



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS INTERATIVOS DOS
ÓRGÃOS E SISTEMAS**

ANA CLARA ALVES DE CARVALHO

**REPARO ÓSSEO DE DEFEITO CRÍTICO EM CALVÁRIA DE
RATO COM MICROESFERAS DE HIDROXIAPATITA E
SELANTE DE FIBRINA**

Salvador

2010

ANA CLARA ALVES DE CARVALHO

**REPARO ÓSSEO DE DEFEITO CRÍTICO EM CALVÁRIA DE
RATO COM MICROESFERAS DE HIDROXIAPATITA E
SELANTE DE FIBRINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Universidade Federal da Bahia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Aryon de Almeida Barbosa Júnior

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Fabiana Paim Rosa

Salvador

2010

Ficha Catalográfica elaborada pela

Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA – Salvador – Bahia

- C331 Carvalho, Ana Clara Alves de,
Reparo ósseo de defeito crítico em calvária de rato com microesferas de hidroxiapatita e selante de fibrina / Ana Clara Alves de Carvalho. - Salvador, 2010.
120 f. ; il.
- Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Processos interativos dos Órgãos e Sistemas, 2010.
- Orientador: Prof. Dr. Aryon de Almeida Barbosa Júnior.
Co-orientadora: Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa.
1. Regeneração óssea. 2. Bioengenharia. 3. Hidroxiapatita. 4. Fibrina. 5. Materiais Biocompatíveis. I. Barbosa Júnior, Aryon de Almeida. II. Rosa, Fabiana Paim. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Processos interativos dos Órgãos e Sistemas. IV. Título.
- CDU: 616.714:57.085

ANA CLARA ALVES DE CARVALHO

**REPARO ÓSSEO DE DEFEITO CRÍTICO EM CALVÁRIA DE
RATO COM MICROESFERAS DE HIDROXIAPATITA E
SELANTE DE FIBRINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Universidade Federal da Bahia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 29 de novembro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Aryon de Almeida Barbosa Junior (Orientador)

Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Prof. Dr. Moisés Sadygursky

Universidade Federal da Bahia – FAMED

Profa. Dra. Glória de Almeida Soares

Universidade Federal do Rio de Janeiro - COPPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PROCESSOS INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS

Aos vinte e nove dias do mês de novembro de dois mil e dez, reuniu-se em sessão pública o Colegiado do Programa de Pós- Graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas com a finalidade de apreciar a Defesa de Dissertação da Pós-graduanda **Ana Clara Alves de Carvalho**, através da Comissão Julgadora composta pelos Professores **Aryon Barbosa de Almeida Junior**, **Moysés Sadygursky** e **Glória de Almeida Soares**. O título da Dissertação apresentado foi **REPARO ÓSSEO DE DEFEITO CRÍTICO EM CALVÁRIA DE RATO COM MICROESFERAS DE HIDROXIAPATITA E SELANTE DE FIBRINA**. Ao final dos trabalhos os membros da mencionada Comissão Examinadora emitiram os seguintes pareceres:

Prof. Dr. Aryon Barbosa de Almeida Junior Aprovada
Prof. Dr. Moysés Sadygursky Aprovada
Profa. Dra. Glória de Almeida Soares Aprovada

Franqueada a palavra, como não houve quem desejasse fazer uso da mesma lavrou-se a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada por todos.

Salvador, 29 de novembro de 2010.

Prof. Dr. Aryon Barbosa de Almeida Junior
Prof. Dr. Moysés Sadygursky
Profa. Dra. Glória de Almeida Soares

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar o meu caminho e me ajudar a seguir em frente e superar todos os obstáculos que foram criados ao longo dessa trajetória.

Ao meu pai Joel que tanto amo e que foi meu exemplo de força, coragem e de luta.

A minha mãe Tereza que esteve ao meu lado em todos os momentos e que tanto me incentivou a continuar lutando pelos meus sonhos.

A Joi, Yanna, Alex e Maria Clara, minha família que tanto amo e que fizeram dessa trajetória um caminho mais suave.

A João por me apoiar e estar ao meu lado em todos os momentos, por elevar minha estima e me incentivar a lutar.

A minha avó Clara e Dinha por entenderem a distância e por rezarem pelo meu sucesso.

Ao Prof. Dr. Aryon Barbosa e a Profa. Dra. Fabiana Paim pelo apoio e por acreditarem que poderíamos desenvolver um bom trabalho, ampliando minhas experiências profissionais e me fazendo perceber que tudo é possível com esforço e vontade.

A Luciana, Marion e Isabela por dividirem comigo todo o trabalho desse experimento e pelos conselhos ao longo das nossas viagens.

A Ana Emília por muito me ajudar no processamento das espécimes.

Ao Prof. Roberto Paulo, coordenador do programa de Pós-graduação por cobrar de mim sempre mais do que achei ser possível e com isso me fez crescer como profissional e como ser humano.

Ao Dr. Alexandre Malta Rossi e demais pesquisadores do CBPF responsáveis pela confecção do biomaterial utilizado neste estudo.

Às técnicas de laboratório, Cristina, Carol e Bete, pela dedicação no processamento dos espécimes.

A Junior por cuidar com carinho dos meus animais durante todo o experimento.

A Diogo pelas fotos que ilustram esse trabalho.

Aos alunos da iniciação científica, Manoel, Marcel e Poliana que me ajudaram no desenvolvimento de todo o experimento.

À equipe da Facimagem.

À equipe da Radiologia da FOUFBA por me incentivar a seguir nessa trajetória acadêmica.

Aos colegas de mestrado, por dividirem as dificuldades desta jornada.

“A nossa maior glória não reside no fato de nunca cairmos, mas sim em levantarmo-nos sempre depois de cada queda”

Confúcio

CARVALHO, Ana Clara Alves de. Reparo ósseo de defeito crítico em calvária de rato com microesferas de hidroxiapatita e selante de fibrina. 120f. II.2010. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

RESUMO

A bioengenharia tecidual é uma área interdisciplinar de atuação das ciências biomédicas e das engenharias responsável pela busca e aprimoramento de novas terapias e/ou desenvolvimento de novos biomateriais. Nesse sentido, as biocerâmicas de hidroxiapatita apresentam características físicas e biológicas semelhantes ao componente inorgânico do osso autógeno, com propriedades osteogênicas desejáveis, e biocompatibilidade, podendo atuar como importante substituto no reparo ósseo. Mas, como os biomateriais podem ser facilmente deslocados do seu sítio de implantação, é importante o uso de agentes aglutinantes, como o selante de fibrina, para a formação de uma rede firme e mecanicamente estável, com boas propriedades adesivas. Este projeto teve como objetivo avaliar, histologicamente, o reparo de defeito ósseo crítico, realizado em calvária de rato, pela utilização de biomateriais compostos por microesferas de hidroxiapatita e selante de fibrina. Foram utilizados 58 animais, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos e analisados nos tempos biológicos de 15, 45 e 120 dias. No grupo I - grupo controle - o defeito ósseo foi preenchido apenas pelo coágulo sanguíneo. No grupo II - o defeito ósseo foi preenchido por microesferas de hidroxiapatita. Grupo III - o defeito ósseo foi preenchido com selante de fibrina. Grupo IV – o defeito ósseo foi preenchido com microesferas de hidroxiapatita e selante de fibrina. As amostras foram avaliadas por microscopia óptica. Os resultados observados foram no grupo I formação de tecido fibroso em toda a extensão do defeito. No grupo II houve a formação óssea reparativa nas bordas do defeito e as microesferas foram permeadas por tecido conjuntivo inicialmente frouxo, com grande edema, grande quantidade de vasos, presença de infiltrado inflamatório e encapsulamento das microesferas. Ao longo do tempo esse tecido adensou-se com redução do edema, diminuição da angiogênese e do processo inflamatório. No Grupo III, a formação óssea nas margens do defeito mostrou-se limitada e algumas vezes ausente. Destaca-se a presença de uma reação inflamatória que persistiu até os 120 dias. O biomaterial preencheu o defeito em todos os pontos biológicos. No Grupo IV foi observada a neoformação óssea reparativa restrita as margens do defeito, sobre as microesferas situadas próximas as bordas do defeito. Houve uma intensa proliferação de células fusiformes e formação de tecido conjuntivo denso, entre as microesferas e com encapsulamento destas. Em conclusão, a hidroxiapatita utilizada mostrou limitada propriedade osteocondutora e aparente ausência de biocompatibilidade. O selante de fibrina retardou o processo de neoformação óssea reativa mesmo nas margens do defeito. Este, como agente aglutinante, revelou efetividade uma vez que as microesferas permaneceram no sítio de implantação em múltiplas camadas.

PALAVRAS CHAVE: Regeneração óssea. Bioengenharia. Sistema selante de fibrina. Hidroxiapatita.

CARVALHO, Ana Clara Alves de. Bone repair in a critical defect in mouse calvaria filled with hydroxyapatite microspheres and fibrin sealant. 120pp. III. 2010. Master Dissertation – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

ABSTRACT

Bioengineering is an interdisciplinary field that applies the principles of biomedical sciences and engineering, in order to seek and improve new therapies and/or develop new biomaterials. Therefore, hydroxyapatite bioceramics has physical and biological characteristics similar to the inorganic component of autogenous bone, with desirable osteogenic properties, and biocompatibility, being an excellent substitute material for bone regeneration. However, since biomaterials can be easily removed from the site for implant placement, the use of adhesive agents, such as fibrin sealant, is recommended to create a firm, mechanically stable network with good adhesive properties. This study was aimed to perform the histological assessment of bone repair in critical defect in mouse calvaria with the use of hydroxyapatite microspheres and fibrin sealant. 58 animals randomly divided into four groups and evaluated at the time periods of 15, 45 and 120 days were used. In group I – control group – the bone defect was filled in only with blood clot. In group II – the bone defect was filled with hydroxyapatite microspheres. Group III – the bone defect was filled with fibrin sealant. Group IV – the bone defect was filled with hydroxyapatite microspheres and fibrin sealant. The samples were assessed by optical microscopy. The results observed in group I were the formation of fibrous tissue along the defect. In group II regenerative bone tissue was formed over the edges of the defect and the microspheres were permeated by a loose connective tissue, with severe edema, large number of blood vessels, presence of inflammatory infiltrate and microsphere encapsulation. With the passage of time, this tissue has become more dense, with reduction in swelling, decreased angiogenesis and inflammatory process. In Group III, bone formation was reduced, and in some cases, not existent over the edges of the defect. Inflammatory reaction was noticeable, which persisted up to 120 days. The biomaterial filled the defect in all biological sites. In Group IV a new bone formation with regenerative effect, which was restricted to the edges of the defect, was observed on the microspheres close to the edges of the defect. Intense proliferation of fusiform cells and formation of dense connective tissue were seen between the microspheres, and these were encapsulated. In conclusion, the hydroxyapatite used has shown a limited osteoconductive property and apparent lack of biocompatibility. The fibrin sealant retarded the process of reactive bone formation even over the edges of the defect. The defect, in turn, as an adhesive agent, was found to be effective once the microspheres were held in place in several layers over the implant site.

KEYWORDS: Bone Regeneration. Bioengineering. Fibrin tissue adhesive. Hydroxyapatite.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Microscopia Eletrônica de Varredura da microesfera de hidroxiapatita.	50
FIGURA 2	Microscopia Eletrônica de Varredura de corte transversal (<i>cross section</i>) da microesfera de hidroxiapatita.	50
FIGURA 3	Microscopia Eletrônica do interior da microesfera de hidroxiapatita.	51
FIGURA 4	Biomaterial utilizado – microesferas de hidroxiapatita com diâmetro entre 250 e 425µm.	51
FIGURA 5	O selante de fibrina utilizado, Tissucol® (Baxter – Viena, Austria).	52
FIGURA 6	Anestesia com cloridrato de quetamina a 10% e analgesia e sedação com cloridrato de xilazina com injeção intramuscular (A); tricotomia da área cirúrgica (B); anti-sepsia com solução de álcool iodado (C).	54
FIGURA 7	Tricotomia da região frontoparietal da cabeça do animal (A); e elevação do retalho para acesso ao perióstio (B); remoção do perióstio (C); confecção do defeito crítico com fresa trefina (D); demarcação do defeito entre os vértices das suturas anterior e posterior da calvária (E); defeito crítico com 0,8cm de diâmetro (F).	55
FIGURA 8	Desenho esquemático que mostra a localização do defeito crítico confeccionado entre as suturas anterior e posterior da calvária	56
FIGURA 9	Defeito crítico preenchido com coágulo sanguíneo – Grupo I (A); defeito preenchido por microesferas de hidroxiapatita – Grupo II (B); defeito ósseo preenchido por selante de fibrina – Grupo III (C); defeito preenchido com microesferas de hidroxiapatita e selante de fibrina – Grupo IV (D).	56
FIGURA 10	Reposicionamento do retalho e sutura.	57
FIGURA 11	Redução das espécimes – (A) calvária antes da redução; (B e C) após redução a parte anterior (2/3 do defeito) foi incluída em parafina.	57
FIGURA 12	Processador automático para tecidos (LEICA - Nussloch, Alemanha).	58
FIGURA 13	Fotomicrografia Grupo I (HE /1X / 15 dias) - Neoformação óssea nas bordas do defeito. [ON – Osso Neoformado; BO – Borda óssea; TC – Tecido Conjuntivo Frouxo].	62
FIGURA 14	Fotomicrografia do Grupo I (HE /1X / 15 dias) - Ausência de núcleos	62

de mineralização na área central do defeito. Presença de tecido conjuntivo de espessura menor que a espessura óssea na borda óssea. [TC – Tecido Conjuntivo].

- FIGURA 15** Fotomicrografia do Grupo I (HE / 1X / 45 dias) - Neoformação óssea restrita as bordas do defeito. Presença de osteócitos no osso recém formado. Presença de tecido conjuntivo denso em toda extensão do defeito de espessura menor que a espessura óssea na borda do defeito. [TCD – Tecido Conjuntivo Denso; BO – Borda Óssea; ON – Osso Neoformado]. **63**
- FIGURA 16** Fotomicrografia do Grupo I (HE / 1X / 120 dias) - Neoformação restrita as bordas do defeito. Presença de osteócitos no osso recém formado aparentemente estável. [TCD – Tecido Conjuntivo Denso; BO – Borda Óssea; ON – Osso Neoformado]. **63**
- FIGURA 17** Fotomicrografia do Grupo I (HE / 1X / 120 dias) - Presença de tecido conjuntivo denso em toda extensão do defeito de espessura menor que a espessura óssea na borda do defeito. [TCD – Tecido Conjuntivo Denso]. **64**
- FIGURA 18** Fotomicrografia do Grupo II (HE / 10X / 15 dias) – Neoformação óssea nas bordas do defeito e estendendo-se entre as microesferas próximas a borda do defeito. [BO – Borda Óssea; TCF – Tecido Conjuntivo Frouxo; ME – Microesferas; ON – Osso Neoformado]. **66**
- FIGURA 19** Fotomicrografia do Grupo II (HE / 10X / 15 dias) - Microesferas formando múltiplas camadas. [TCF – Tecido Conjuntivo Frouxo; ME – Microesferas]. **66**
- FIGURA 20** Fotomicrografia do Grupo II (PIFG/ 10X/ 15 dias) – Camadas de microesferas permeadas por fibras colágenas em múltiplas direções. [V – Vasos; FC – Fibras colágenas; ME – Microesfera; ON – Osso Neoformado; BO – Borda Óssea]. **67**
- FIGURA 21** Fotomicrografia do Grupo II (HE / 20X / 15 dias) – Microesferas próximas as bordas do defeito, por onde se estende a neoformação óssea. [V – Vasos; ON – Osso Neoformado; ME – Microesfera; M – Macrófagos; CF – Células Fusiformes]. **67**
- FIGURA 22** Fotomicrografia do Grupo II (HE/ 10X/ 15 dias) – Estroma frouxo com **68**

intensa vascularização. [V – Vasos; ME – Microesfera].

- FIGURA 23** Fotomicrografia do Grupo II (HE/ 20X/ 15 dias) – Fibras colágenas concêntricas circunscrevendo as microesferas. Presença de células gigantes multinucleadas . [ME – Microesferas; CGM – Células Gigantes Multinucleadas; FC–Fibras Colágenas; M - Macrófagos]. **68**
- FIGURA 24** Fotomicrografia do Grupo II (HE/ 20X/ 15 dias) – Formação de espaços triangulares entre as microesferas com formação vascular . [ME – Microesfera; V – Vasos; CGM – Células Gigantes Multinucleadas]. **69**
- FIGURA 25** Fotomicrografia do Grupo II (PIFG/ 10X/ 45 dias) – Fibras colágenas mantendo a forma de microesferas mesmo com a sua fragmentação. [ME – Microesfera; FC – Fibras Colágenas]. **69**
- FIGURA 26** Fotomicrografia do Grupo II (PIFG / 20X / 45 dias) – Adensamento de fibras colágenas no interstício. [FC – Fibras Colágenas; ME - Microesferas]. **70**
- FIGURA 27** Fotomicrografia do Grupo II (HE /20X /45 dias) - Presença de células fusiformes de permeio ao biomaterial fragmentado. [ME – Microesferas; CF – Células Fusiformes; V - Vasos]. **70**
- FIGURA 28** Fotomicrografia do Grupo II (HE / 10X /45 dias) - Presença de fibras colágenas concêntricas em múltiplas camadas formando uma cápsula em torno da microesfera. Presença intensa de células inflamatórias. [ME – Microesferas; CF – Células Fusiformes; FC – Fibras Colágenas]. **71**
- FIGURA 29** Fotomicrografia do Grupo II (HE / 10X / 45 dias) - Redução na proliferação de células fusiformes, porém, observou-se a preservação dos espaços capilares. [V – Vasos; FC- Fibras Colágenas]. **71**
- FIGURA 30** Fotomicrografia do Grupo II (HE / 10X / 120 dias) - Presença de fibras colágenas concêntricas em camadas múltiplas formando uma cápsula em torno da microesfera. Permanência dos espaços capilares luminares sem aparente formação de novos vasos. [FC – Fibras Colágenas; ME – Microesferas]. **72**
- FIGURA 31** Fotomicrografia do Grupo II (PIFG / 10X / 120 dias) - Presença de fibras colágenas concêntricas mantendo a forma de microesferas **73**

mesmo com sua fragmentação. [FC – Fibras Colágenas; ME – Microesferas].

- FIGURA 32** Fotomicrografia do Grupo II (HE / 10X / 120 dias) – Formação de tecido conjuntivo denso entre as microesferas. [FC – Fibras Colágenas; ME – Microesferas; TCD – Tecido Conjuntivo Denso]. **73**
- FIGURA 33** Fotomicrografia do Grupo II (HE / 10X / 120 dias) – Fibras colágenas em torno das microesferas formando uma cápsula fibrosa. [FC – Fibras Colágenas; ME – Microesferas]. **73**
- FIGURA 34** Fotomicrografia do Grupo III (PIFG / 20X / 15 dias) – Borda óssea sem neoformação óssea reparativa. Estroma com espessura equivalente a espessura óssea remanescente. [BO- Borda Óssea; FC – Fibras Colágenas]. **75**
- FIGURA 35** Fotomicrografia do Grupo III (PIFG / 1X / 15 dias) - Tecido conjuntivo frouxo ocupando toda extensão do defeito. [TCF- Tecido Conjuntivo Frouxo]. **75**
- FIGURA 36** Fotomicrografia do Grupo III (PIFG / 10X / 15 dias) – Presença de material amorfo não colagênico, eosinofílico constituído pela fibrina na região do defeito. [Fi - Fibrina]. **76**
- FIGURA 37** Fotomicrografia do Grupo III (PIFG / 10X / 15 dias) - Tecido conjuntivo frouxo ocupando toda extensão do defeito, mais adensado na região mais profunda do defeito (em contato com a dura-máter). [TC – Tecido Conjuntivo; V - Vasos]. **76**
- FIGURA 38** Fotomicrografia do Grupo III (PIFG / 20X / 15 dias): Reação granulomatosa ocasional sobre a fibrina. Neoformação vascular acentuada. [RG – Reação Granulomatosa; FC – Fibras Colágenas] **77**
- FIGURA 39** Fotomicrografia do Grupo III (PIFG /10X / 45 dias): Neoformação óssea restrita as margens do defeito. Presença de fibras colágenas preenchendo o defeito [ON – Osso Neoformado; FC – Fibras Colágenas; Fi - Fibrina]. **77**
- FIGURA 40** Fotomicrografia do Grupo III (PIFIG / 10X / 45 dias): Presença de tecido conjuntivo frouxo ocupando todo o defeito. Na área mais profunda presença de tecido conjuntivo mais denso e na região mais superficial de tecido conjuntivo frouxo. [TCD – Tecido Conjuntivo **78**

	Denso; TCF – Tecido Conjuntivo Frouxo].	
FIGURA 41	Fotomicrografia do Grupo III (HE / 10X / 45 dias) - Intensa formação vascular. [V - Vasos].	78
FIGURA 42	Fotomicrografia do Grupo III (HE / 10X / 45 dias) - Intensa formação vascular. Permanência de processo inflamatório mononuclear e de células fusiformes [V – Vasos; CF – Células Fusiformes].	79
FIGURA 43	Fotomicrografia do Grupo III (HE / 20X / 45 dias) Reação granulomatosa ocasional. Presença de material amorfo não colagênico, fibrina. [RG – Reação Granulomatosa; Fi - Fibrina].	79
FIGURA 44	Fotomicrografia do Grupo III (HE / 10X / 120 dias) - Discreta neoformação óssea reparativa restrita as margens do defeito. Presença de tecido conjuntivo mais delgado com aproximadamente um terço da espessura do osso remanescente. [BO – Borda Óssea; ON – Osso Neoformado; TC – Tecido Conjuntivo].	80
FIGURA 45	Fotomicrografia do Grupo III (PIFG / 10X / 120 dias): Presença de tecido conjuntivo mais adensado ocupando todo o defeito. Preservação dos espaços vasculares. [FC- Fibras Colágenas; V – Vasos; Fi - Fibrina].	80
FIGURA 46	Fotomicrografia do Grupo III (HE / 10X / 120 dias) - Discreta neoformação óssea reparativa. Permanência dos espaços capilares. [BO – Borda Óssea; ON – Osso Neoformado; TC – Tecido Conjuntivo].	81
FIGURA 47	Fotomicrografia do Grupo III (PIFG / 10X / 120 dias) - Presença de tecido fibroso mais denso, com fibras colágenas em várias direções nas áreas mais superficiais. [BO – Borda Óssea; ON – Osso Neoformado; FC – Fibras Colágenas].	81
FIGURA 48	Fotomicrografia do Grupo IV (HE / 1X / 15 dias) – Borda do defeito com neoformação óssea reativa. [ME – Microesferas; BO – Borda Óssea; ON – Osso Neoformado; TC – Tecido Conjuntivo].	83
FIGURA 49	Fotomicrografia do Grupo IV (PIFG / 10X / 15 dias) – Borda do defeito com limitada neoformação óssea reativa. [ME – Microesferas; BO – Borda Óssea; ON – Osso Neoformado; FC – Fibras Colágenas; V - Vasos].	83
FIGURA 50	Fotomicrografia do Grupo IV (HE / 40X / 15 dias) - Neoformação	84

vascular acentuada e moderado infiltrado inflamatório mononuclear. Presença de osteoblastos ainda ativos na superfície do osso neoformado. [V – Vasos; M- Macrófagos; O – Osteoblastos; ON – Osso Neoformado; CF – Células Fusiformes].

