, R. A., et al. Bone Grafting with Coralline Hydroxyapatite. *EC Dental Science*, 2019, vol. 18, p. 2413-2423.
- 71) Roux FX, Brasnu D, Menard M, Devaux B, Nohra G, Loty B. Madreporic coral for cranial base reconstruction. 8 years experience. *Acta Neurochir (Wien)*. 1995;133:201-5.
- 72) Yukna RA, Yukna CN. A 5-year follow-up of 16 patients treated with coralline calcium carbonate (BIOCORAL) bone replacement grafts in infrabony defects. *J Clin Periodontol* 1998;25:1036–1040
- 73) Piattelli A, Podda G, Scarano A. Clinical and histological results in alveolar ridge enlargement using coralline calcium carbonate. *Biomaterials*. 1997;18:623-7
- 74) FERNANDEZ, Stéphanie, TRAMINI, Paul, CALAS-BENNASAR, Isabelle, et al. Alvéolyse postextractionnelle et membrane résorbable : étude clinique. *Actualités odontostomatologiques*, 2012, no 259, p. 261-271.
- 75) DRESSMANN, H. Über Knochenplombierung bei höhlenformigen Defekten des Knochens. *Beitr Klin Chir*, 1892, vol. 9, p. 804-810.
- 76) DAMIEN, Christopher J. et PARSONS, J. Russell. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *Journal of Applied Biomaterials*, 1991, vol. 2, no

3, p. 187-208.

77) Thomas T., Martin A., Lafage-Proust M.-H. *Physiologie du tissu osseux*. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Appareil locomoteur, 14-002-B-10, 2008.

78) MARIE, Pierre. Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. *médecine/sciences*, 2001, vol. 17, no 12, p. 1252-1259.

80) SCHLEGEL, Andreas K. et DONATH, Karl. BIO-OSS--a resorbable bone substitute ? *Journal of long-term effects of medical implants*, 1998, vol. 8, no 3-4, p. 201-209.

81) BEN-NISSAN, Besim, MILEV, A., et VAGO, Razi. Morphology of sol-gel derived nano-coated coralline hydroxyapatite. *Biomaterials*, 2004, vol. 25, no 20, p. 4971-4975.

82) ROBIN, B., PÉTRON, Christian, et RIVES, Claude. *Les coraux: Nouvelle-Calédonie, Tahiti, Réunion, Antilles*. Les éd. du Pacifique, 1980.

83) HABAL, Mutaz B. Bone tissue engineering applications in craniofacial reconstructive surgery. *Clinics in plastic surgery*, 2004, vol. 31, no 3, p. 387-392.