- FIGURA 51** Fotomicrografia do Grupo IV (HE / 10X / 15 dias) – Fibras Colágenas concêntricas em torno das microesferas. [V – Vasos; FC – Fibras Colágenas; M – Macrófagos; ME – Microesferas]. **84**
- FIGURA 52** Fotomicrografia do Grupo IV (HE / 10X / 15 dias) – Estroma celuloso com presença de infiltrado inflamatório mononuclear. Presença de células gigantes multinucleadas. [CGM – Células Gigantes Multinucleadas; ME – Microesferas]. **85**
- FIGURA 53** Fotomicrografia do Grupo IV (PIFG /40X / 15 dias) – Interface entre biomaterial e interstício com reação granulomatosa. [RG – Reação Granulomatosa; CF – Células Fusiformes; ME – Microesferas; M - Macrófagos]. **85**
- FIGURA 54** Fotomicrografia do Grupo IV (HE / 20X / 15 dias) - Grande quantidade de células fusiformes dispostas de forma circunjacente as microesferas. [CF – Células Fusiformes; ON – Osso Neoformado; BO – Borda Óssea; M- Macrófagos; FC – Fibras Colágenas]. **86**
- FIGURA 55** Fotomicrografia do Grupo IV (HE / 1X / 15 dias) - Defeito preenchido por microesferas em multicamadas com tecido conjuntivo frouxo de permeio. [TCF – Tecido Conjuntivo Frouxo; ME - Microesferas]. **86**
- FIGURA 56** Fotomicrografia do Grupo IV (HE / 10X / 15 dias) - Tecido conjuntivo frouxo permeando as microesferas nos espaços triangulares formados entre elas. [TCF – Tecido Conjuntivo Frouxo; CGM – Células Gigantes Multinucleadas]. **87**
- FIGURA 57** Fotomicrografia do Grupo IV (HE / 20X / 15 dias): Microesfera constituída de material particulado pouco coeso apresentando algumas células fusiformes no seu interior. [ME – Microesferas; CF – Células Fusiformes]. **87**
- FIGURA 58** Fotomicrografia do Grupo IV (HE / 20X / 15 dias): Presença de células gigantes multinucleadas em torno do biomaterial. [ME – Microesferas; V – Vasos; CGM – Células Gigantes Multinucleadas]. **88**

- FIGURA 59** Fotomicrografia do Grupo IV (HE / 20X / 15 dias): Tecido conjuntivo frouxo preenchendo espaços entre as microesferas. Presença de células gigantes multinucleadas em torno do biomaterial. [ME – Microesferas; TCF – Tecido Conjuntivo frouxo; CGM – Células Gigantes Multinucleadas]. **88**
- FIGURA 60** Fotomicrografia do Grupo IV (HE /10X / 45 dias): Borda óssea revelando discreta neoformação óssea reativa restrita a borda do defeito. [ON – Osso Neoformado; BO – Borda Óssea; V - Vasos]. **89**
- FIGURA 61** Fotomicrografia do Grupo IV (PIFG / 10X / 45 dias) - Presença de grande quantidade de células macrofágicas circundando as microesferas e formação, em torno de cada microesfera, de fibrose. [ME – Microesferas; FC – Fibras Colágenas; CF – Células Fusiformes; V – Vasos; CGM – Células Gigantes Multinucleadas]. **89**
- FIGURA 62** Fotomicrografia do Grupo IV (HE / 10X / 45 dias) - Formação, em torno de cada microesfera, de cápsula fibrosa que permanece com a fragmentação do biomaterial. [ME – Microesferas; FC – Fibras Colágenas]. **90**
- FIGURA 63** Fotomicrografia do Grupo IV (PIFG / 10X / 120 dias): Presença de tecido conjuntivo denso entre as microesferas. [ME – Microesferas; TCD – Tecido Conjuntivo Denso; CGM – Células Gigantes Multinucleadas]. **90**
- FIGURA 64** Fotomicrografia do Grupo IV (PIFG / 10X / 120 dias): Presença de cápsula fibrosa em torno do biomaterial. [ME – Microesferas; FC – Fibras Colágenas]. **91**
- FIGURA 65** Desenho esquemático do preenchimento do defeito com microesferas (○) resultando na formação de espaço triangulares (▲) que permitem a proliferação vascular, migração celular e formação de matriz osteóide. **98**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Componentes do selante de fibrina.	52
TABELA 2	Número de animais segundo grupo e ponto biológico para destacar as fibras de colágeno.	53
TABELA 3	Sequência de lavagem de lâminas.	59

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	Análise por Difração de Raio X da hidroxiapatita estequiométrica.	49
GRÁFICO 2	Gráfico de análise por espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).	49

LISTA DE ABREVIATURAS

ad libitum – expressão em latim que significa “à vontade”

BO – Borda óssea

BMPs – Proteínas ósseas morfogenéticas encontradas na matriz osteóide

CaCl₂-0,15M – Cloreto de cálcio com concentração 0,15 molar

Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ - Fórmula estequiométrica da hidroxiapatita

CBPF – Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas

CDHA – Hidroxiapatita deficiente em cálcio

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CF – Células Fusiformes

CGM – Células Gigantes Multinucleadas

CI – Células Inflamatórias

Cl- Cloro

cm – Centímetro, unidade de medida de comprimento

CO₃²⁻ – Íon carbonato

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

et al. – Abreviatura de *et alii* que significa “e outros”

F - Flúor

FC – Fibras colágenas

FGF – Fator de crescimento de fibroblastos

Fi – Selante de fibrina

g- Grama, unidade de medida de massa

HA – Hidroxiapatita estequiométrica

HE – Hematoxilina – eosina

HPO₄ – Ácido pirofosfórico

I – Interstício

ICS – Instituto de Ciências da Saúde

IGF – Fator de crescimento insulínico

IPAC- Instituto de Patologia Geral e Clínica

K - Potássio

ME – Microesfera de hidroxiapatita

Mg - Magnésio

ml – Mililitro, unidade de medida de volume

mm – Milímetro, unidade de medida de comprimento

Na – Sódio

n° - Número

O – Osteoblastos Ativos

Obj. – Objetiva de análise das lâminas ilustradas

ON – Osso Neoformado

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

PIFG – Picrosírius Red

RG – Reação Granulomatosa

rpm – Rotações por minuto

SP – São Paulo

TC – Tecido Conjuntivo

TCD – Tecido Conjuntivo Denso

TCF – Tecido Conjuntivo Frouxo

TGF- β – Fator de transformação do crescimento

UEFS – Universidade Estadual de Feira de Santana

UFBA – Universidade Federal da Bahia

μm - Micrômetro, unidade de medida de comprimento

$^{\circ}\text{C}$ – Grau centígrado, unidade de medida de temperatura

% - Porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO -----	23
2. REVISÃO DE LITERATURA -----	27
2.1 TECIDO ÓSSEO -----	28
2.2 REPARO ÓSSEO -----	32
2.3 BIOENGENHARIA TECIDUAL -----	34
2.4 BIOMATERIAIS -----	36
2.4.1 Biomaterias à base de fosfato de cálcio -----	39
2.4.1.1 Hidroxiapatita -----	40
2.4.2 Selante de fibrina -----	41
2.4.3 Associação entre selante de fibrina e cerâmicas de hidroxiapatita -----	43
3. OBJETIVO -----	45
3.1 OBJETIVO GERAL -----	46
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS -----	46
4. METODOLOGIA -----	47
4.1 BIOMATERIAL -----	48
4.1.1 Microesferas de Hidroxiapatita -----	48
4.1.2 Selante de Fibrina -----	52
4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS -----	53
4.3 TÉCNICA CIRÚRGICA -----	53
4.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS -----	57
4.5 ETAPA LABORATORIAL -----	58
4.5.1 Inclusão em parafina -----	58
4.5.2 Microscopia óptica -----	58
5. RESULTADOS -----	60
5.1 GRUPO I – DEFEITO VAZIO (CONTROLE) -----	61
5.2 GRUPO II – DEFEITO ÓSSEO PREENCHIDO POR MICROESFERAS DE HIDROXIAPATITA-----	64
5.3 GRUPO III – DEFEITO ÓSSEO PREENCHIDO COM SELANTE DE FIBRINA -----	74
5.4 GRUPO IV – DEFEITO ÓSSEO PREENCHIDO COM MICROESFERAS DE HIDROXIAPATITA E FIBRINA -----	82

6. DISCUSSÃO	92
7. CONCLUSÃO	106
REFERÊNCIAS	108
ANEXO A	121

1.INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tecido metabolicamente ativo que sofre remodelação contínua ao longo da vida. Tal remodelação envolve a remoção de osso mineralizado pelos osteoclastos, seguida pela formação da matriz óssea pelos osteoblastos, que posteriormente se torna mineralizada (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006). Esse tecido possui uma adequada capacidade regenerativa e quando lesado, em muitas situações, é capaz de restabelecer perfeitamente sua estrutura arquitetônica e as suas propriedades mecânicas. No entanto, esta capacidade regenerativa tem limites e pode falhar em certas condições (PINHEIRO *et al.*, 2004).

As condições que influenciam para que o reparo ósseo se consolide são a presença de uma adequada vascularização, a presença de um arcabouço tridimensional (GONDIM, 2007; SALGADO, 2002) além do tamanho e local do sítio lesionado (KIM *et al.*, 2006), a preservação ou não do periósteo, a interposição de tecido mole ou a presença de osso necrótico entre os fragmentos ósseos, a infecção local e a inadequada imobilização do material implantado com o seu conseqüente deslocamento (BARRIAS *et al.*, 2005).

Sendo assim, quando a estrutura biológica de um órgão ou tecido não pode ser reparada espontaneamente, uma alternativa viável para o restabelecimento da arquitetura do compartimento danificado é recompô-lo com um biomaterial. Para este fim, a utilização de osso autógeno é a alternativa considerada padrão ouro uma vez que este possui propriedades osteocondutora, osteogênica e osteoindutora além de não induzir rejeição imunológica, assim como evita o risco de insucessos que permeia regimes terapêuticos à base de implantes aloplásticos (BECKER *et al.*, 1995; GIANNOUDIS; DINOPOULUS; TSIRIDIS, 2005; LE GUEHENNEC; LAYROLLE; DALCUSI, 2004). No entanto, a quantidade de osso requerido pode ser uma limitação a sua utilização assim como a considerável reabsorção e redução na viabilidade que tem sido observado na sua utilização (GIANNOUDIS; DINOPOULUS; TSIRIDIS, 2005; LE GUEHENNEC; LAYROLLE; DALCUSI, 2004).

A perda ou dano a um órgão ou tecido acarreta, além da alteração na função, problemas estéticos e transtornos sociais e psicológicos. Os avanços alcançados nas áreas biomédicas e nas engenharias têm possibilitado o desenvolvimento de técnicas que minimizam o dano e com isso permitem uma melhor qualidade de vida. A bioengenharia tecidual óssea é um campo multidisciplinar que aplica os princípios das ciências biológicas e das engenharias para o desenvolvimento de substitutos de órgãos e tecidos que visem a sua regeneração, com conseqüente melhoria da estética e função (LANGER; VACANTI, 1999; MIGUEL *et al.*,

2006; STEVENS; GEORGE, 2005). Durante os anos 90, a bioengenharia tecidual progrediu rapidamente e substitutos biológicos foram desenvolvidos para diversos tecidos do corpo (LYSAGHT; NGUY; SULLIVAN, 1998).

A engenharia de tecidos surgiu, portanto, como uma alternativa potencial diante da falência de órgãos e de lesões teciduais assim como para substituição ao transplante de órgãos que podem ser tratados pela implantação de um biomaterial que visa substituir os tecidos lesionados a fim de recriar tecidos funcionais e órgãos saudáveis. Tem-se desenvolvido ao longo da última década para corrigir defeitos de tecidos duros e moles, secundários a trauma, e a doenças congênitas ou adquiridas (KAIGLER; MOONEY, 2001).

Dentre os diferentes tipos de biomateriais, os cerâmicos têm sido estudados extensivamente e aplicados clinicamente como biomateriais regenerativos (KAWACHI *et al.*, 2000; LEGEROS, 2002) sendo a hidroxiapatita uma das principais cerâmicas utilizadas. A hidroxiapatita possui composição química similar à fase mineral dos tecidos calcificados e pode ser sintetizada com relativa facilidade em laboratório. Apresenta adequada biocompatibilidade e bioatividade, além de possuir propriedade osteocondutiva (DOURADO, 2006; ZÉTOLA, 2002).

Atualmente, tem sido proposta uma técnica regenerativa utilizando biomateriais em forma de microesferas a serem injetadas em defeitos ósseos, e que possibilitam o aumento na velocidade de regeneração tecidual. A estrutura das microesferas cerâmicas são essenciais para a neoformação óssea por possibilitar a migração celular, neovascularização, produção de matriz extra-celular, passagem de nutrientes essenciais às atividades celulares, como fatores de crescimento através dos espaços formados entre elas (CHESMEL *et al.*, 1998; MARCACCI *et al.*, 2007).

Na utilização de biomateriais, muitas vezes, pode-se observar seu deslocamento do sítio de implantação. Desta forma a utilização de um agente aglutinante pode favorecer a estabilização deste no sítio implantado. Um agente já utilizado em variadas situações clínicas é o selante de fibrina (CHEN *et al.*, 2009) que forma uma rede firme e mecanicamente estável, com boas propriedades adesivas (ZÉTOLA, 2002). O selante de fibrina é um polímero natural, que promove angiogênese, fixação e proliferação celular o que pode criar um meio propício para a regeneração óssea. O selante de fibrina tem sido utilizado ainda como meio de liberação lenta de drogas, como agente selador de cavidades, promotor da cicatrização, adesivo tecidual e como agente hemostático local (OSATHANON *et al.*, 2008).

O objetivo desse trabalho foi avaliar, *in vivo*, o potencial osteogênico de diferentes biomateriais sendo eles o selante de fibrina e as microesferas de hidroxiapatita utilizados isoladamente ou em associação, através de avaliação histológica.

2.REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O TECIDO ÓSSEO

O sistema esquelético, e especialmente o tecido ósseo, possuiu diversas funções, destacando-se como maior reservatório de cálcio do corpo humano. Desta forma desempenha um papel imprescindível na homeostase mineral além de proteger órgãos vitais, alojar a medula óssea, formadora das células sanguíneas, proporcionar apoio aos músculos esqueléticos transformando suas contrações em movimentos úteis, e constituir um sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005; ROBBINS *et al.*, 2000).

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea. Sua composição é distribuída em aproximadamente 8% de água e 92% de material sólido, sendo este último dividido em aproximadamente 21% de material orgânico e 71% de material inorgânico (ANDRADE *et al.*, 2007; LEGEROS, 2002). Estas duas fases interagem para fornecer propriedades mecânicas de elasticidade, resistência e dureza, inerentes a este tecido (HING, 2004; LEGEROS, 2002).

O principal sal inorgânico constituinte do osso é o fosfato de cálcio, que forma cristais nanométricos de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Análises químicas revelam que o tecido ósseo não é composto puramente pela hidroxiapatita, mas também por íons e impurezas incluindo CO_3 , HPO_4 , F, Cl, Mg, Na, íons de K, e alguns oligoelementos como o estrôncio e o zinco (LEGEROS, 2002; ROSCHGER *et al.*, 2008).

O material orgânico, ou matriz óssea, é a estrutura de suporte para deposição dos sais inorgânicos, sendo constituído por aproximadamente 90% de proteínas colágenas. As moléculas não colágenas constituem aproximadamente 3 a 5% do material orgânico, e são as responsáveis pela criação de sítios ativos para a biomineralização e para a adesão celular durante os fenômenos de formação e reabsorção óssea (BORD *et al.*, 1996; HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; KATCHBURIAN; ARANA, 2004; MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005).

Alguns exemplos de moléculas não colágenas presentes neste tecido são a osteocalcina, que contém em sua molécula resíduos do ácido carboxyglutâmico- α que promovem a ligação com o cálcio favorecendo a mineralização óssea ou regulação do crescimento dos cristais (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005; ROACH *et al.*, 1994). A osteopontina que participa da mineralização óssea por conter sítios de ligação ao

cálcio e adesão dos osteoblastos e osteoclastos a matriz óssea (ROACH *et al.*, 1994). Dentre as glicoproteínas ácidas encontradas no tecido ósseo, destaca-se a osteonectina que é considerada a proteína não colagênica mais abundante do osso e está manifestada nas células osteoprogenitoras, osteoblastos e osteócitos recentemente formados. Está relacionada com a mineralização óssea, porém sua função não é claramente definida (ROACH *et al.*, 1994).

Observam-se ainda as sialoproteínas ósseas, encontradas restritamente na matriz óssea mineralizada. Uma associação de proteínas como a sialoproteína óssea e a osteocalcina com fibrilas colágenas criam alta concentração local de cálcio, levando a precipitação do mineral. A sialoproteína óssea promove ainda, reabsorção óssea por aumentar a adesão dos osteoclastos à matriz óssea. A osteoprotegerina, também conhecida como fator de inibição da osteoclastogênese, funciona como inibidor da ativação e maturação dos osteoclastos (KATCHBURIAN; ARANA, 2004; MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005; ROACH *et al.*, 1994). Outro importante constituinte da matriz osteoide é o grupo das proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), que se relacionam aos fatores de crescimento TGF- β , que são encontradas durante o desenvolvimento de vários órgãos, inclusive do esqueleto (KATCHBURIAN; ARANA, 2004; MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005).

O tecido ósseo está em constante remodelação, apesar do aspecto aparentemente inerte, e sua massa total depende da relação de equilíbrio existente entre a formação e a reabsorção óssea (SILVA *et al.*, 2005). O ciclo de remodelação óssea consiste em três fases sucessivas: a reabsorção, a reversão e a formação. A reabsorção começa com a migração de pré-osteoclastos à superfície do osso onde formam osteoclastos multinucleados que reabsorvem o osso. Os osteoclastos secretam ácido clorídrico que dissolve a matriz mineral do osso, enquanto proteases degradam a porção orgânica. A reabsorção ocorre principalmente por ação dos osteoclastos, mas os osteócitos também podem reabsorver localizadamente matriz óssea. Após a conclusão da reabsorção osteoclástica, há uma inversão de fase, quando os osteoblastos e pré-osteoblastos ocupam a superfície do osso. Estas células preparam a superfície para começarem a formação óssea e enviam sinais para migração e diferenciação dos osteoblastos. A fase de formação ocorre com a participação dos osteoblastos até que o osso reabsorvido seja completamente substituído por novo. Há a atração de osteoblastos para cavidade de reabsorção e, sob influência de vários hormônios e fatores de crescimento, diferenciam-se em osteoblastos ativos para preenchê-la com o novo osso. Quando esta fase for concluída, a superfície é coberta por células de revestimento achatadas e um período de

repouso prolongado começa até que um novo ciclo de remodelação óssea seja iniciado (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; SIKAVITSAS; TEMENOFF; MIKOS, 2001).

Alguns autores diferenciam uma fase inicial que correspondente à fase de ativação, onde os pré-osteoclastos são estimulados a diferenciar-se em osteoclastos maduros quando influenciado por citocininas e fatores de crescimento (SIKAVITSAS; TEMENOFF; MIKOS, 2001).

Durante esses processos são encontrados três tipos de células ósseas: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. São encontradas ainda, no tecido ósseo, células mesenquimais provenientes da medula óssea e dos vasos sanguíneos capazes de se diferenciar em células osteogênicas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; LEGEROS, 2002; MEGHJI, 1992; ROBBINS *et al.*, 2000).

Os osteoblastos são células responsáveis pela formação do tecido ósseo, por sintetizar os componentes da matriz orgânica e controlar a sua mineralização. Com grande importância na cicatrização, são derivados do periósteo, endósteo e células mesenquimais indiferenciadas circulantes (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; LYNCH; GENKO; MARX, 1999). São células secretoras de proteínas colágenas e não colágenas, de proteoglicanos da matriz óssea, de metaloproteinases que regulam fatores de crescimento e citocinas reguladoras do desenvolvimento osteoclástico. A diferenciação e o desenvolvimento dos osteoblastos a partir de células osteoprogenitoras são dependentes da liberação das proteínas ósseas morfogenéticas (BMP) e fatores de crescimento, como o fator de crescimento de insulina (IGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF). Os osteoblastos depositam matriz osteóide que, quando mantida imóvel durante o processo de cicatrização, torna-se uma estrutura mineralizada (PETERSON e t al., 2003). Estão localizados na superfície óssea, promovendo a deposição da matriz osteóide e podem, por fim, diferenciar-se em osteócitos (AARDEN; BURGER; NIJWEIDE, 1994; ANDRADE *et al.*, 2007; TURNER, 1991).

Os osteócitos são células que ficaram aprisionadas dentro da matriz óssea durante a sua mineralização com reduzida atividade sintética e secretora. Apresentam prolongamentos citoplasmáticos cujo arranjo os permite participar da regulação da homeostasia do cálcio plasmático e perceber a carga mecânica incidida no osso transmitindo essa informação às outras células do tecido (AARDEN; BURGER; NIJWEIDE, 1994; ANDRADE *et al.*, 2007; HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; TURNER, 1991). Os osteócitos ocupam lacunas das

quais partem canalículos sendo cada lacuna ocupada por apenas um osteócito. Dentro dos canalículos os prolongamentos dos osteócitos estabelecem contatos através de junções comunicantes por onde podem passar pequenas moléculas e íons de um osteócito para o outro (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Os osteoclastos são células móveis, gigantes, multinucleadas e extensamente ramificadas, que se originam da fusão de células da linhagem monocitofagocítica dos tecidos hematopoiéticos (KATCHBURIAN; ARANA, 2004). Seu mecanismo de ação, na reabsorção da matriz óssea, deve-se à secreção para dentro desse microambiente fechado, de ácidos (H⁺), colagenase e outras hidrolases que atuam localmente digerindo a matriz orgânica e dissolvendo os cristais de sais de cálcio (FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL *et al.*, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Osteoblastos e osteoclastos surgem de linhagens de células distintas e processos de maturação diferenciados. Os osteoblastos surgem de células mesenquimais indiferenciadas, enquanto os osteoclastos se originam da diferenciação dos monócitos hematopoiéticos. As diferenças entre as atividades osteoclástica e osteoblástica podem ser originadas de uma grande variedade de mudanças hormonais e nos fatores de crescimento, ou perturbações como processos inflamatórios, resultando em alterações ósseas caracterizadas pela diminuição ou aumento da massa óssea (ROODMAN, 1999).

Nesses mecanismos é importante a participação de hormônios reguladores de cálcio destacando-se o paratormônio e a calcitonina produzidos respectivamente pelas glândulas tireóide e paratireóide, e do calcitriol (vitamina D ativa) como regulador do cálcio extracelular. O paratormônio é o principal regulador do metabolismo de cálcio sendo liberado diante da redução do seu nível plasmático. Tem como células alvos os osteoclastos e com isso aumenta a atividade reabsortiva (VERONEZE, 2008). Atua ainda diminuindo a absorção renal de fósforo e estimulando a síntese de calcitriol, o que aumenta indiretamente a reabsorção intestinal de cálcio e fósforo (CARDOSO *et al.*, 2007). A calcitonina produz um efeito contrário, sendo sua secreção mediada pelo aumento da concentração sérica de cálcio, favorecendo sua deposição no tecido ósseo e manutenção da massa esquelética (VERONEZE, 2008).

A matriz óssea mineralizada é revestida por duas membranas não calcificadas de natureza conjuntiva. O perióstio, localizado mais externamente, é constituído de fibras colágenas e fibroblastos na sua região mais externa, e na sua região mais interna, além de uma camada de células de revestimento potencialmente osteogênica, possui células

indiferenciadas. E o endóstio que é constituído apenas por uma camada de osteoblastos ou de células de revestimento e apresenta, em geral, maior atividade que o perióstio. São encontradas ainda pré-osteoblastos, derivadas de células mesenquimais indiferenciadas cuja função é diferenciar-se em osteoblastos (KATCHBURIAN; ARANA, 2004).

O tecido ósseo pode ser classificado histologicamente em tecido ósseo imaturo ou primário, e maduro, secundário ou lamelar. Os dois tipos possuem as mesmas células e os mesmos constituintes da matriz. No tecido primário as fibras colágenas se dispõem irregularmente, sem orientação definida e com menor quantidade de mineral enquanto que no secundário as fibras se organizam em lamelas. Este por sua vez possui fibras colágenas organizadas em lamelas que ficam paralelas umas às outras ou se dispõem em camadas concêntricas em torno de canais com vasos, formando o sistema de Havers ou ósteons. Cada ósteon é um cilindro formado por quatro a 20 lamelas ósseas concêntricas que no centro possui um canal revestido de endóstio, o canal de Havers, que contém vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. Os canais de Havers comunicam-se entre si, com a cavidade medular e com a superfície externa do osso por meio de canais transversais ou oblíquos que atravessam as lamelas, os canais de Volkmann (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; LYNCH; GENKO; MARX, 1999; MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005).

Em um osso maduro, geralmente dois tipos de tecido podem ser diferenciados macroscopicamente, o osso esponjoso e o osso compacto. Entretanto, em ambos a estrutura é basicamente a mesma, sendo constituídos por sistemas lamelares e com diferenças apenas na quantidade e disposição das lamelas e na existência ou não de espaços entre os referidos sistemas. O osso esponjoso é formado por lamelas, na sua maioria, paralelas entre si. As lamelas formam delgadas trabéculas que deixam, entre elas, amplos espaços preenchidos por tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos e tecido hematopoiético, constituindo, portanto, parte da medula óssea. No entanto, o osso compacto é formado por numerosos sistemas de lamelas concêntricas (KATCHBURIAN; ARANA, 2004).

2.2 REPARO ÓSSEO

O tecido ósseo, quando lesado, é capaz de regeneração, fenômeno que demonstra sua permanente vitalidade (KATCHBURIAN; ARANA, 2004; LYNCH; GENKO; MARX, 1999). A regeneração óssea é um termo aplicado ao processo biológico em que a estrutura e a função do tecido lesado ou perdido são completamente restaurados (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

É necessário compreender que a consolidação do reparo no tecido ósseo é condicionada por fatores como o suprimento sanguíneo, a estabilidade mecânica, a presença de um arcabouço tridimensional que oriente a proliferação celular (GONDIM, 2007; SALGADO, 2002) e o tamanho do sítio lesionado, pois em regiões em que a morfologia e dimensão do defeito são extensas e críticas ao reparo, o mecanismo de reparo torna-se limitado. A angiogênese é um fator importante no processo de reparo ósseo, pois possibilita a oxigenação local e o afluxo de nutrientes, além da liberação de fatores de crescimento. Em defeito ósseo com dimensão crítica, a vascularização insuficiente pode resultar na formação de tecido fibroso (FILVAROFF, 2003; KLENKE *et al.*, 2008; O'KEEFE *et al.*, 2006).

O processo de reparo ósseo é descrito por três fases: fase inflamatória, fase reparadora e fase de remodelação. A fase inflamatória é caracterizada pela formação de um coágulo sanguíneo que envolve as superfícies ósseas no local da lesão, estendendo-se pelo periósteo e cavidades medulares próximas, acompanhadas de edema mais ou menos intenso. Instala-se, assim, um processo inflamatório agudo com grande mobilização de neutrófilos e macrófagos provocado pela liberação de substâncias quimiotáticas. Imediatamente após, inicia-se a fase reparadora com o aparecimento de um grande número de fibroblastos produtores de colágeno tipo III responsáveis pela formação de um calo fibroso, no qual as fibras colágenas envolvem a região lesionada. À medida que a ação dos macrófagos prossegue, uma nova rede capilar é formada oriunda das células endoteliais remanescentes dos vasos rompidos e das células mesenquimais indiferenciadas, as quais invadem a região do coágulo, juntamente com fibroblastos e osteoblastos, para formar, rapidamente, um novo tecido ósseo no local, por um processo de ossificação intramembranosa ou endoconjuntiva, resultando em um osso imaturo. Na fase remodeladora, processos de reabsorção e neoformação ocorrem até que a região lesionada retome as características morfológicas, biomecânicas e funcionais que possuíam antes da lesão (GUIMARÃES, 1982; POSPISILOVÁ, 1982). É fundamental a compreensão de que os osteoblastos, células formadoras da matriz osteoide, por serem células completamente diferenciadas, apresentam capacidade limitada de migração e proliferação. Assim, para a formação óssea em um sítio determinado, células progenitoras mesenquimais indiferenciadas (células osteoprogenitoras) migram até o sítio e diferenciam-se em osteoblastos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; LYNCH; GENKO; MARX, 1999).

No tecido ósseo, defeitos com dimensões reduzidas reparam-se com facilidade em virtude de disporem de mecanismo reparador semelhante ao da osteogênese embriológica (SEAL; OTERO; PANITCH, 2001), mecanismo este que não ocorre em defeitos que

apresentam dimensões maiores (GONDIM, 2007; HONMA *et al.*, 2008). Sendo assim, o menor defeito intra-ósseo que não se regenera espontaneamente por completo é definido como tamanho de defeito crítico (SCHMITZ *et al.*, 1990; SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

Diversas situações clínicas podem requerer estimulação para neoformação óssea como ressecções de tumores, fraturas não consolidadas e as más-formações congênitas (GIANNOUDIS; DINOPOULUS; TSIRIDIS, 2005). A perda ou a remoção cirúrgica de fragmentos ósseos também podem proporcionar defeitos, em geral, largos para serem preenchidos de forma espontânea e promoverem, desta forma, o reparo ósseo (PINHEIRO *et al.*, 2004). As perdas ósseas constituem ainda um dos maiores problemas dentro das especialidades odontológicas. A estimulação para neoformação óssea pode ser necessária, portanto, no aumento ou reconstrução do rebordo alveolar, preenchimento de defeitos intra-ósseos e de alvéolos dentários, elevação de assoalho do seio maxilar e tratamento de defeitos perimplantares (MURUGAN; RAMAKRISHMA, 2005). Devido à perda óssea promovida por fraturas faciais, pelos defeitos periodontais, pelos processos patológicos do sistema estomatognático como osteomielite, lesões císticas, tumores odontogênicos, e principalmente em função da crescente necessidade de osteointegração de implantes e enxertos ósseos, pesquisadores buscam desenvolver novas tecnologias que auxiliem ou acelerem o processo de reparo ósseo (GONDIM, 2007).

2.3 BIOENGENHARIA TECIDUAL

A bioengenharia é um campo interdisciplinar que explora uma combinação entre células, engenharia de materiais e fatores bioquímicos apropriados na criação de uma variedade de maneiras para melhorar, substituir, restaurar, manter ou melhorar tecidos vivos ou órgãos inteiros (DOROZHKIN, 2009). Por meio de conhecimentos das ciências biológicas e das engenharias empenha-se em desenvolver biomateriais e procedimentos que levem à otimização da regeneração óssea, especialmente quando esta não ocorre espontaneamente (LANGER; VACANTI, 1999; MIGUEL *et al.*, 2006; STEVENS; GEORGE, 2005). Neste campo, pesquisadores tentam mimetizar o processo natural de reparo ósseo por meio da utilização de arcabouços disponíveis em diversas formas de apresentação, carregados ou não com células, proteínas adsorvidas ou medicamentos (ANSELME, 2000; AHMED; DARE; HINCKE, 2008; ALSBERG *et al.*, 2002; ANDRADE, 2006; UEDA *et al.*, 2000; UEMURA *et al.*, 2003). Previamente a sua utilização os biomateriais são testados, fazendo-se necessário, inicialmente, determinar, em nível laboratorial, suas características físico-químicas.

Posteriormente, o biomaterial deve ser submetido a testes *in vitro*, para que, finalmente, possa ser testado *in vivo*. Sabe-se que a pesquisa em animais apresenta limitações, pois os animais são diferentes dos seres humanos e existem grandes variações entre espécies animais. Portanto, deve-se ter cautela ao se extrapolar qualquer resultado entre as espécies, o que torna os ensaios clínicos inevitáveis para assegurar a aplicação clínica e a utilização em nível comercial dos biomateriais (BARRETO, 2008).

Lesões ou defeitos ósseos ocorrem nas mais variadas situações clínicas e a reconstrução tecidual, que devolve integridade funcional e mecânica, constitui-se num passo necessário para a reabilitação do paciente. A maior parte das lesões, em virtude do seu potencial de regeneração espontânea, repara-se adequadamente pelo emprego de terapias conservadoras ou técnicas cirúrgicas convencionais (ALSBERG *et al.*, 2002; CANCEDEA *et al.*, 2003) porém, inúmeras situações exigem intervenções que estimulem a reparação óssea (GIANNOUDIS; DINOPOULUS; TSIRIDIS, 2005).

A possibilidade de regeneração de tecidos e órgãos com algum tipo de dano biológico tem-se constituído numa preocupação notável ao longo dos séculos (COSTA; MIGUEL; ROSA, 2005). O uso de materiais biocompatíveis para reconstrução óssea tem ocorrido objetivando-se devolver função ao tecido e com isso melhorar a qualidade de vida dos pacientes (ANDRADE, 2006; WAN; NACAMULI; LONGAKER, 2006).

Independente da natureza do defeito ósseo, para estimular a neoformação óssea, a utilização do osso autógeno tem-se revelado o mais eficiente, sendo considerado padrão-ouro em função da sua principal característica, o comprovado potencial osteogênico, a osteoindução e osteocondução (INTINI *et al.*, 2008; GIANNOUDIS; DINOPOULUS; TSIRIDIS, 2005; LEGEROS, 2002). O enxerto ósseo autógeno é obtido do mesmo indivíduo, removido de um sitio doador, reduzindo a possibilidade de incompatibilidade imunológica e rejeição tecidual (LEGEROS, 2002). No entanto, em função de limitações apresentadas por esse tipo de enxerto que incluem a morbidade da área doadora, o aumento do tempo operatório e a disponibilidade limitada pode-se tornar necessário a utilização de outros métodos que auxiliem no mecanismo de regeneração (GIANNOUDIS; DINOPOULUS; TSIRIDIS, 2005; INTINI *et al.*, 2008).

Outras alternativas viáveis são a utilização dos enxertos homogêneos e heterogêneos. Os homoenxertos são obtidos de indivíduos diferentes, porém da mesma espécie e os heterogêneos são enxertos obtidos de espécies diferentes. Oferecem como principal vantagem a eliminação

da abordagem de um segundo sítio cirúrgico reduzindo assim o tempo e a morbidade operatória (LEGEROS, 2002) Porém, inúmeras são as situações que inviabilizam sua utilização como a oferta limitada, os custos elevados e outras complicações como a possibilidade de transmissão viral e a imunogenicidade. Sendo assim, a evolução tecnológica juntamente com uma melhor compreensão da biologia óssea conduziu ao desenvolvimento de substitutos ao enxerto ósseo, os biomateriais, sendo que vários estão atualmente disponíveis comercialmente (GIANNOUDIS; DINOPOULUS; TSIRIDIS, 2005; LEGEROS, 2002).

2.4 BIOMATERIAIS

Uma alternativa possível para o restabelecimento estrutural de uma área danificada, quando a regeneração óssea não ocorre espontaneamente, é recompô-la com um biomaterial (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005). Torna-se, portanto, necessário o desenvolvimento de biomateriais ou técnicas regenerativas com o objetivo de restabelecer a estrutura e função perdidas, haja vista que os enxertos autógenos, homólogos e heterólogos, empregados clinicamente na atualidade, apresentam algumas limitações (GIANNOUDIS; DINOPOULUS; TSIRIDIS, 2005; LEGEROS, 2002).

A aplicabilidade dos biomateriais tem sido amplamente estudada, pois tais substitutos devem ser potencialmente condutores, estimuladores e indutores de respostas celulares (PATEL *et al.*, 2005), bioativos, biocompatíveis, além de possuir custos que compensam o benefício (VERNA *et al.*, 2002). Devem ainda possuir alguns requisitos básicos para sua aplicação como não causar danos locais e sistêmicos, isto é, não devem ser citotóxicos, tumorogênicos nem radioativos. A biocompatibilidade é um outro fator de suma importância para o sucesso do tratamento provocando no organismo reações desejadas, controladas e toleradas fisiologicamente (BET *et al.*, 2003).

Os biomateriais podem ser definidos como uma substância ou combinação de duas ou mais substâncias, de origem natural ou sintética, que são utilizados para melhorar, aumentar ou substituir, parcial ou integralmente, tecidos e órgãos. Devem direcionar a forma geral e a estrutura do tecido a ser substituído, promovendo a adesão celular e subsequente crescimento tecidual permitindo a difusão de nutrientes e células através do seu arcabouço (FLECKENSTEIN *et al.*, 2006; ROSE *et al.*, 2004).

Uma das linhas de pesquisa mais importantes na engenharia de tecido ósseo é o desenvolvimento de novos e mais sofisticados arcabouços (*scaffolds*) que tenham uma função mais ativa no desenvolvimento da migração e infiltração celular. Ao invés de meramente

comportar as células, essas matrizes bioativas devem ser projetadas para incentivar a adesão e proliferação celular sobre sua superfície por meio de proteínas de adesão (BONASSAR; VACANTI, 1998).

Diversos biomateriais foram desenvolvidos para preencher e reconstruir defeitos ósseos (DACULSI *et al.*, 1992) que, quando aplicados *in vivo*, podem promover osteogênese por meio de três mecanismos a osteocondução, a osteoestimulação ou a osteoindução, sendo, os mecanismos de reparo do tecido ósseo, semelhantes ao de formação fisiológica do osso (BURCHARDT, 1983; GAROFALO, 2007; MISCH; DIETSH, 1993).

Na osteocondução o biomaterial funciona como uma matriz física ou arcabouço para deposição de novo osso, na medida em que o biomaterial propicia e favorece a fixação e proliferação dos osteoblastos diferenciados que o formarão. É caracterizada por um processo de crescimento de vasos sanguíneos, de tecidos perivasculares e presença de células osteoprogenitoras do sítio receptor. O biomaterial é gradativamente reabsorvido, quando desejado, e simultaneamente substituído por novo tecido ósseo (BAUER; MUSCHLER, 2000; CARVALHO; BASSI; VIOLIN, 2004; MARCANTONIO JUNIOR; MARCANTONIO; CIRELLI, 1999). Porém, um biomaterial osteocondutor é incapaz de induzir a diferenciação de células precursoras em osteoblastos e, portanto, sua capacidade de induzir a formação óssea é limitada (INTINI *et al.*, 2008).

O mecanismo de osteoindução envolve a formação de um novo tecido ósseo pela diferenciação local das células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, inclusive em sítios ectópicos (GOSAIN *et al.*, 2002). E a osteoestimulação que estimula as células osteogênicas do leito receptor ou do próprio enxerto ósseo a sintetizarem matriz osteóide (BURCHARDT, 1983; GAROFALO, 2007; MISCH; DIETSH, 1993; SUH *et al.*, 2001). Para adequada regeneração óssea busca-se, ainda, uma ligação entre o osso hospedeiro e o material implantado, mecanismo da osteointegração (GIANNOUDIS; DINOPOULUS; TSIRIDIS, 2005).

Com o desenvolvimento dos biomateriais tornou-se possível influenciar seletivamente o processo de formação óssea. Porém faz-se necessário conhecer a fisiologia óssea compreendendo assim os mecanismos envolvidos nos processos de reabsorção e neoformação óssea (ANDRADE *et al.*, 2007).

De modo geral, os biomateriais podem ser classificados em biomateriais de origem biológica ou natural e de origem sintética. Os de origem biológica são isolados de diferentes organismos, como algas, corais, invertebrados, plantas, tendo como exemplos o alginato, os

colágenos, o ácido hialurônico, a quitosana, o ágar, o polihidroxialcanoato, dentre outros. Os sintéticos são originados principalmente de produtos do refino do petróleo ou de misturas de diferentes compostos químicos tendo como exemplos os ácidos poli-láctico e poliglicólico, o fosfato de cálcio, o carbonato de cálcio (LEGEROS, 2002; TEXEIRA *et al.*, 2009). Dentre estes, os biomateriais que mais se aproximam das propriedades e composição mineral óssea são os formados por fosfato de cálcio (LEGEROS, 2002).

Fatores como a composição química, biocompatibilidade, produtos e tempo de degradação no organismo, propriedades mecânicas e elásticas, forma de apresentação devem ser previamente estudados para escolha do biomaterial mais adequado para cada tipo de tecido. Os biomateriais devem ser mais do que biocompatíveis, devem idealmente induzir uma resposta celular adequada, devendo estimular a adesão, diferenciação e proliferação celular (GOSAIN *et al.*, 2002; LE GUEHENNEC; LAYROLLE; DALCUSI, 2004). Podem ser produzidos em diferentes composições e utilizados em diversas formas de apresentação como pó, grânulos, pasta, discos, blocos, microesferas, gel, membranas, dentre outras (ZÉTOLA, 2002).

Atualmente, tem sido proposta uma técnica regenerativa utilizando biomateriais em forma de microesferas a serem injetadas nos defeitos ósseos, que permite aumento na velocidade da regeneração tecidual. Esta técnica implica em cirurgia minimamente invasiva, possibilitando o preenchimento das cavidades, contudo a forma de microesferas merece ser melhor investigada (CHESMEL *et al.*, 1998; MARCACCI *et al.*, 2007).

A adequada seleção do biomaterial a ser implantado na área do defeito ósseo é fundamental para o processo de reparo. Porém, para regeneração óssea outros aspectos devem ser avaliados uma vez que defeitos críticos não possuem capacidade reparadora espontânea (BRAZ *et al.*, 2003; URIST; DELANGE; FINERMAN, 1983).

Dentre as estratégias desenvolvidas com o objetivo de promover a regeneração óssea, uma tem demonstrado ser bastante favorável, a utilização de matrizes tridimensionais, que facilitam no seu interior o crescimento, diferenciação celular e proliferação tecidual, assim com a angiogênese e o consequente suprimento de oxigênio para o tecido neoformado (ZHANG *et al.*, 2007; WAN *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2007).

2.4.1 Biomateriais à base de fosfato de cálcio

Dentre os diferentes tipos de biomateriais, os à base de fosfato de cálcio têm sido estudados extensivamente e aplicados clinicamente como biomateriais regenerativos,

substitutos do enxerto ósseo autógeno (KAWACHI *et al.*, 2000). Este tipo de biomaterial, além de sua similaridade com a fase mineral do tecido ósseo, se destaca em função de ser biocompatível, radiopaco, osteocondutor, capaz de adsorver proteínas, fatores de crescimento e estabelecer condições locais necessárias à diferenciação de células osteogênicas para a formação de tecido ósseo (RIMINUCCI; BIANCO, 2003). Uma das propriedades mais importantes dos fosfatos de cálcio é sua solubilidade em água, uma vez que o comportamento *in vivo* é dependente, em grande parte, de sua solubilidade (SENA, 2004).

As cerâmicas não existem naturalmente, mas tem-se mostrado indutoras de uma resposta biológica semelhante à fisiologia do tecido ósseo. Quando conectado ao osso saudável, matriz osteóide é produzida diretamente nas superfícies da cerâmica (GIANNOUDIS; DINOPOULUS; TSIRIDIS, 2005). As biocerâmicas sintéticas atuam como substitutos ósseos e têm demonstrado uma adequada propriedade osteocondutora e resultados promissores na reparação óssea (BARRETO, 2008; BARRIAS *et al.*, 2005; LE GUEHENNEC; LAYROLLE; DALCUSI, 2004; RIBEIRO; BARRIAS; BARBOSA, 2006). São exemplos de biocerâmicas as hidroxiapatitas, fosfato tricálcico e os biovidros (TEXEIRA, 2009).

Nesse sentido, as biocerâmicas de hidroxiapatita têm sido utilizadas em várias condições clínicas nas quais é necessário o emprego de enxertos aloplásticos que apresentem biocompatibilidade com o tecido ósseo (ROSA; SHAREEF; NOORT, 2000). Utilizados inicialmente como alternativa para os metais a fim de aumentar a biocompatibilidade dos implantes, as biocerâmicas podem ser classificadas em três categorias: cerâmicas relativamente bioinertes, as bioativas (ou com superfície reativa) e bioabsorvíveis (DOROZHKIN, 2009). Embora as cerâmicas inorgânicas, inclusive as de hidroxiapatita na forma estequiométrica padrão, não exibam capacidade osteoindutiva, possuem capacidade osteocondutiva assim como uma extraordinária capacidade de se ligar diretamente ao osso (BURG *et al.* 2000; SENA, 2004).

Uma das vantagens das biocerâmicas à base de fosfato de cálcio, utilizadas como enxertos ósseos, é que tanto os íons cálcio quanto os íons fosfato não interferem na função celular e fisiológica dos tecidos adjacentes, proporcionando uma resposta tecidual favorável ao tratamento. A liberação de cálcio e fosfato, por parte das biocerâmicas, pode participar, dentro de certos limites, como estimuladores da formação óssea, bem como da reprecipitação

de uma camada de apatita carbonatada sobre a superfície do biomaterial estabelecendo uma ligação química com o osso neoformado (LEGEROS, 2002).

As biocerâmicas sintéticas à base de fosfato de cálcio vêm sendo indicadas como substituto ósseo por se comportarem como uma matriz tridimensional ou arcabouço na reparação óssea o que possibilita que as células osteoprogenitoras, através da osteocondução, formem novo osso na área do defeito (CHESMEL *et al.*, 1998; MARCACCI *et al.*, 2007).

A reatividade superficial é uma característica comum das cerâmicas ósseas bioativas e consiste na habilidade da biocerâmica em aderir ao osso, gerando grande impacto na adesão, proliferação, diferenciação e mineralização das células ósseas. A adesão entre o biomaterial e o tecido ósseo e o aumento do crescimento ósseo são o resultado de múltiplas, paralelas e seqüenciais reações que ocorrem nesta interface (DUCHEYNE; QIU, 1999).

2.4.1.1 Hidroxiapatita

As biocerâmicas de hidroxiapatita têm uma composição e estrutura muito próxima à parte mineral do osso natural. Pode favorecer a formação de apatita óssea sobre a sua superfície sendo utilizado em vários campos da biomedicina. A hidroxiapatita pode promover a adesão dos osteoblastos, migração, diferenciação e proliferação celular tendo aplicações potenciais na reparação óssea e regeneração (ZHANG *et al.*, 2010).

A hidroxiapatita representa o componente inorgânico do tecido calcificado do corpo humano, podendo ser reabsorvível ou não reabsorvível. Esta semelhança estrutural com a apatita óssea mineral permite contato e adaptação quando implantado no tecido ósseo (TEIXEIRA, 2009). A hidroxiapatita sintética é biocompatível, não é carcinogênica e nem alergênica sendo segura e clinicamente aceitável (BROWN *et al.*, 1998; DUARTE *et al.*, 2006). Contribuindo para a formação óssea, a degradação da hidroxiapatita pode ocorrer por reabsorção mediada por osteoclastos ou dissolução química (WHITE; SHORS, 1986). O mecanismo de reabsorção da hidroxiapatita pode ainda envolver a fratura das partículas à medida que ocorre a formação do novo osso no interior dos poros formados no interior do biomaterial. A dissolução do biomaterial *in vitro* depende dentre outros fatores do pH, do tipo e da concentração e do grau de saturação da solução na qual é testada, bem como a composição e cristalinidade dos fosfatos de cálcio (OONISHI *et al.*, 1997).

Existem algumas desvantagens específicas que ainda limitam o uso da hidroxiapatita cerâmica para substituição de tecidos duros, tais como sua reduzida resistência mecânica, a

realidade conflitante entre porosidade e resistência mecânica e o problema do deslocamento das partículas. Devido ao osso ser um tecido que requer algum grau de tensão mecânica para manter sua vitalidade, a estabilidade a longo prazo de um implante permanente de hidroxiapatita é questionável. A fim de minimizar, ou até mesmo superar estes problemas, uma solução seria misturá-la a um ligante adequado como o selante de fibrina (SENA, 2004).

Uma das principais características estruturais da hidroxiapatita é sua habilidade de efetuar um grande número de substituições isomórficas conservando sua estrutura hexagonal P 63/m. Cátions tais como o Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Al^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+} , Si^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} substituem o Ca^{2+} , ânions tais como F^- , Cl^- ou CO_3^{2-} substituem o OH^- e ânions tais como VO_4^{3-} ou CO_3^{2-} substituem o PO_4^{3-} na estrutura da hidroxiapatita. De um modo geral a substituição iônica na rede cristalina de um material provoca um aumento de defeitos estruturais e distorções na rede que culminam na alteração de propriedades como solubilidade, estabilidade térmica e reatividade superficial da hidroxiapatita. Por conseguinte, seu comportamento *in vitro* e *in vivo* é fortemente alterado pelas substituições. Além da substituição iônica a hidroxiapatita apresenta uma facilidade de variações de estequiometria, ou seja, não apresenta uma composição fixa, sendo sua fórmula melhor definida como: $Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$, onde x pode variar de 0 a 1, e desta forma a razão molar Ca/P situa-se entre 1,5 a 1,67. Os limites de composição determinariam a hidroxiapatita deficiente de cálcio $Ca_9HPO_4(PO_4)_5(OH)_2$ (CDHA) e hidroxiapatita estequiométrica $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (MARTIN; BROWN, 1997).

2.4.2 Selante de fibrina

Os adesivos fibrínicos, desenvolvidos em 1960, não apresentaram, na época, condições adequadas à aplicação em medicina. Porém com a evolução das técnicas laboratoriais, melhoras na síntese do adesivo fibrínico bem como nas técnicas de aplicação permitiram que esses adesivos fossem amplamente utilizados em diversas especialidades cirúrgicas (CORREA; BICAS, 2005; LE GUEHENNEC; LAYROLLE; DALCUSI, 2004; MOSHER; SCHAD, 1979; ROUSOU *et al.*, 1989). Isto é particularmente verdade ao serem utilizados para reduzir a perda de sangramento pós-operatório, como agentes hemostáticos, como indutores de processo de cicatrização e reparação tecidual, no selamento de cavidades e como meio de liberação de drogas ou fatores de crescimento em sítios cirúrgicos (ALVING *et al.*, 1995; CORREA; BICAS, 2005).

O selante de fibrina é um adesivo biológico que imita as etapas finais da cascata de coagulação. Os principais componentes são fibrinogênio, proteínas plasmáticas e fator XIII da coagulação além de trombina, cloreto de cálcio e um agente antifibrinolíticos, como aprotinina. Os componentes são extraídos do plasma humano, com exceção da aprotinina, originada do pulmão bovino, e do cloreto de cálcio que é inorgânico. A mistura de fibrinogênio e trombina simula os últimos estágios da cascata de coagulação natural de forma estruturada semelhante à coagulação fisiológica. O coágulo formado é naturalmente degradado por enzimas proteolíticas do sistema fibrinolítico, como a plasmina (DUNN; GOA, 1999; LE GUEHENNEC; LAYROLLE; DALCUSI, 2004; RADOSEVICH, GOUBRAN; BURNOUF, 1997). Contém uma solução altamente concentrada de fibrinogênio humano que, quando misturado com trombina, é convertido em monômeros de fibrina formando um coágulo instável e semi-rígido. A lise prematura do coágulo é impedida pela aprotinina, um inibidor fibrinolítico. Contém ainda componentes altamente concentrados de trombina humana e solução de cloreto de cálcio que são como co-fatores necessários para a conversão enzimática de fibrinogênio em fibrina, resultando em um coágulo estável e insolúvel (ALVING *et al.*, 1995; CORREA, 2005; MATRAS, 1982).

O selante de fibrina não é citotóxico, sendo bem tolerado, havendo poucos relatos de reações adversas associados a sua utilização (LE GUEHENNEC; LAYROLLE; DALCUSI, 2004). Vem sendo utilizado em diferentes procedimentos cirúrgicos como agente hemostático, selador de cavidades, estimulador do processo de reparação tecidual, como veículo de liberação lenta de drogas ou agentes de crescimento além de ser utilizado como material para sutura, material de fixação para enxertos ósseos e biomateriais (CHAN; BOISJOLY, 2004; CORREA, 2005; FINDIKCIOGLU *et al.*, 2009).

Os selantes de fibrina têm sido utilizados em diferentes estudos experimentais para avaliação de sua influência na reparação tecidual sendo utilizados em suas fórmulas originais ou como veículos de introdução de outros elementos que possam interferir no processo cicatricial (CORREA, 2005).

Suas propriedades biológicas estão relacionadas a sua contribuição na vascularização e no crescimento de vasos sanguíneos nas áreas do defeito ósseo. A fibrina pode promover o desenvolvimento de vasos sanguíneos e a formação de tecido de granulação altamente vascularizado (LE GUEHENNEC; LAYROLLE; DALCUSI, 2004). São ainda arcabouços naturais para a fixação e crescimento celular e a presença de diversos fatores de crescimento

pode ter um efeito positivo durante os estágios iniciais da colonização celular do osso. Apesar desses elementos, os resultados de estudos utilizando o selante de fibrina são bastante controversos (LE GUEHENNEC; LAYROLLE, DALCUSI, 2004; SCHMOEKEL *et al.*, 2005).

Devido a suas propriedades hemostáticas e adesivas, os selantes de fibrina são amplamente utilizados em cirurgia óssea, mas seu papel no reparo ósseo ainda não está bem definido (CORREA, 2005; LE GUEHENNEC; LAYROLLE, DALCUSI, 2004). Os resultados controversos são relacionados, principalmente, aos riscos de formação de fibrose (CORREA, 2005).

2.4.3 Associações entre selante de fibrina e cerâmica de hidroxiapatita

A associação de biocerâmicas de hidroxiapatita e selantes de fibrina tem sido utilizada para regeneração óssea. Esses substitutos devem possuir biocompatibilidade, ser biodegradáveis e moldáveis à medida que o crescimento ósseo é observado, além de possuir propriedades mecânicas de preenchimento e substituição na área do defeito ósseo (LE GUEHENNEC; LAYROLLE, DALCUSI, 2004).

Biomateriais em formato de microesferas, quando implantados isoladamente, não são fáceis de manusear e não possuem estabilidade mecânica no defeito ósseo formando-se assim consideráveis espaços vazios entre si. Neste contexto, a adição de um agente de ligação, como um adesivo de fibrina, pode estabilizá-las no local de implantação e produzir um composto que pode ser moldado no defeito, sem formação de espaços vazios. A associação de biocerâmicas de hidroxiapatita e fibrina pode desenvolver substitutos ósseos com inúmeras aplicações clínicas (NIHOUANNEN *et al.*, 2006).

Esses compósitos, de um modo geral, têm despertado interesse devido à possibilidade de se combinar as vantagens de diferentes materiais (SIVAKUMAR; RAO, 2002; SENA, 2004). As propriedades físicas deste compósito são reforçadas, com melhor resistência mecânica do que a cerâmica isolada (MARINI *et al.*, 1994; WITTKAMPF, 1989). Além disso, a estabilidade inicial pode ser alcançada através da sua adesão às paredes do defeito ósseo. As propriedades biológicas podem ser também melhoradas, em função do papel positivo desempenhado pela fibrina na vascularização dos defeitos ósseos (NAKAMURA; KOSHINO; SAITO, 1998; NIHOUANNEN *et al.*, 2006).

A regeneração óssea continua a ser um grande desafio para pesquisadores e clínicos que trabalham em diversas áreas cirúrgicas. Embora a transferência cirúrgica de osso ou substitutos do osso seja considerada uma forma eficaz de reparação em grandes defeitos ósseos, pesquisadores buscam desenvolver métodos alternativos de tratamento (FINDIKCIOGLU *et al.*, 2009).

3.OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o potencial osteogênico de biomateriais no reparo de defeito ósseo crítico em calvária de rato.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar, histologicamente, por microscopia óptica, o reparo de defeito ósseo preenchido com biomateriais em microesferas cerâmicas de hidroxiapatita, aglutinados ou não com selante de fibrina;

- Avaliar a efetividade do selante de fibrina como agente aglutinante.

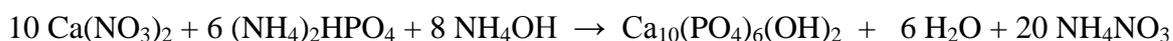
4.METODOLOGIA

4.1 BIOMATERIAIS

4.1.1 Microesferas de Hidroxiapatita

O biomaterial utilizado, microesferas de hidroxiapatita, foi desenvolvido, produzido, caracterizado e cedido pelo Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF).

As amostras de hidroxiapatita estequiométrica foram sintetizadas pelo método de precipitação por via úmida com razão molar dos íons $[Ca]^{+2}/[PO_4]^{-3} = 1,67$, em condições reacionais apropriadas à formação de um material com uma única fase cristalina ilustrada pela reação:



A síntese foi realizada a partir da adição de uma solução contendo íons fosfato a uma solução contendo íons cálcio em condições reacionais propícias a formação do precipitado. A solução de nitrato de cálcio 0,2M foi colocada dentro do balão onde foi realizada a reação de precipitação, sob agitação e temperatura de 90°C, sendo então adicionada a solução de fosfato dibásico de amônio, com auxílio de uma bomba peristáltica. A mistura permaneceu sob agitação, à mesma temperatura, por mais duas horas para a maturação do precipitado formado, sendo em seguida filtrada em funil de Buckner e lavada por ressuspensão com água Milli-Q a 90°C até obter pH=7,0 na água de lavagem. O sólido obtido foi secado em estufa a 80°C por 24 horas.

Utilizando-se uma única seringa foram formadas as microesferas com diâmetro entre 250 e 425µm. Após 24 horas de incubação, em temperatura ambiente, estas foram recolhidas com uma peneira apropriada e, então, sinterizadas em rampa de aquecimento até 1100°C (FIGURA 4).

A caracterização do biomaterial foi realizada por meio da difração de raios X (GRÁFICO 1) e espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (GRÁFICO 2) onde pode-se identificar a inexistência de impurezas porém uma alta cristalinidade. Pela microscopia eletrônica de varredura (FIGURA 1, 2 e 3) observou-se a sua porosidade interna e superficial.

GRÁFICO 1 – Análise por Difração de Raios X da hidroxiapatita estequiométrica. O difratograma mostrado abaixo mostra os principais picos de uma hidroxiapatita (HA) $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ padrão, de acordo com a ficha padrão PCPDFWIN 09.0432. É possível observar pelo eixo y que a amostra tem picos finos e de alta intensidade, característico de amostra com alta cristalinidade.

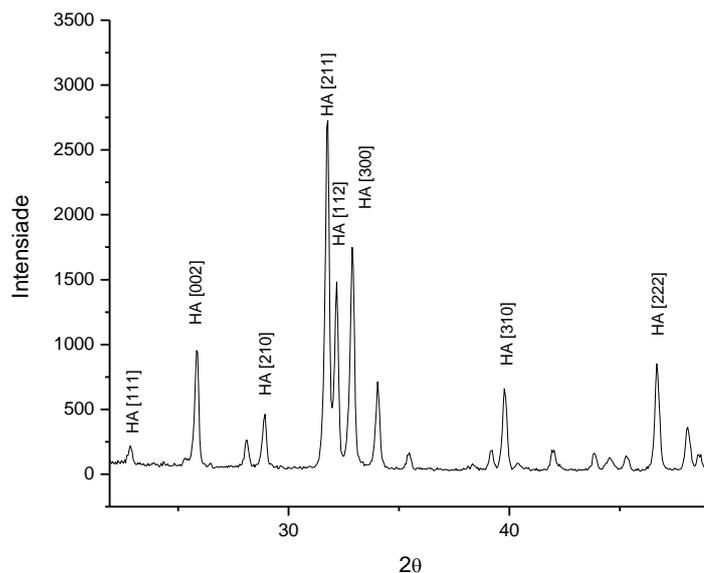


GRÁFICO 2 – Gráfico de análise por espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). O gráfico abaixo indica os grupos funcionais de uma hidroxiapatita (HA) $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ padrão, com as bandas de vibração apontadas. A largura das bandas indica que a HA após a sinterização tornou-se cristalina, porém não perdeu nenhuma de suas características elementares. É constituída pelas bandas de OH^- em 3574 cm^{-1} e 630 cm^{-1} e as bandas de fosfatos nas regiões de 1000 cm^{-1} a 1100 cm^{-1} e 500 cm^{-1} a 600 cm^{-1} , respectivamente.

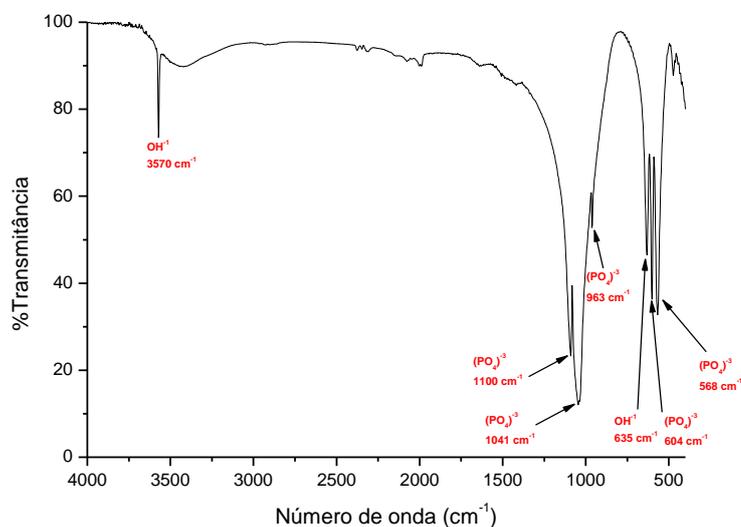




FIGURA 1 - Microscopia Eletrônica de Varredura da microesfera de hidroxiapatita.

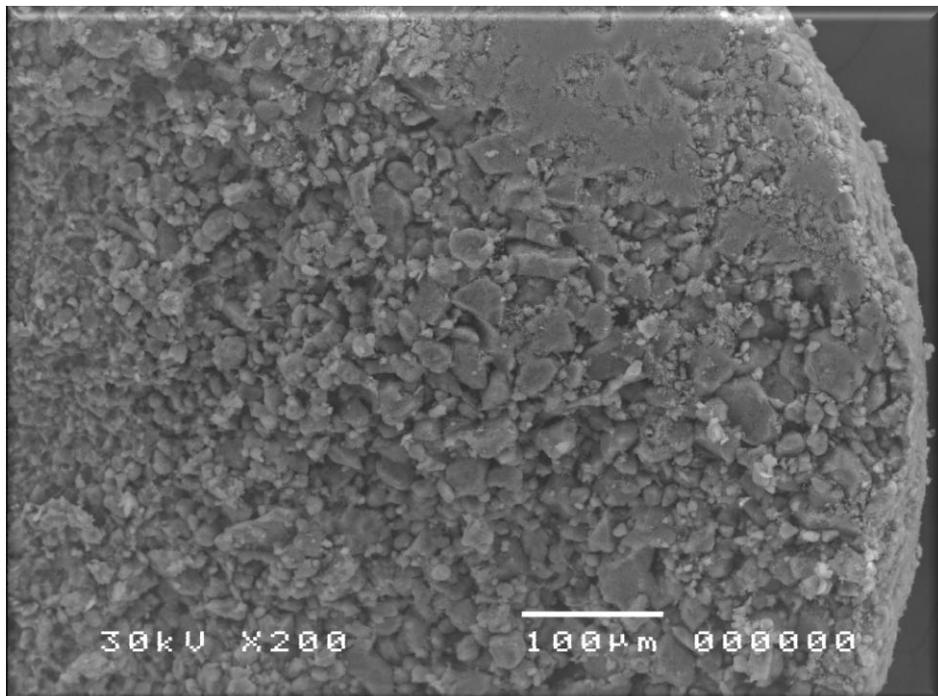


FIGURA 2 - Microscopia Eletrônica de Varredura de corte transversal (*cross section*) da microesfera de hidroxiapatita.

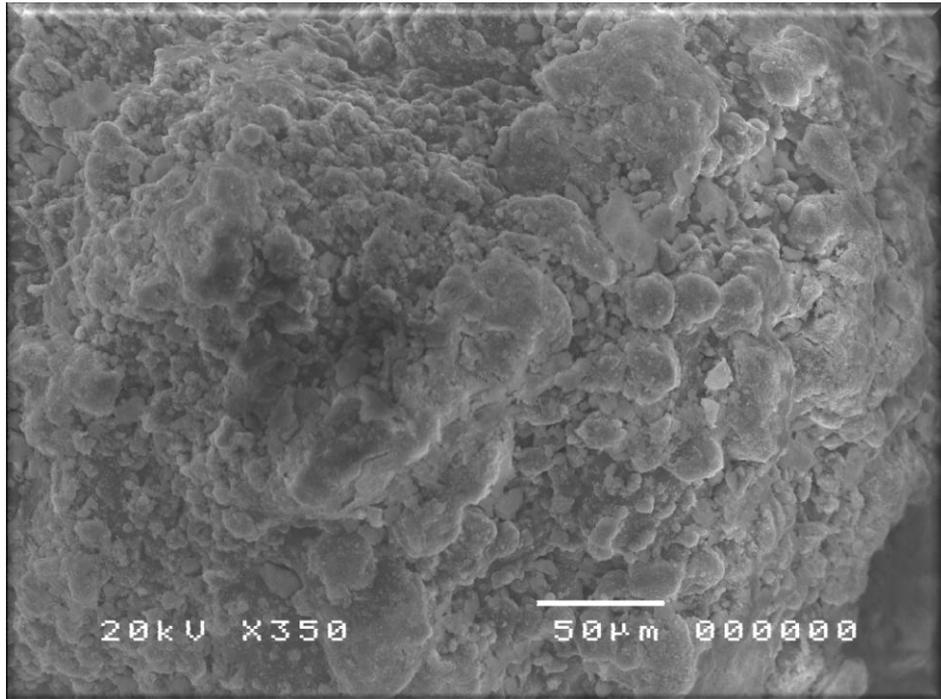


FIGURA 3 - Microscopia Eletrônica de Varredura do interior da microesfera de hidroxiapatita.



FIGURA 4 – Biomaterial utilizado – microesferas de hidroxiapatita com diâmetro entre 250 e 425µm.

As microesferas foram acondicionadas em frações iguais em tubos de plástico, tipo *ependorfs*, que foram esterilizados em autoclaves a 120°C por 30 minutos e utilizados individualmente evitando-se, desta forma, re-esterilização.

4.1.2 Selante de Fibrina

O selante de fibrina utilizado, Tissucol®, foi adquirido comercialmente (FIGURA 5).



FIGURA 5 - O selante de fibrina utilizado, Tissucol® (Baxter - Viena, Austria).

O selante de fibrina foi preparado, com mistura de seus componentes (TABELA 1), e mantido em temperatura de 37°C, em banho-maria, evitando-se a coagulação precoce. Optou-se pela utilização da trombina 4 em função da sua mais lenta solidificação permitindo maior tempo de manipulação até a coagulação do biomaterial.

TABELA 1 – Componentes do selante de fibrina.

COMPONENTES	SOLUÇÃO
Fibrinogênio Plasmático	SOLUÇÃO I
Aprotinina	
Trombina 4 ou Trombina 500	SOLUÇÃO II
Cloreto de Cálcio	

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) (Protocolo nº003-09 CEUA UEFS - Ofício Anexo A) e cumpriu as Normas de Ética em Pesquisa com Animais, assim como, os princípios de biossegurança.

A amostra inicial foi de 60 ratos da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar albinus*, machos, adultos, pesando, aproximadamente, 350 a 400g, correspondentes aos três à quatro meses de idade. Entretanto, durante o experimento dois animais foram a óbito (Grupo III aos 120 dias e GIV aos 120 dias) perfazendo uma amostra final de 58 animais. Os animais foram fornecidos, criados, operados e mantidos em observação no pós-operatório no Biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana.

Os 58 animais foram distribuídos para a composição de quatro grupos, contendo 19 a 20 animais cada, e avaliados nos pontos biológicos de 15, 45 e 120 dias (TABELA 2):

Grupo I - Defeito ósseo preenchido pelo coágulo sangüíneo.

Grupo II - Defeito ósseo preenchido por microesferas de hidroxiapatita.

Grupo III - Defeito ósseo preenchido por selante de fibrina.

Grupo IV – Defeito ósseo preenchido com microesferas de hidroxiapatita e fibrina.

Os animais foram mantidos durante todo o período experimental em gaiolas identificadas e autoclavadas, forradas com cama de *maravalha de pinus* trocada diariamente, alimentados com ração sólida Labina (**Purina**, Paulínia, SP, Brasil) e água *ad libitum*.

TABELA 2 – Número de animais segundo grupo e ponto biológico.

Grupo/Período	GI	GII	GIII	GIV	Total
15 dias	5	5	5	5	20
45 dias	5	5	5	5	20
120 dias	5	5	4	4	18
Total	15	15	14	14	58

4.3 TÉCNICA CIRÚRGICA

Os animais foram anestesiados com injeções intramusculares de cloridrato de quetamina a 10% (Cetamin - Laboratório Syntec, São Paulo, Brasil) na proporção de 0,12mL/100g de peso, enquanto a analgesia e a sedação foram realizadas com injeções, também, intramuscular

de cloridrato de xilazina a 2% (Dopaser - Laboratório Hertape Calier, Barcelona, Espanha), na proporção de 0,06mL/100g de massa corpórea (FIGURA 6).

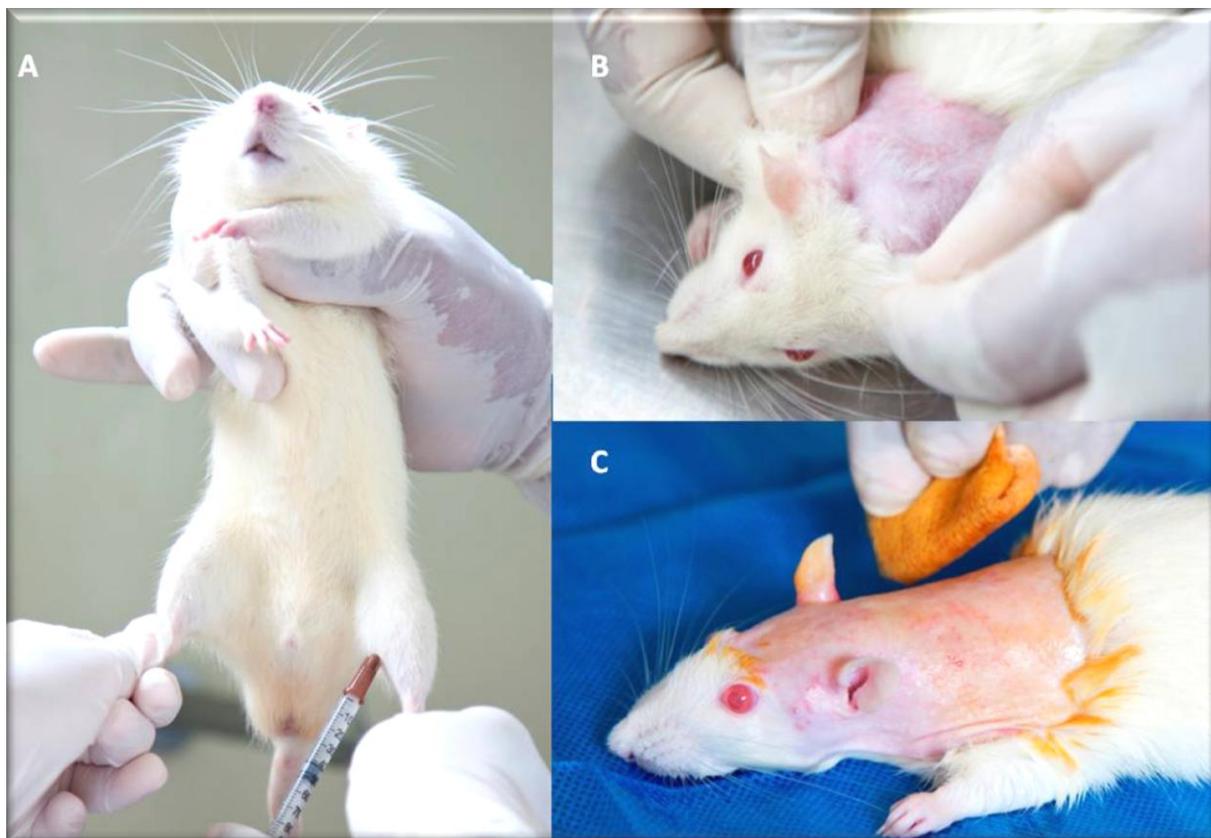


FIGURA 6 - Anestesia com cloridrato de quetamina a 10% e analgesia e sedação com cloridrato de xilazina com injeção intramuscular (A); tricotomia da área cirúrgica (B); anti-sepsia com solução de álcool iodado (C).

Os animais foram tricotomizados na região da calvária, após uma anti-sepsia com solução de álcool iodado, sendo, então, posicionados em decúbito ventral. Após a anestesia e assepsia foi realizada a tricotomia da região frontoparietal e uma incisão mucoperiosteal e bicoronal com lâmina de bisturi nº15 (Bencton Dickinson) com aproximadamente 3,0cm de extensão, seguida de divulsão, com tesoura (Duflex) de ponta reta e romba. Os retalhos de espessura total foram elevados expondo amplamente a cortical óssea da região.

A elevação do retalho permitiu acesso ao periósteo que foi incisado com espátula nº7 (Duflex) e pinça clínica (Duflex) e removido, expondo o tecido ósseo. O defeito crítico transfixado foi realizado com uma fresa trefina de 8,5mm de diâmetro (Dentoflex - São Paulo, Brasil) montada em contra-ângulo (Dabi Atlante - São Paulo, Brasil) com redução de 1:16, acoplado a um motor cirúrgico, (Driller BLM 600 Plus - São Paulo, Brasil) de 1500 rpm, sob irrigação constante e abundante com solução salina (FIGURA 7). A dura-mater foi mantida

íntegra. O defeito ósseo de aproximadamente de 1mm de espessura foi realizado entre os vértices das suturas anterior e posterior da calvária (FIGURA 8).

Para o grupo controle, após confecção do defeito ósseo, foi realizada estimulação do tecido mole e bordas ósseas do defeito para promover sangramento controlado e preenchimento do defeito ósseo com coágulo sanguíneo. Nos demais grupos foram implantados na área de defeito os respectivos biomateriais (FIGURA 9). As microesferas de hidroxiapatita, quando utilizadas isoladamente (Grupo II), foram misturadas com soro fisiológico para facilitar sua implantação no defeito.

Os retalhos, a seguir, foram reposicionados e suturados com fio de seda preto n° 3-0 (Ethicon – Johnson & Johnson) (FIGURA 10).

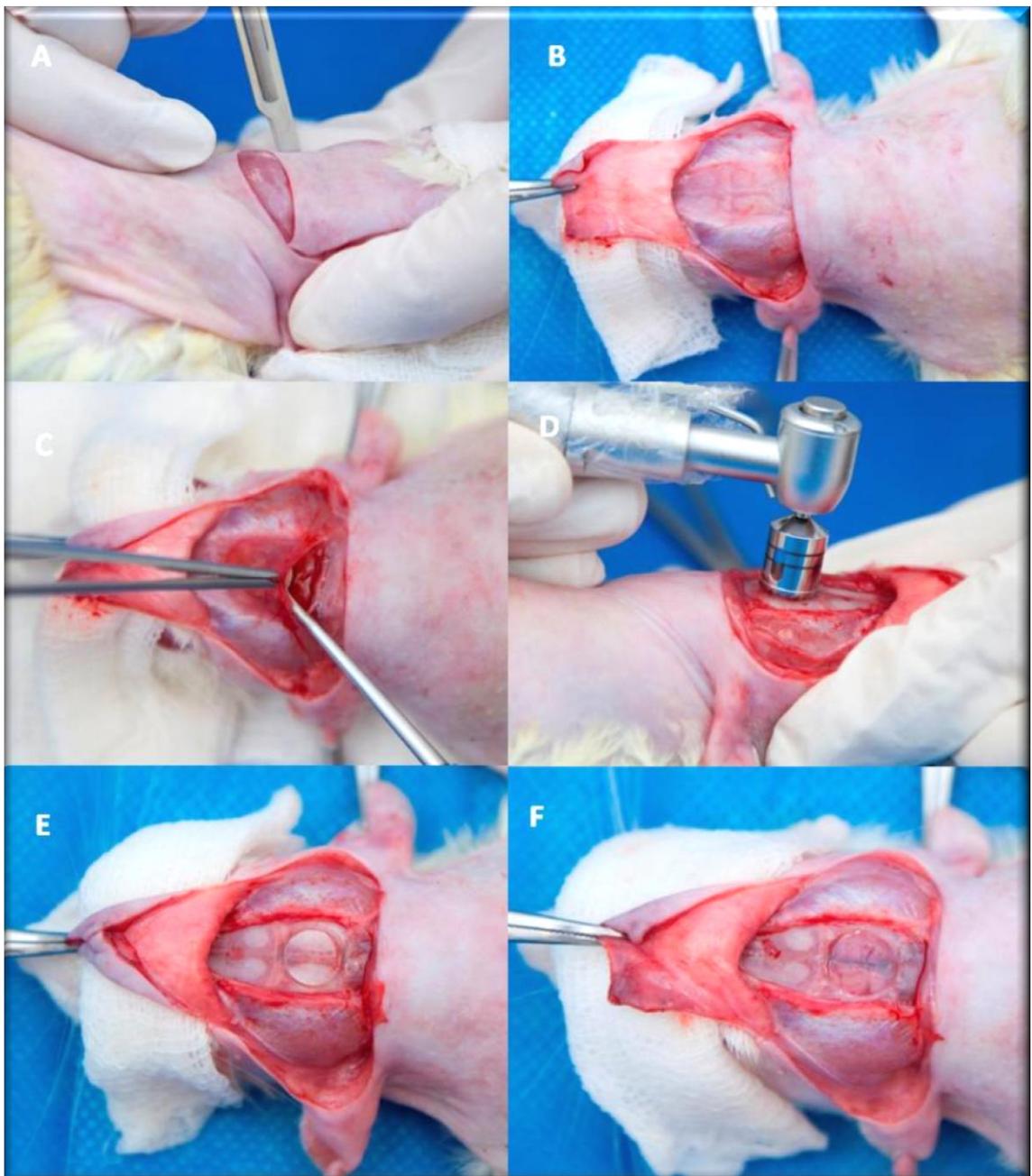


FIGURA 7 - Tricotomia da região frontoparietal da cabeça do animal (A); elevação do retalho para acesso ao periósteo (B); remoção do periósteo (C); confecção do defeito crítico com fresa trefina (D); demarcação do defeito entre os vértices das suturas anterior e posterior da calvária (E); defeito crítico com 8,5mm de diâmetro (F).

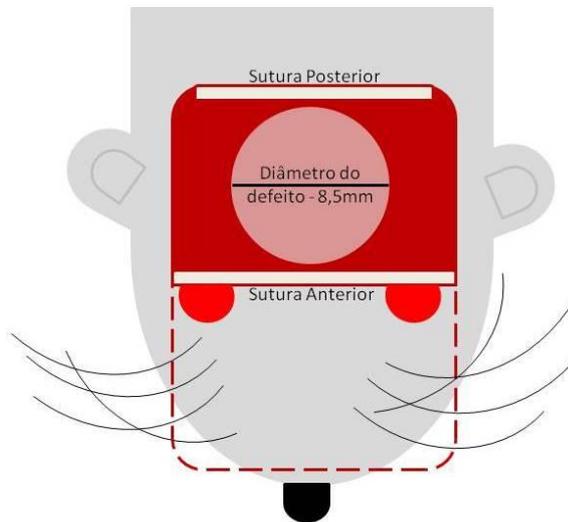


FIGURA 8 – Desenho esquemático que mostra a localização do defeito crítico confeccionado entre as suturas anterior e posterior da calvária.

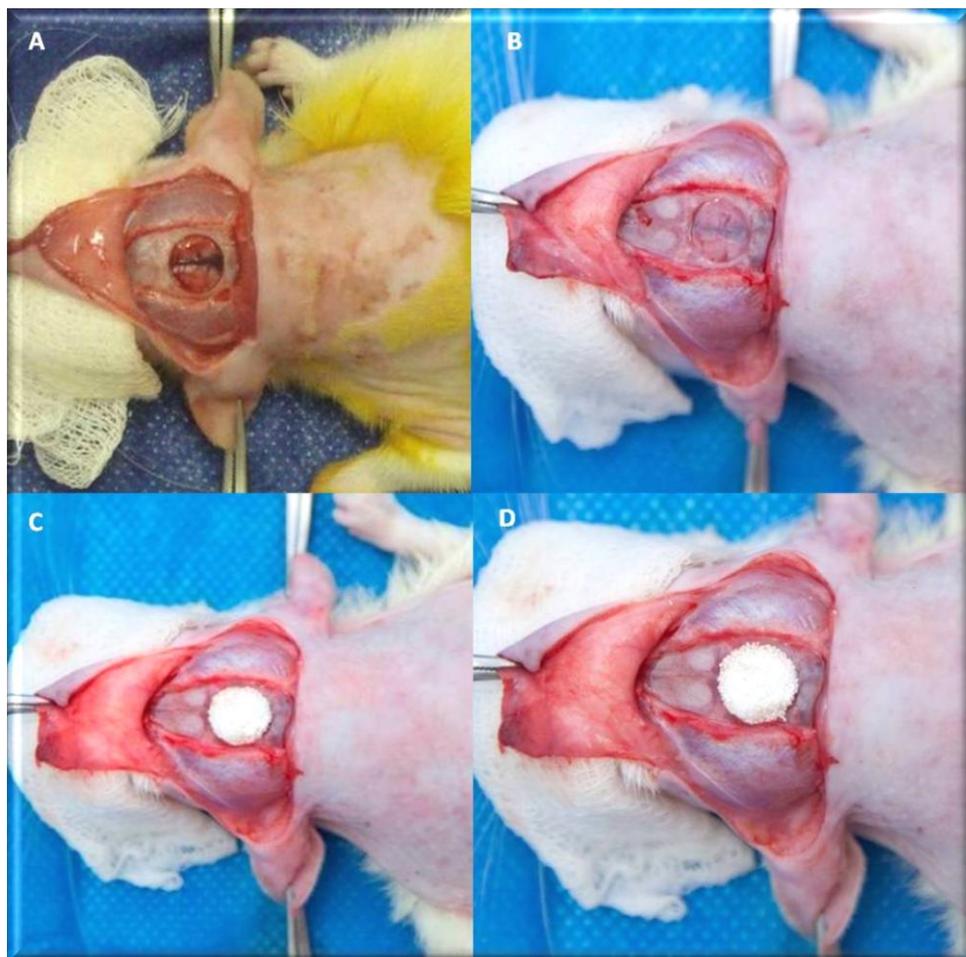


FIGURA 9 – Defeito crítico preenchido com coágulo sanguíneo – Grupo I (A); defeito preenchido por microesferas de hidroxiapatita – Grupo II (B); defeito ósseo preenchido por selante de fibrina – Grupo III (C); defeito preenchido com microesferas de hidroxiapatita e selante de fibrina – Grupo IV (D).



FIGURA 10 – Reposicionamento do retalho e sutura

4.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Nos tempos biológicos pré-determinados (15, 45 e 120 dias), os animais foram eutanasiados com doses letais de cloridrato de quetamina. Os ratos foram dissecados para remover toda a porção superior da calvária, incluindo tecidos moles, porém foi mantida a dura-máter e o perióstio e a amostra retirada (calvária). Os espécimes foram colocados separadamente em recipientes plásticos, identificados, contendo solução de formol tamponado a 4% para fixação e destinadas à análise por microscopia óptica. Os espécimes foram então divididos em duas partes em uma proporção de 2/3 anteriores e 1/3 posterior das calvárias de todos os ratos em todos os pontos biológicos (FIGURA 11). O segmento anterior foi então descalcificado e incluído em parafina. Os cortes foram analisados por microscopia óptica.

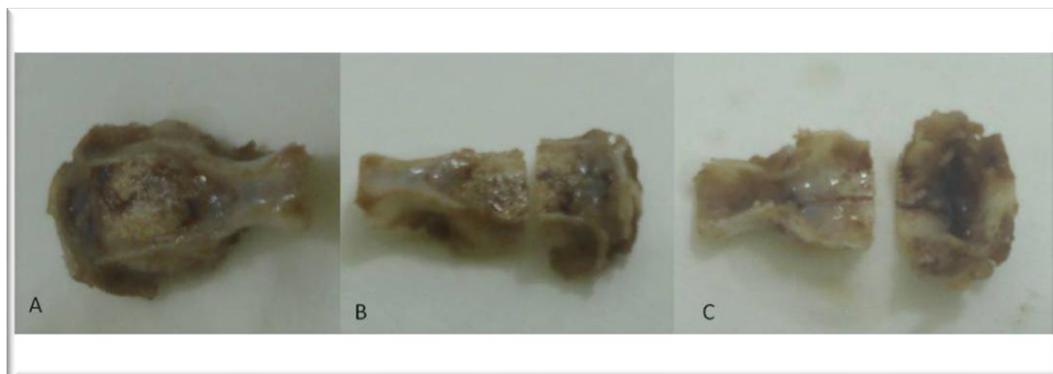


FIGURA 11 - Redução das espécimes (A) calvária antes da redução; (B e C) após redução sendo a parte anterior (2/3 do defeito) incluído em parafina.

4.5 ETAPA LABORATORIAL

4.5.1 Inclusão em parafina

Após fixação em formol e realização da redução das espécimes, os fragmentos que incluíam o segmento anterior da calvária, estendendo-se 2mm além do defeito, foram descalcificados com EDTA a 7% por 5 dias. Em um processador automático de tecido (LEICA - Nussloch, Alemanha) os fragmentos tissulares das calvárias foram processados utilizando-se seqüenciamento de álcool absoluto, xilol e parafina fundida e em seguida incluídos em blocos de parafina (FIGURA 12).



FIGURA 12 – Processador automático de tecidos (LEICA - Nussloch, Alemanha).

Foram realizados cortes histológicos seriados de 5 μ m de espessura sobre lâminas previamente tratadas para remoção de impurezas e aderência. A preparação prévia das lâminas foi realizada com lavagem das lâminas com detergente neutro, soluções de solução diluída de ácido clorídrico e ácido acético e álcool absoluto (TABELA 3). Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e Picrossírius (PIFG).

4.5.2 Microscopia Óptica

A avaliação morfológica qualitativa foi realizada no Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (ICS – UFBA) e no IPAC – Instituto de Patologia Geral e Cutânea

TABELA 3 – Sequência de lavagem de lâminas.

Sequência	Componentes
1º	Detergente Neutro
2º	Acido Clorídrico Diluído
3º	Ácido Acético e Álcool Etílico

5.RESULTADOS

5.1 GRUPO I – DEFEITO VAZIO (CONTROLE)

Aos 15 dias foi observada uma neoformação óssea reparativa restrita às bordas do defeito, com a presença de osteoblastos ativos (FIGURA 13). Aos 45 dias, esta neoformação permaneceu restrita às bordas do defeito, porém em maior extensão e com presença de, além de osteoblastos, osteócitos (FIGURA 15). Uma progressiva redução da atividade dos osteoblastos foi vista. Aos 120 dias havia um osso neoformado aparentemente estável, com presença de osteócitos, sem características de proliferação e atividade osteoblástica. Nas demais regiões não foram observadas a presença de núcleos de mineralização (FIGURA 16).

Na região central do defeito, aos 15 dias, observou-se a formação de tecido conjuntivo frouxo com intensa formação de capilares sanguíneos e com proliferação de células fusiformes (FIGURA 14). Aos 45 dias, essa região central do defeito apresentava-se preenchida por tecido conjuntivo denso, de espessura menor que a espessura das margens ósseas e com uma menor formação vascular, predominando nas proximidades das bordas ósseas (FIGURA 15). Aos 120 dias, as características se tornavam mais evidentes com formação de um tecido conjuntivo denso e com menor neovascularização. O tecido conjuntivo formado preencheu toda a extensão do defeito mantendo uma espessura bem aquém da espessura do osso remanescente (FIGURA 17).

Aos 15, 45 e 120 dias foi observada a presença de um infiltrado inflamatório mononuclear e difuso, porém com redução progressiva ao longo do tempo.

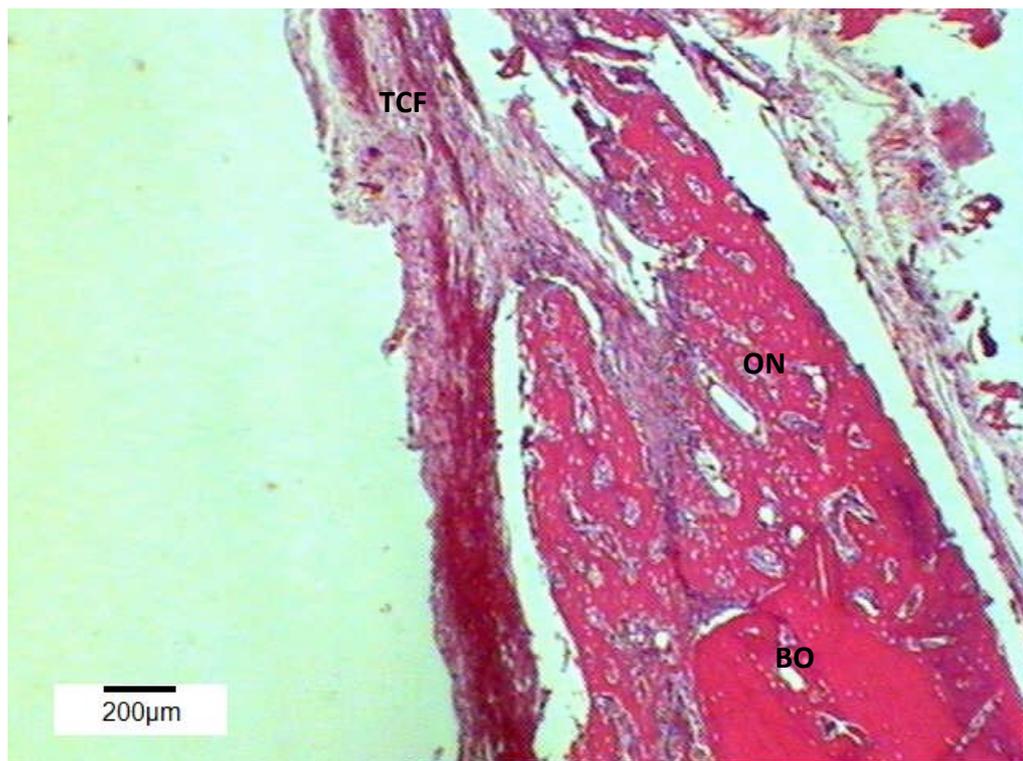


FIGURA 13 - Grupo I (HE /1X / 15 dias) - Neoformação óssea nas bordas do defeito. [ON – Osso Neoformado; BO – Borda óssea; TC – Tecido Conjuntivo Frouxo].

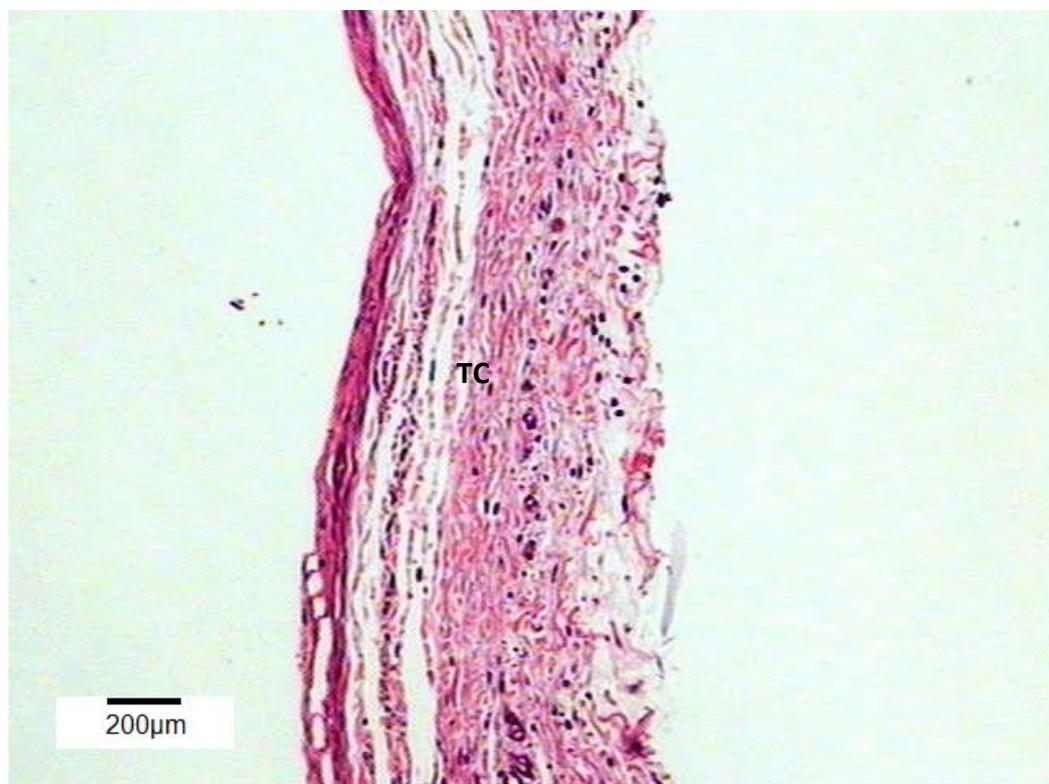


FIGURA 14 - Grupo I (HE /1X / 15 dias) - Ausência de núcleos de mineralização na área central do defeito. Presença de tecido conjuntivo de espessura menor que a espessura óssea na borda óssea. [TC – Tecido Conjuntivo].



FIGURA 15 - Grupo I (HE / 1X / 45 dias) - Neoformação óssea restrita as bordas do defeito. Presença de osteócitos no osso recém formado. Presença de tecido conjuntivo denso em toda extensão do defeito de espessura menor que a espessura óssea na borda do defeito. [TCD – Tecido Conjuntivo Denso; BO – Borda Óssea; ON – Osso Neoformado].

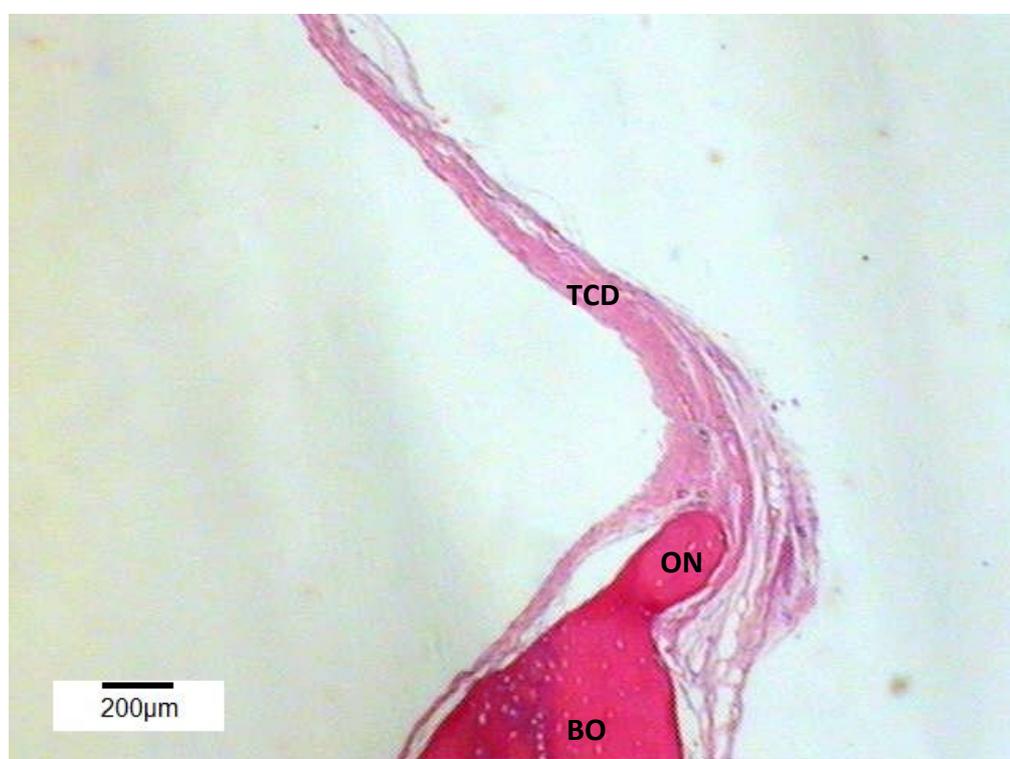


FIGURA 16 - Grupo I (HE / 1X / 120 dias) - Neoformação restrita as bordas do defeito. Presença de osteócitos no osso recém formado aparentemente estável. [TCD – Tecido Conjuntivo Denso; BO – Borda Óssea; ON – Osso Neoformado].



FIGURA 17 - Grupo I (HE / 1X / 120 dias) - Presença de tecido conjuntivo denso em toda extensão do defeito de espessura menor que a espessura óssea na borda do defeito. [TCD – Tecido Conjuntivo Denso].

5.2 GRUPO II – DEFEITO ÓSSEO PREENCHIDO POR MICROESFERAS DE HIDROXIAPATITA

Aos 15 dias, nas bordas do defeito, observaram-se aspectos semelhantes aos identificados no grupo controle, com relação à neoformação óssea reparativa que se manteve restrita às bordas e com a presença de osteoblastos ativos (FIGURA 18 E 21). Aos 45 dias, a formação óssea também restringiu-se às margens do defeito porém mais evidente que aos 15 dias. Aos 120 dias as bordas ósseas apresentavam-se estáveis não se observando mais formação óssea. O osso neoformado apresentava nesse período aspecto lamelar. Aos 45 e 120 dias foi observada a presença de osteócitos no osso recém formado.

O defeito apresentava-se preenchido pelas microesferas de hidroxiapatita, aos 15 dias, formando múltiplas camadas (FIGURAS 18 E 19). Em todos os tempos biológicos, todo o defeito se encontrava preenchido com as microesferas de hidroxiapatita e a neoformação óssea reparativa, nas margens vistas do defeito, se estendeu entre as microesferas, com a presença de osteoblastos (FIGURAS 18, 25 E 30).

Nas outras áreas do defeito, aos 15 dias, foi observada a presença de biomateriais permeados por tecido conjuntivo frouxo, com fibras colágenas apresentando orientações

diversas (FIGURA 18). Algumas áreas do defeito apresentavam-se edemaciadas resultando na formação de um estroma de aspecto frouxo (FIGURA 19). Observou-se uma intensa formação vascular e proliferação de células fusiformes (FIGURAS 21, 22 e 24). Aos 45 dias, o estroma encontra-se mais adensado com moderada presença de células fusiformes (FIGURAS 23 E 26). Aos 120 dias, observou-se uma redução do edema resultando na formação de um estroma mais denso e celuloso, com muitos espaços capilares luminares sem, no entanto, haver formação de novos vasos. Uma redução do espaço entre as microesferas foi identificada e atribuída à diminuição do edema (FIGURA 31).

A presença de infiltrado inflamatório mononuclear distribuído de forma difusa no interstício foi identificada aos 15 dias. Uma reação granulomatosa, constituída por macrófagos e poucas células gigantes multinucleadas, foi vista circundando as microesferas (FIGURA 24). Essa reação granulomatosa é acompanhada por uma delgada fibrose. Aos 45 dias o processo inflamatório permanece acentuado, com grande formação de capilares em toda a extensão do defeito e denso infiltrado mononuclear (FIGURAS 27 E 29). Aos 120 dias observa-se uma diminuição no processo inflamatório com reação granulomatosa menos evidente (FIGURA 32).

Na maioria das vezes, aos 15 dias, não foi observada a migração celular para o interior do biomaterial, havendo a formação de delgadas camadas concêntricas em torno das microesferas. Cada microesfera apresentava-se como um componente particulado não homogêneo, pouco coeso, algumas vezes com aspecto basofílico, entretanto mantendo o formato de microesferas. Aos 45 dias tornou-se mais evidente a presença de fibras colágenas concêntricas, formando uma cápsula em torno do biomaterial, em maior número de camadas e com espessura maior do que a observada aos 15 dias (FIGURA 28). Na periferia de muitos biomateriais observou-se delgados septos fibrosos com direção centrípeta com presença de células fusiformes de permeio às partículas fragmentadas. Aos 120 dias a formação capsular, com fibrose concêntrica em torno das microesferas, torna-se mais espessa com presença de muitas células fusiformes. A ausência de coesão entre as partículas de cada microesfera é ainda mais evidente aos 120 dias (FIGURAS 32 E 33).

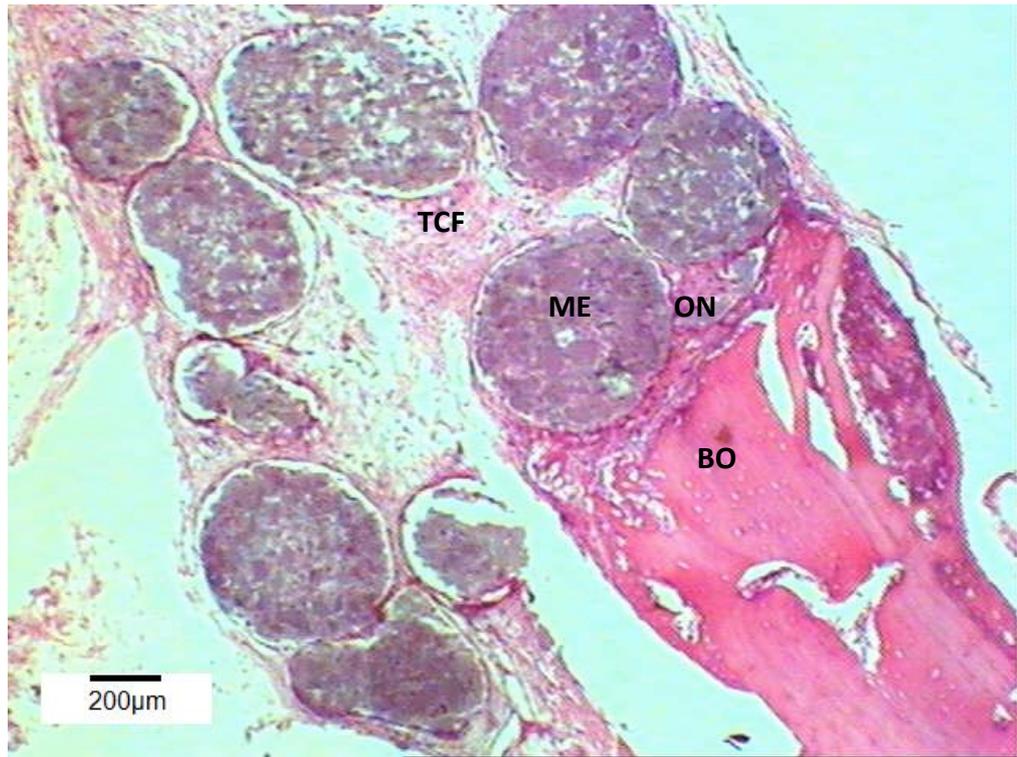


FIGURA 18 - Grupo II (HE / 10X / 15 dias) – Neoformação óssea nas bordas do defeito e estendendo-se entre as microesferas próximas a borda do defeito. [BO – Borda Óssea; TCF – Tecido Conjuntivo Frouxo; ME – Microesferas; ON – Osso Neoformado].

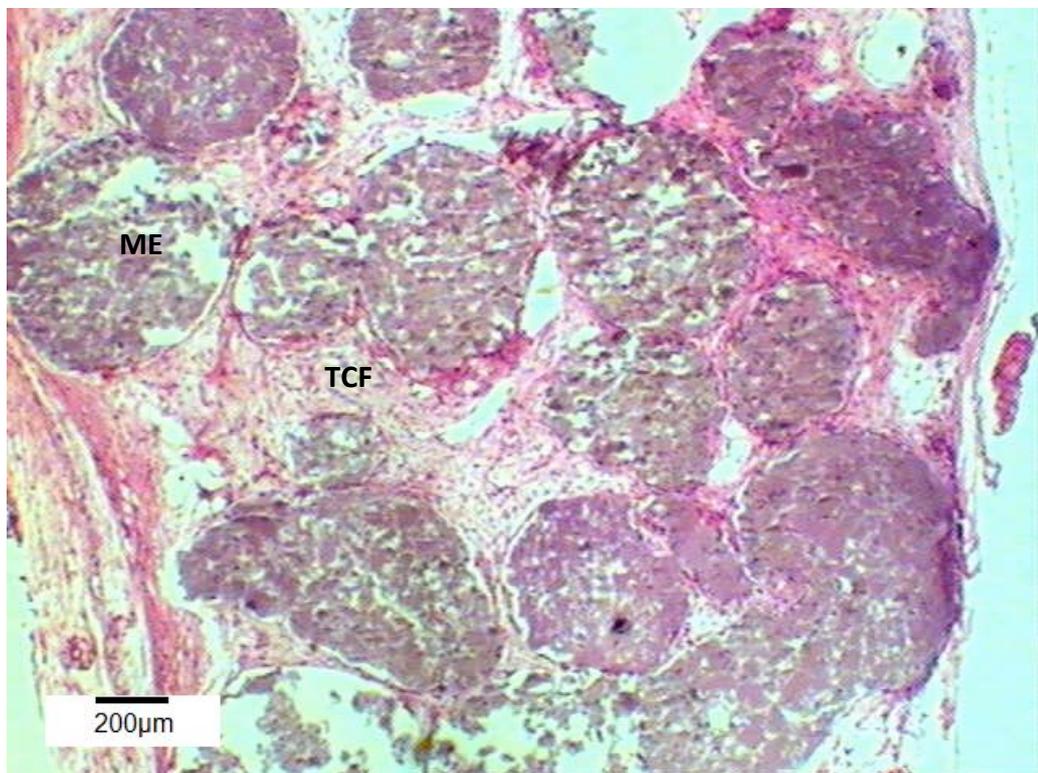


FIGURA 19 - Grupo II (HE / 10X / 15 dias) - Microesferas formando múltiplas camadas. [TCF – Tecido Conjuntivo Frouxo; ME – Microesferas].

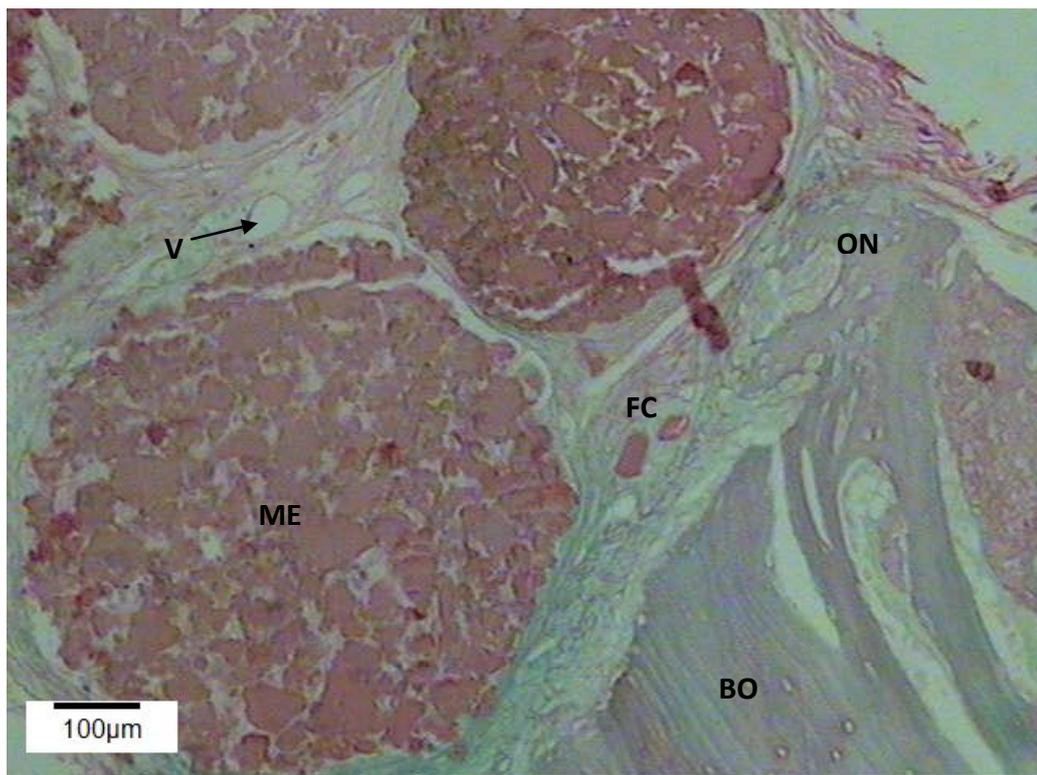


FIGURA 20 – Grupo II (PIFG/ 10X/ 15 dias) – Camadas de microesferas permeadas por fibras colágenas em múltiplas direções. [V – Vasos; FC – Fibras colágenas; ME – Microesfera; ON – Osso Neoformado; BO – Borda Óssea].

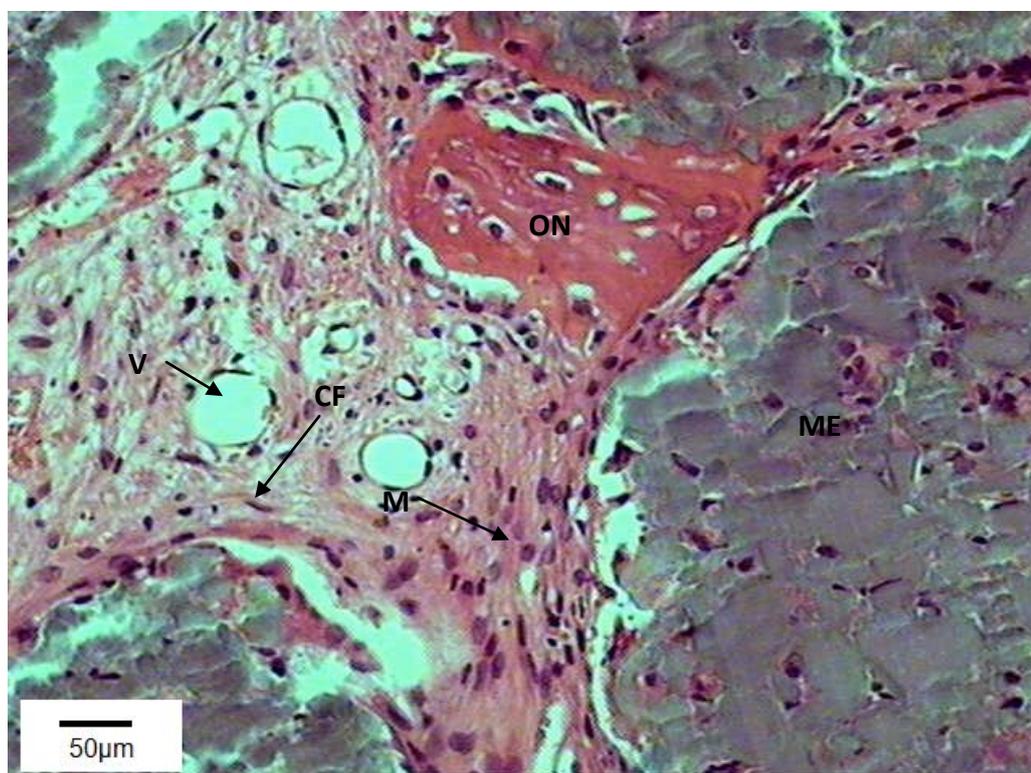


FIGURA 21 – Grupo II (HE / 20X / 15 dias) – Microesferas próximas as bordas do defeito, por onde se estende a neoformação óssea. [V – Vasos; ON – Osso Neoformado; ME – Microesfera; M – Macrófagos; CF – Células Fusiformes].

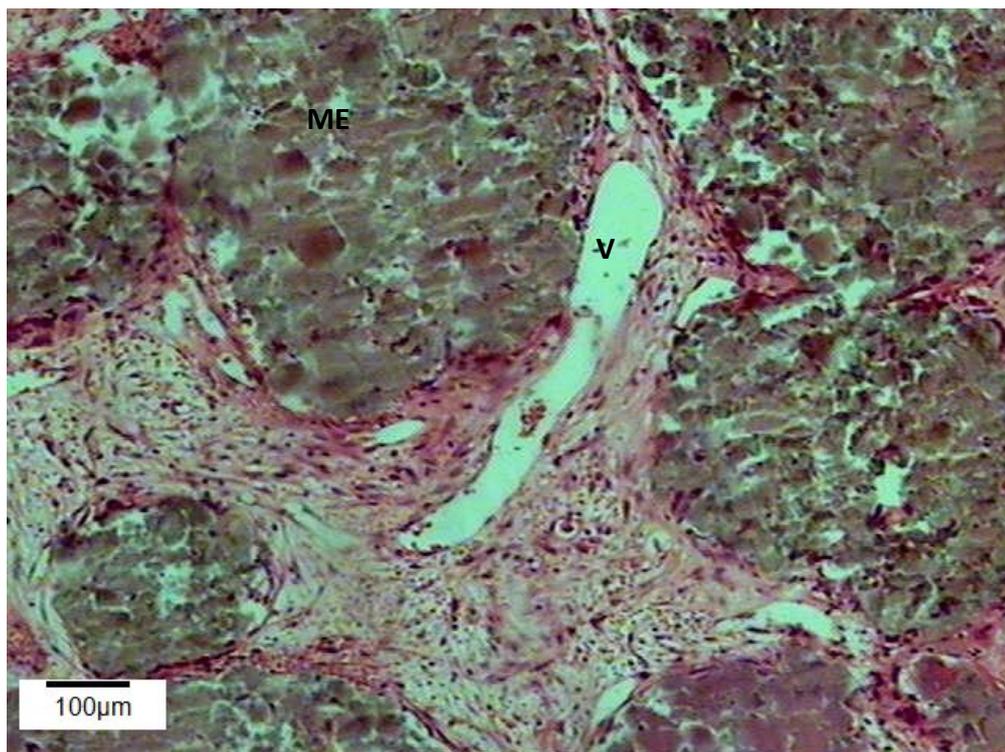


FIGURA 22 – Grupo II (HE/ 10X/ 15 dias) – Estroma frouxo com intensa vascularização. [V – Vasos; ME – Microesfera].

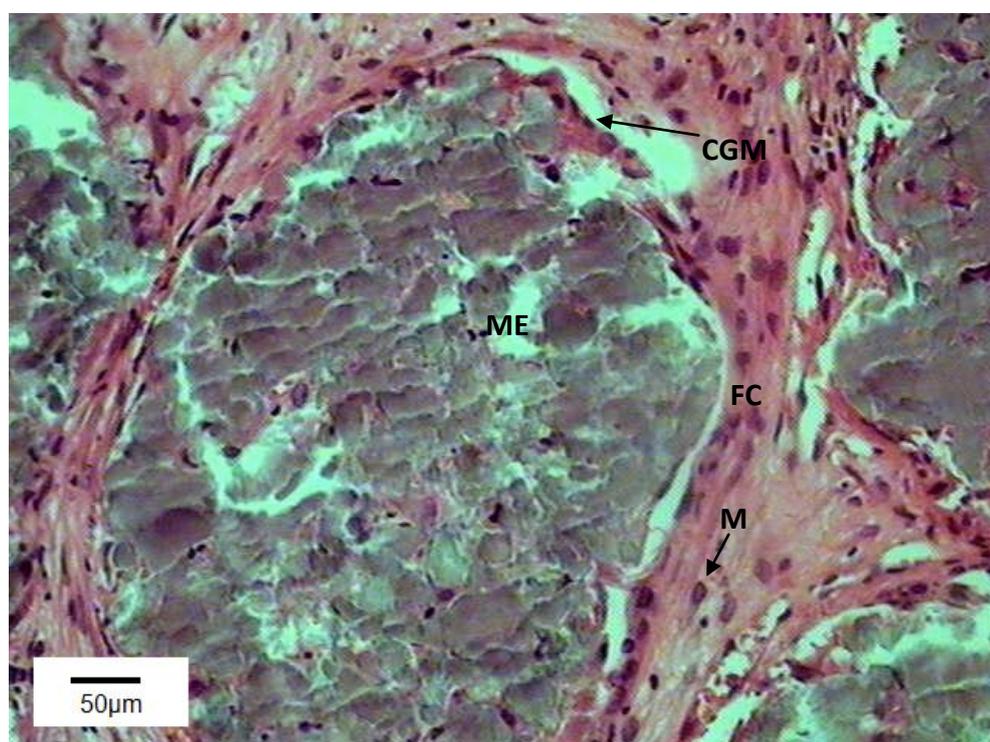


FIGURA 23 – Grupo II (HE/ 20X/ 15 dias) – Fibras colágenas concêntricas circunscrevendo as microesferas. Presença de células gigantes multinucleadas . [ME – Microesferas; CGM – Células Gigantes Multinucleadas; FC–Fibras Colágenas; M - Macrófagos].

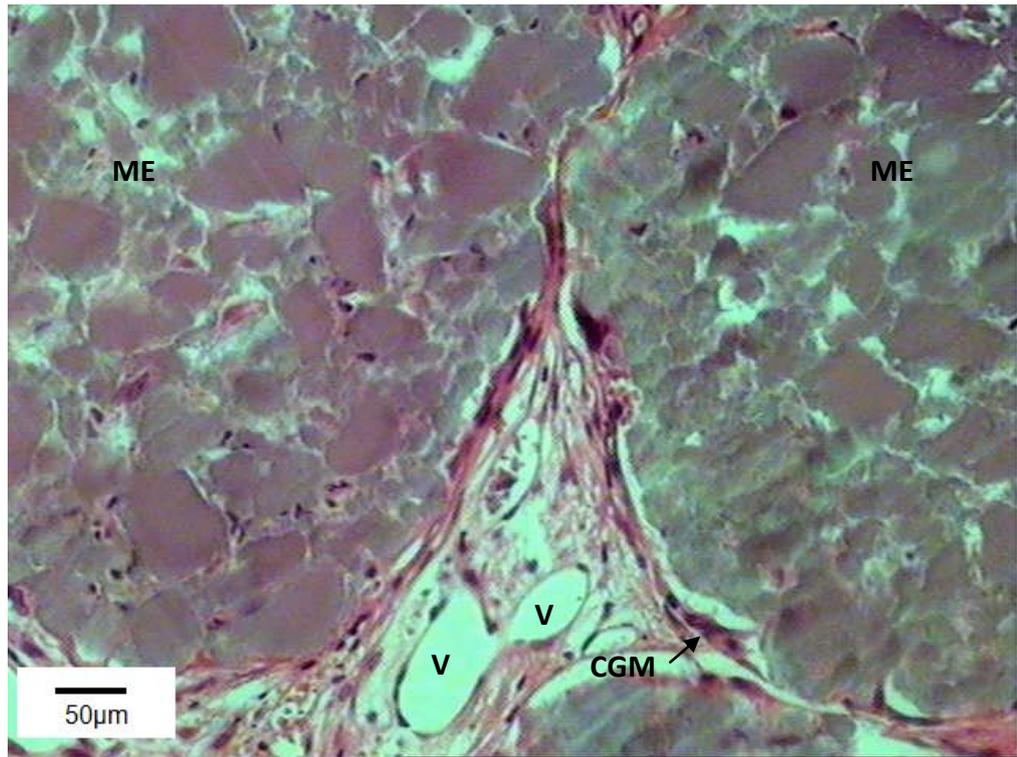


FIGURA 24 – Grupo II (HE/ 20X/ 15 dias) – Formação de espaços triangulares entre as microsferas com formação vascular . [ME – Microesfera; V – Vasos; CGM – Células Gigantes Multinucleadas].

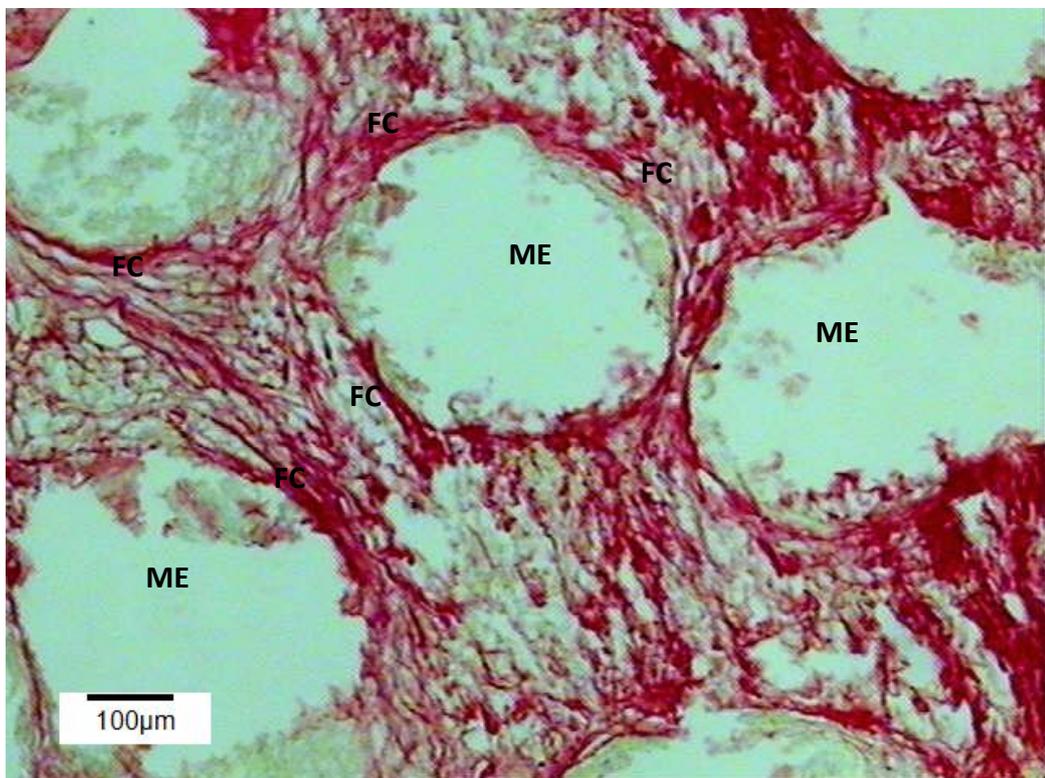


FIGURA 25 – Grupo II (PIFG/ 10X/ 45 dias) – Fibras colágenas mantendo a forma de microsferas mesmo com a sua fragmentação. [ME – Microesfera; FC – Fibras Colágenas].

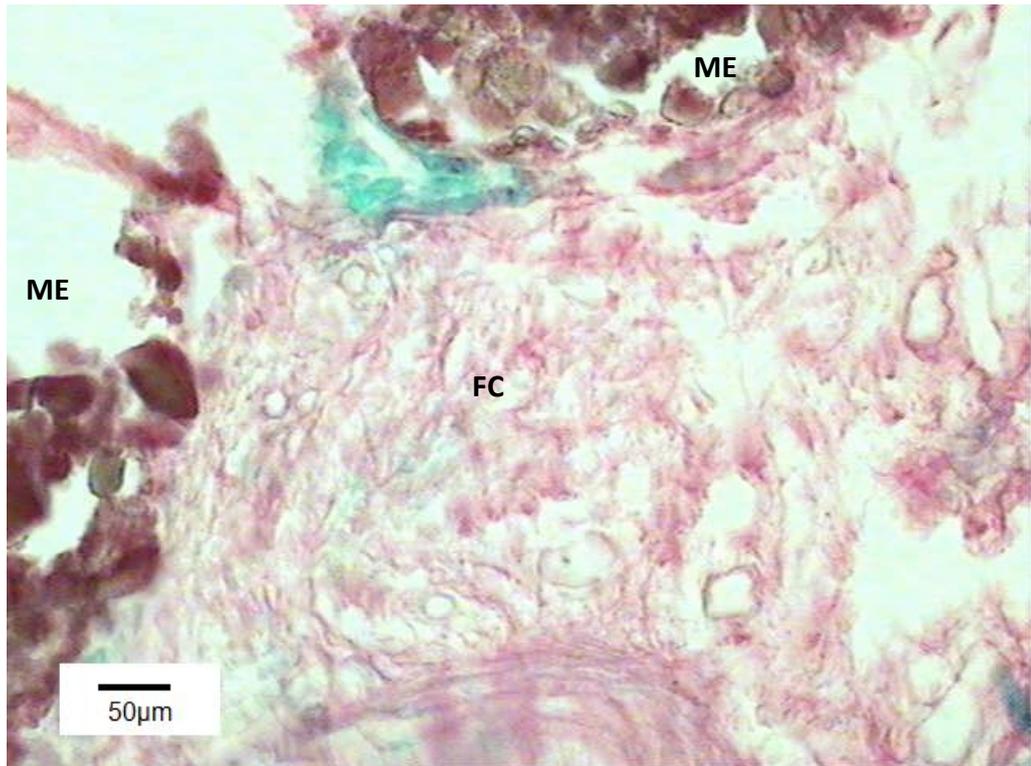


FIGURA 26 - Grupo II (PIFG / 20X / 45 dias) – Adensamento de fibras colágenas no interstício. [FC – Fibras Colágenas; ME - Microesferas].

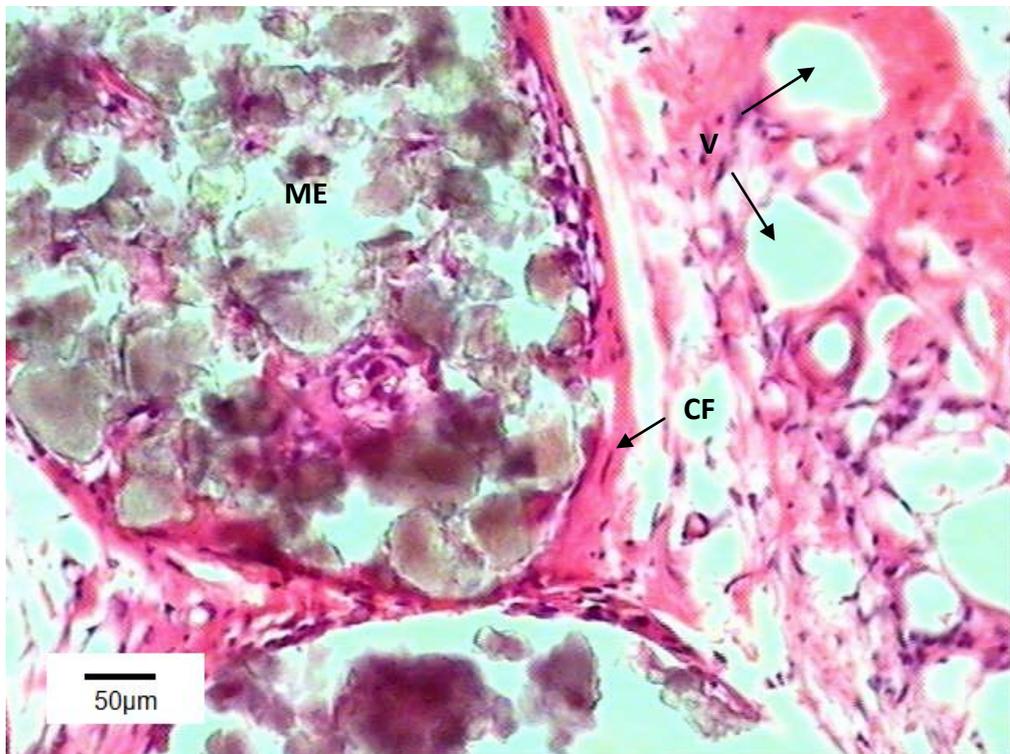


FIGURA 27 - Grupo II (HE /20X /45 dias) - Presença de células fusiformes de permeio ao biomaterial fragmentado. [ME – Microesferas; CF – Células Fusiformes; V - Vasos].

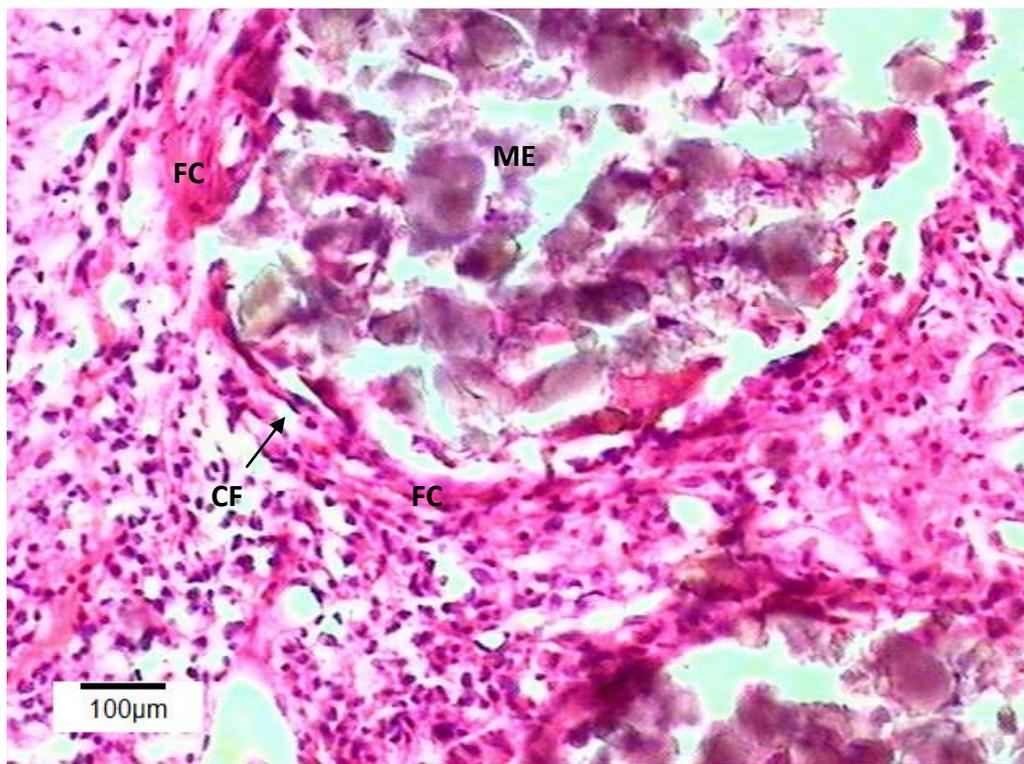


FIGURA 28- Grupo II (HE / 10X / 45 dias) - Presença de fibras colágenas concêntricas em múltiplas camadas formando uma cápsula em torno da microesfera. Presença intensa de células inflamatórias. [ME – Microesferas; CF – Células Fusiformes; FC – Fibras Colágenas].

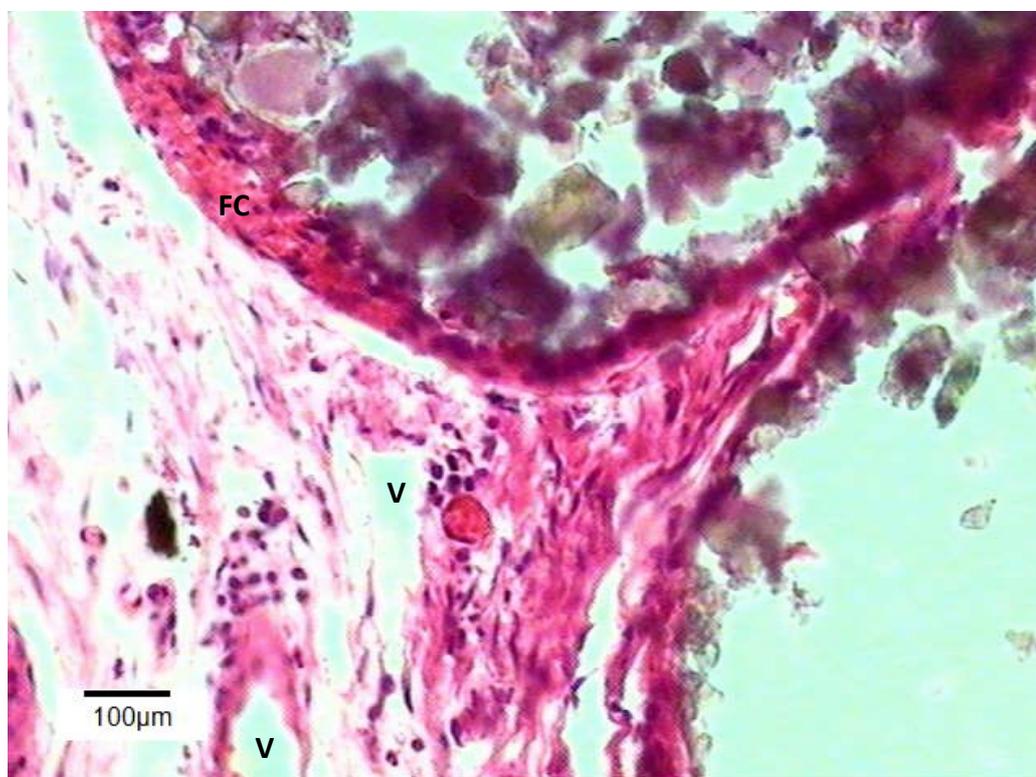


FIGURA 29 - Grupo II (HE / 10X / 45 dias) - Redução na proliferação de células fusiformes, porém, observou-se a preservação dos espaços capilares. [V – Vasos; FC- Fibras Colágenas].

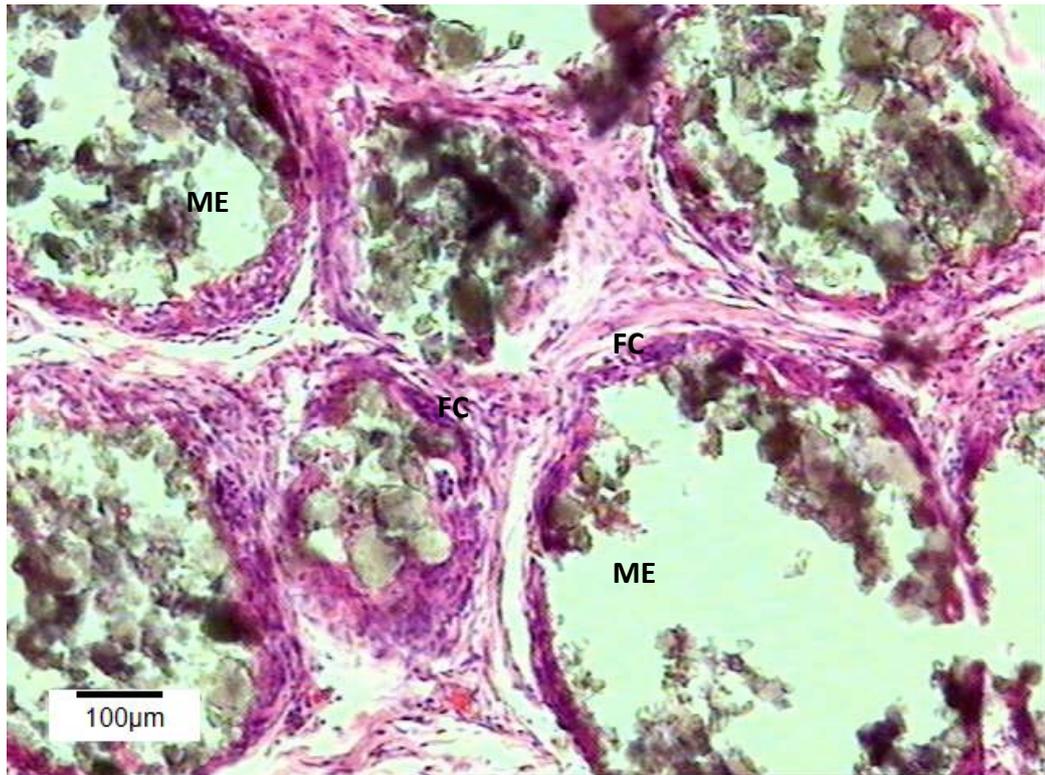


FIGURA 30 - Grupo II (HE / 10X / 120 dias) - Presença de fibras colágenas concêntricas em camadas múltiplas formando uma cápsula em torno da microesfera. Permanência dos espaços capilares luminare sem aparente formação de novos vasos. [FC – Fibras Colágenas; ME – Microesferas].

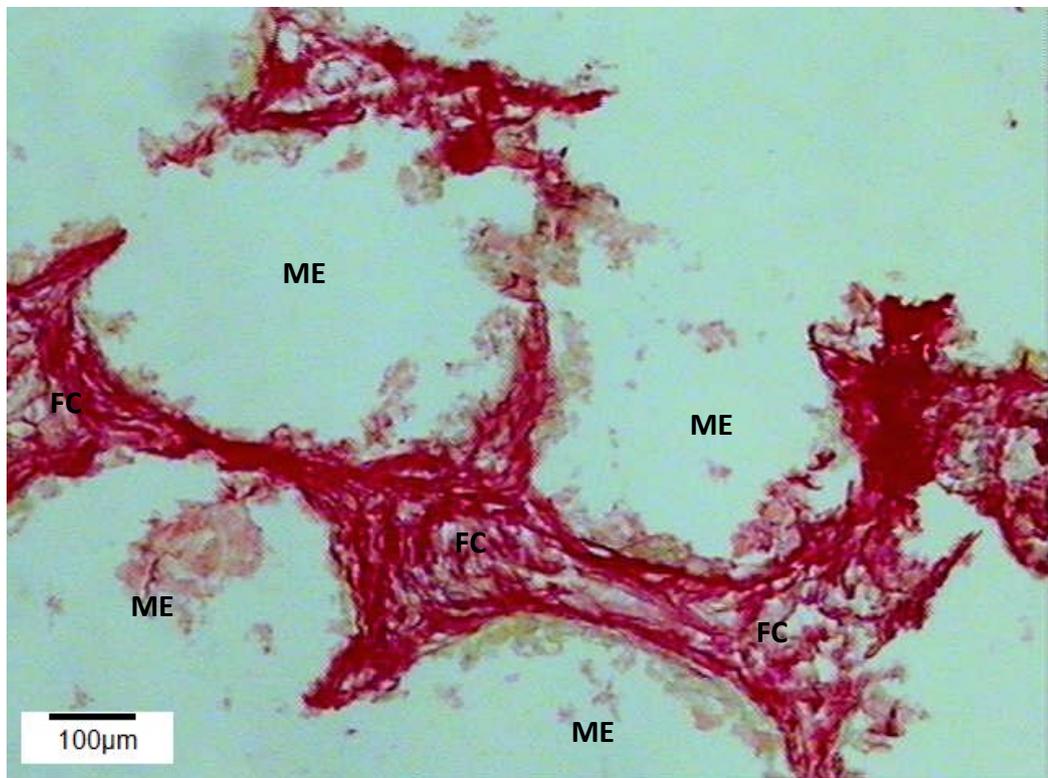


FIGURA 31 - Grupo II (PIFG / 10X / 120 dias) - Presença de fibras colágenas concêntricas mantendo a forma de microsferas mesmo com sua fragmentação. [FC – Fibras Colágenas; ME – Microesferas].

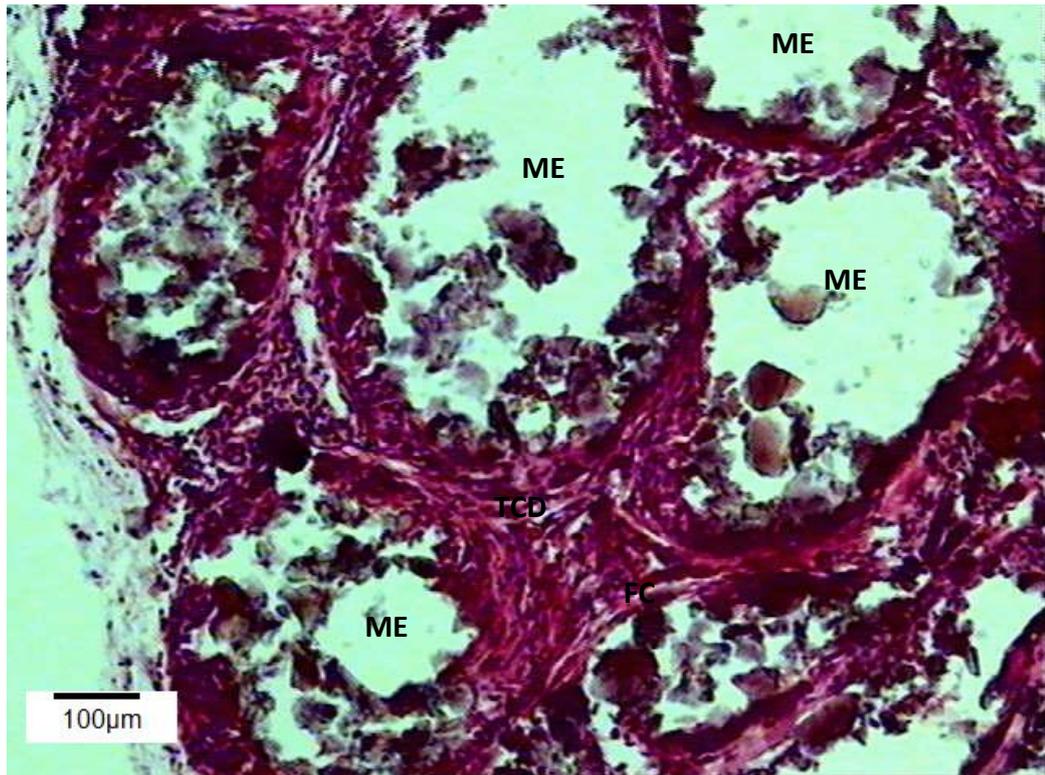


FIGURA 32- Grupo II (HE / 10X / 120 dias) – Formação de tecido conjuntivo denso entre as microsferas. [FC – Fibras Colágenas; ME – Microesferas; TCD – Tecido Conjuntivo Denso].

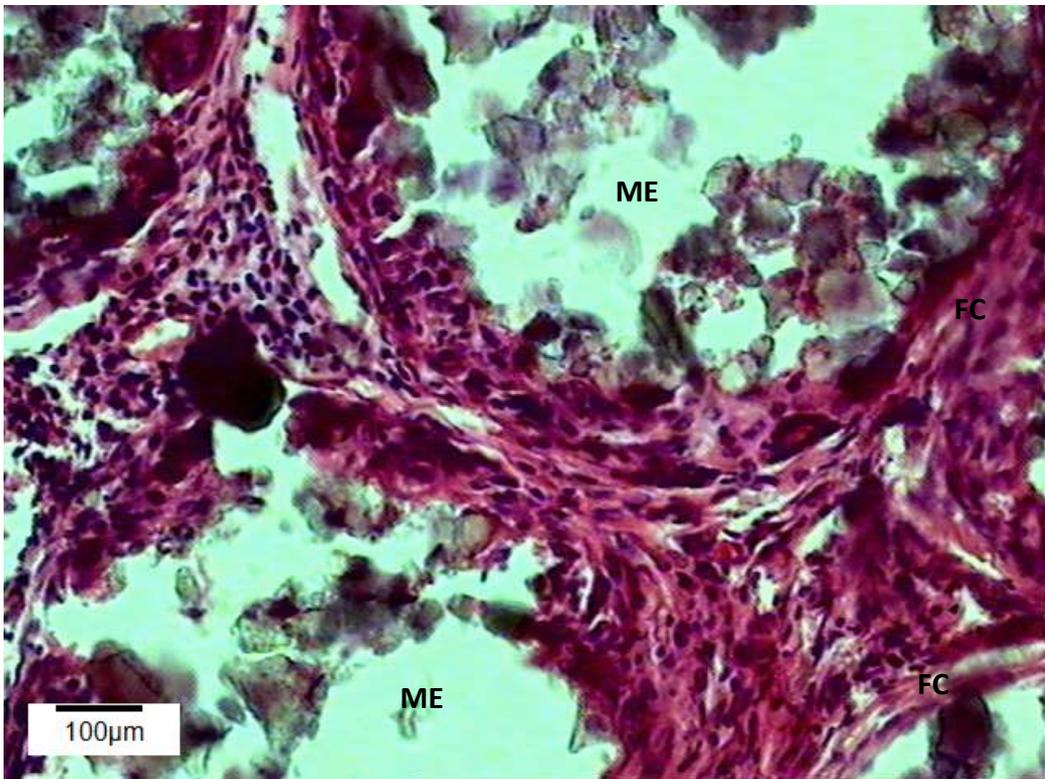


FIGURA 33 - Grupo II (HE / 10X / 120 dias) – Fibras colágenas em torno das microsferas formando uma cápsula fibrosa. [FC – Fibras Colágenas; ME – Microesferas].

5.3 GRUPO III – DEFEITO ÓSSEO PREENCHIDO COM SELANTE DE FIBRINA

Aos 15 dias, nas bordas ósseas do defeito, foi observada uma discreta neoformação óssea reativa, entretanto, em muitos casos não houve nenhuma neoformação óssea (FIGURA 34). Aos 45 e 120 dias o padrão foi semelhante com discreta neoformação óssea reparativa (FIGURAS 39 E 44).

O defeito ósseo foi preenchido por tecido conjuntivo frouxo, aos 15 dias, mais adensado na sua porção mais profunda, em contato com a dura-máter (FIGURAS 35 E 37). Nas áreas mais superficiais há a presença de material amorfo não colagênico, eosinofílico constituído pela fibrina sobreposta a toda região do defeito (FIGURA 36). O estroma apresenta espessura equivalente à espessura do osso remanescente nas bordas do defeito (FIGURA 34). Aos 45 dias, nas áreas centrais do defeito, observou-se a presença do material não colagênico, eosinofílico no interior do qual observou-se finos septos fibrosos (FIGURA 39). Tal material era acompanhado de áreas mais profundas (próximas a dura-mater) e superficiais (próximas ao tegumento) constituídas por tecido conjuntivo denso (FIGURAS 40 E 43). Aos 120 dias o defeito foi preenchido por tecido conjuntivo mais delgado que o osso remanescente, aproximadamente equivalente a um terço da espessura óssea, notando-se ainda resíduo de material eosinofílico não colágeno de permeio (FIGURA 44). O tecido conjuntivo situado na área mais superficial do defeito ósseo era mais denso, constituído por fibras colágenas orientadas em várias direções (FIGURA 45).

Observou-se aos 15 dias uma reação granulomatosa ocasional distribuída ao longo do biomaterial (FIGURA 38). Houve um denso infiltrado inflamatório mononuclear com predomínio histolinfocitário. Aos 45 dias, o interstício apresentava-se mais fibroso e observava-se ainda reação granulomatosa (FIGURA 41). Havia ainda a presença de um moderado e difuso infiltrado inflamatório mononuclear também identificado aos 120 dias.

Houve uma neoformação vascular acentuada aos 15 dias (FIGURA 37). Embora não se tenha observado a formação de novos vasos aos 45 dias, houve a permanência dos espaços vasculares (FIGURAS 41 E 42). Aos 120 dias os espaços vasculares eram menos conspícuos (FIGURAS 46 e 47).

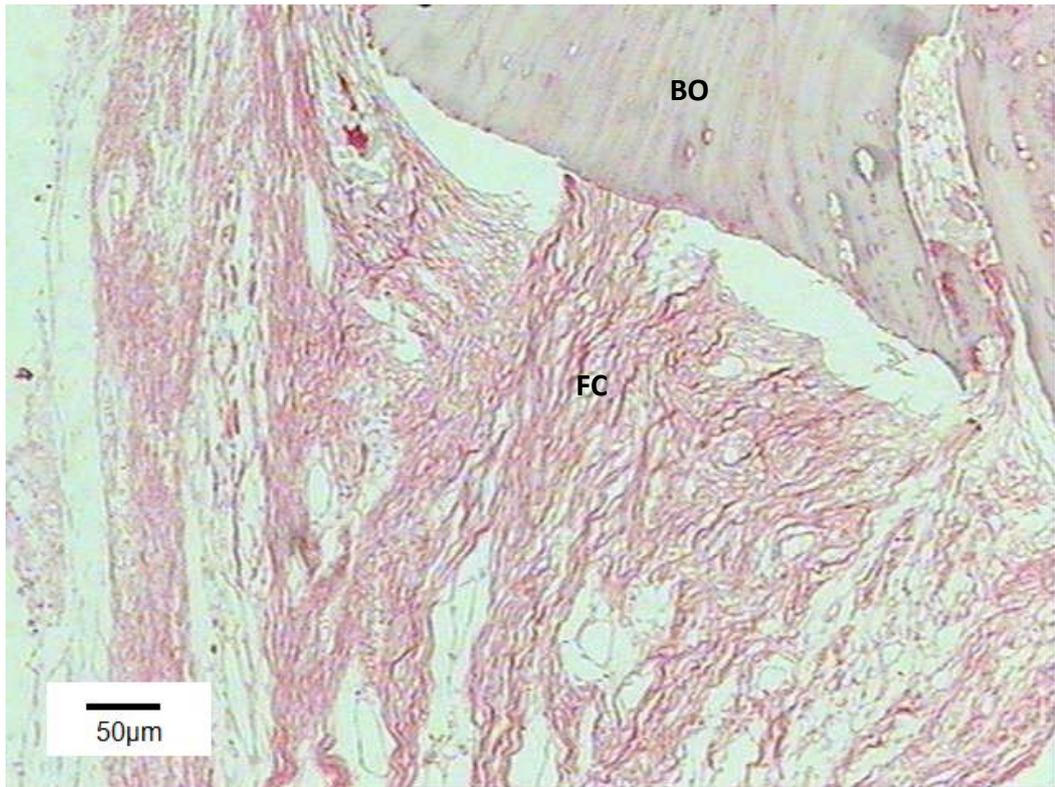


FIGURA 34 - Grupo III (PIFG / 20X / 15 dias) – Borda óssea sem neoformação óssea reparativa. Estroma com espessura equivalente a espessura óssea remanescente. [BO- Borda Óssea; FC – Fibras Colágenas].



FIGURA 35 - Grupo III (PIFG / 1X / 15 dias) - Tecido conjuntivo frouxo ocupando toda extensão do defeito. [TCF- Tecido Conjuntivo Frouxo].

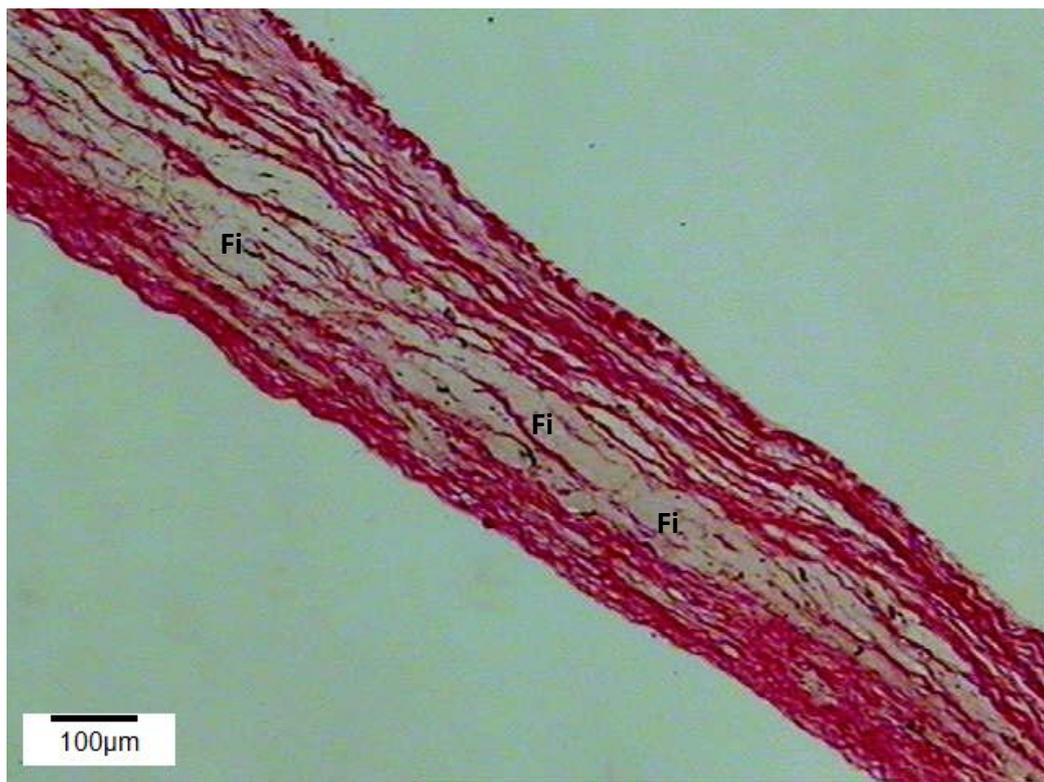


FIGURA 36 - Grupo III (PIFG / 10X / 15 dias) – Presença de material amorfo não colagênico, eosinofílico constituído pela fibrina na região do defeito. [Fi - Fibrina].

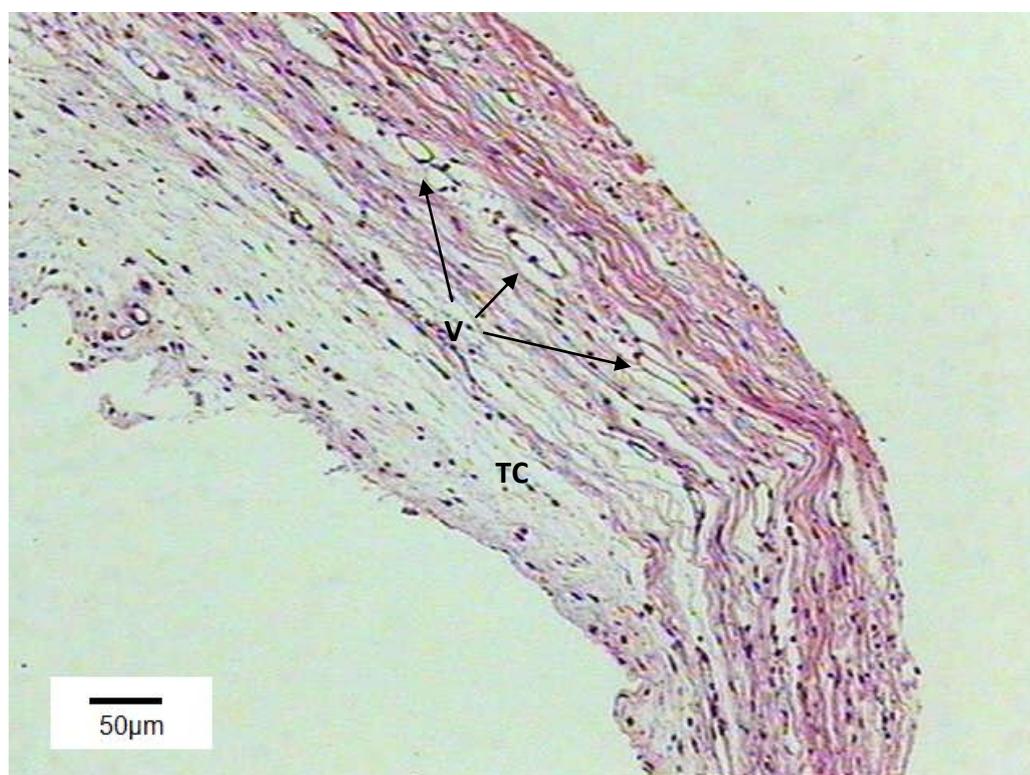


FIGURA 37 - Grupo III (PIFG / 10X / 15 dias) - Tecido conjuntivo frouxo ocupando toda extensão do defeito, mais adensado na região mais profunda do defeito (em contato com a dura-máter). [TC – Tecido Conjuntivo; V - Vasos].

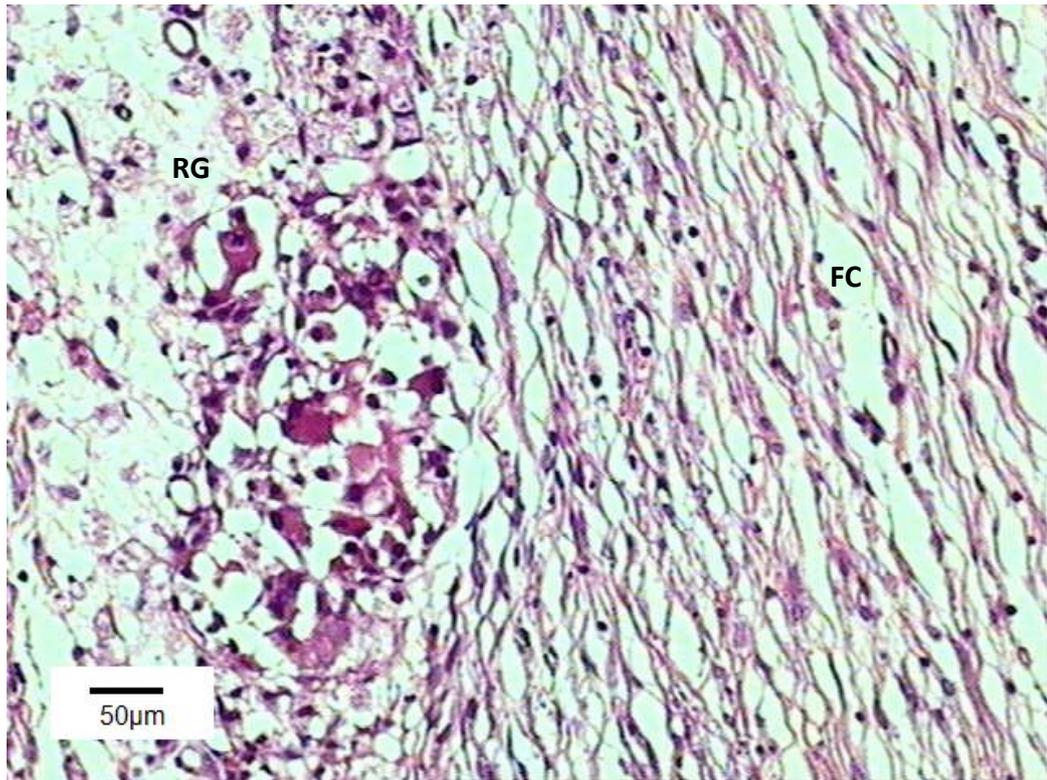


FIGURA 38- Grupo III (PIFG / 20X / 15 dias): Reação granulomatosa ocasional sobre a fibrina. Neoformação vascular acentuada. [RG – Reação Granulomatosa; FC – Fibras Colágenas].

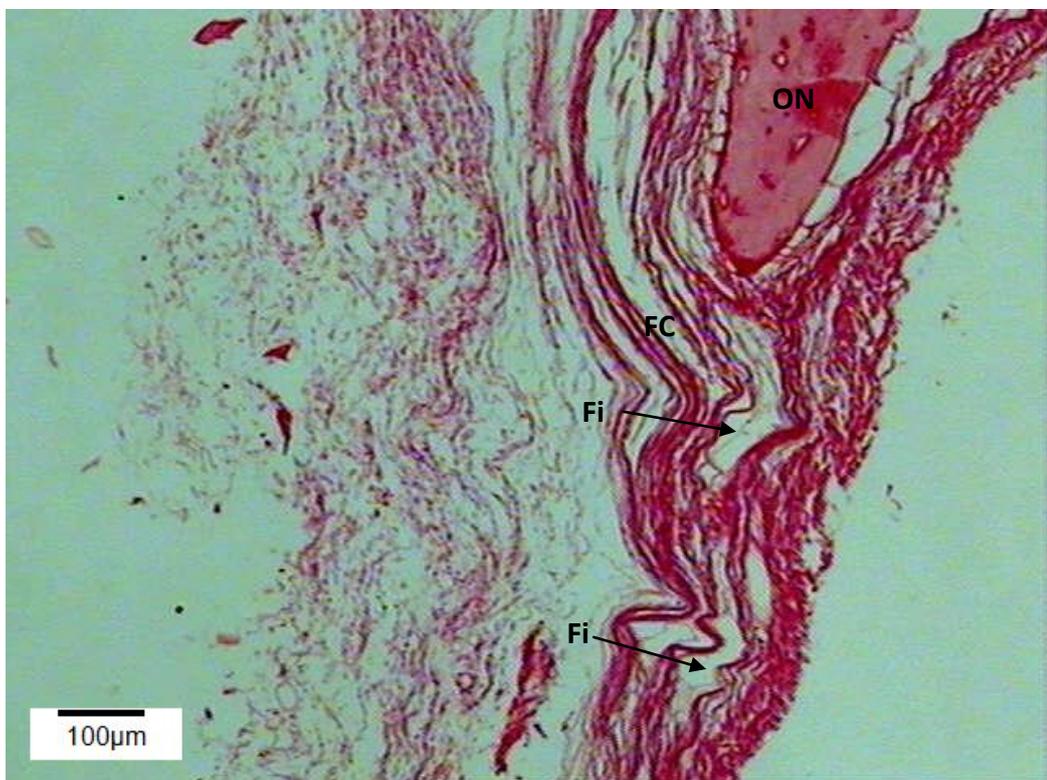


FIGURA 39- Grupo III (PIFG / 10X / 45 dias): Neoformação óssea restrita as margens do defeito. Presença de fibras colágenas preenchendo o defeito [ON – Osso Neoformado; FC – Fibras Colágenas; Fi - Fibrina].

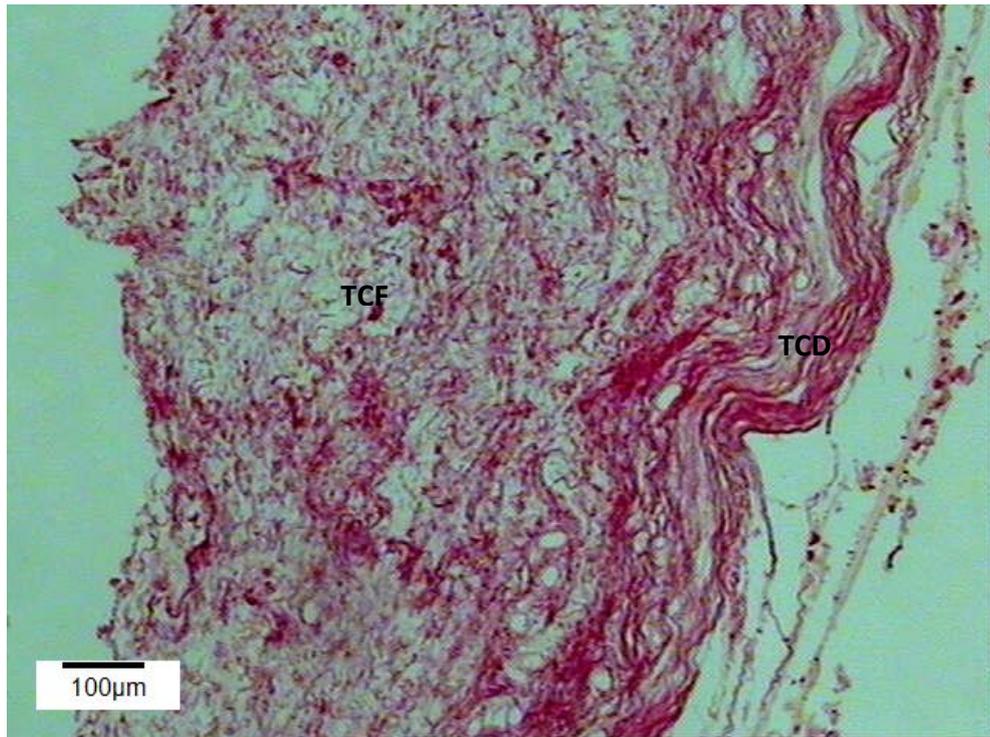


FIGURA 40- Grupo III (PIFIG / 10X / 45 dias): Presença de tecido conjuntivo frouxo ocupando todo o defeito. Na área mais profunda presença de tecido conjuntivo mais denso e na região mais superficial de tecido conjuntivo frouxo. [TCD – Tecido Conjuntivo Denso; TCF – Tecido Conjuntivo Frouxo].

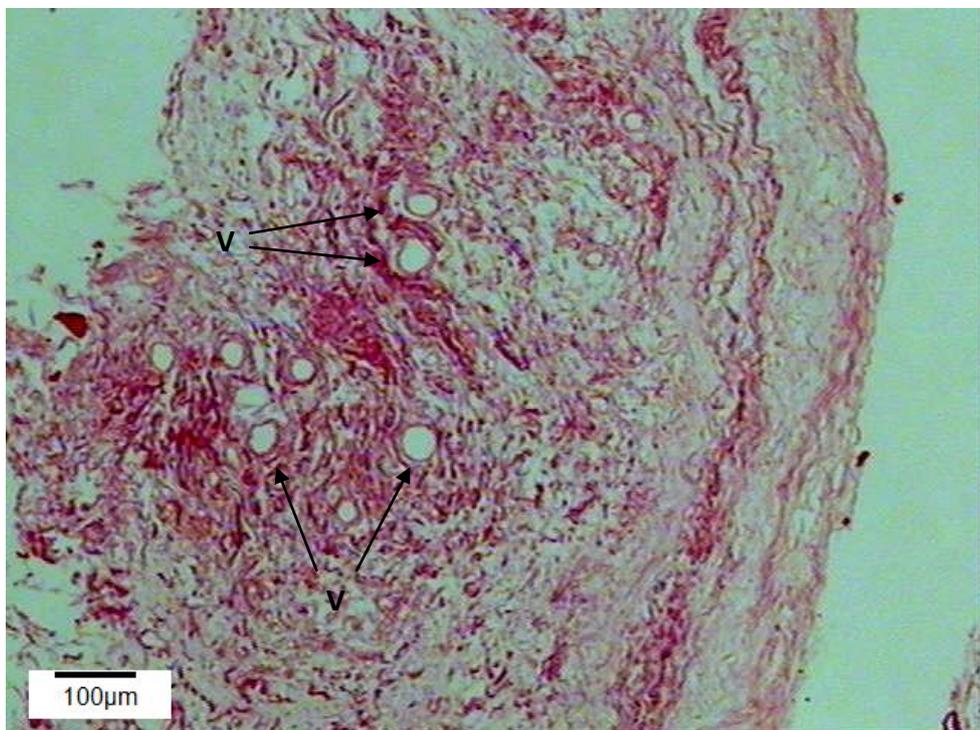


FIGURA 41 - Grupo III (HE / 10X / 45 dias) - Intensa formação vascular. [V - Vasos].

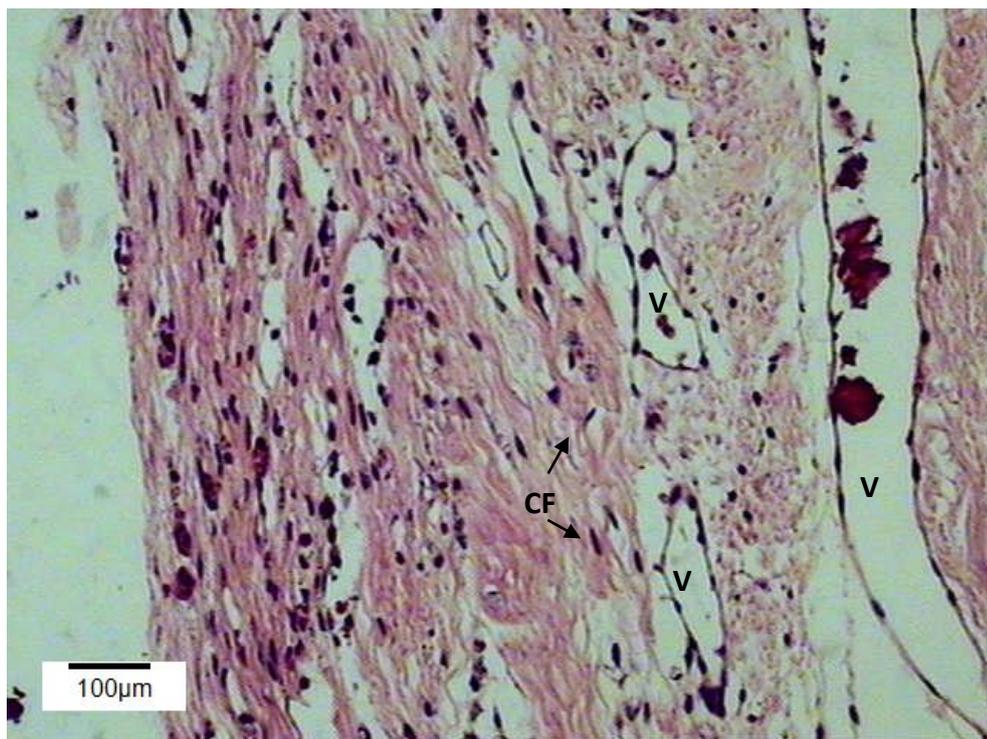


FIGURA 42 - Grupo III (HE / 10X / 45 dias) - Intensa formação vascular. Permanência de processo inflamatório mononuclear e de células fusiformes [V – Vasos; CF – Células Fusiformes].

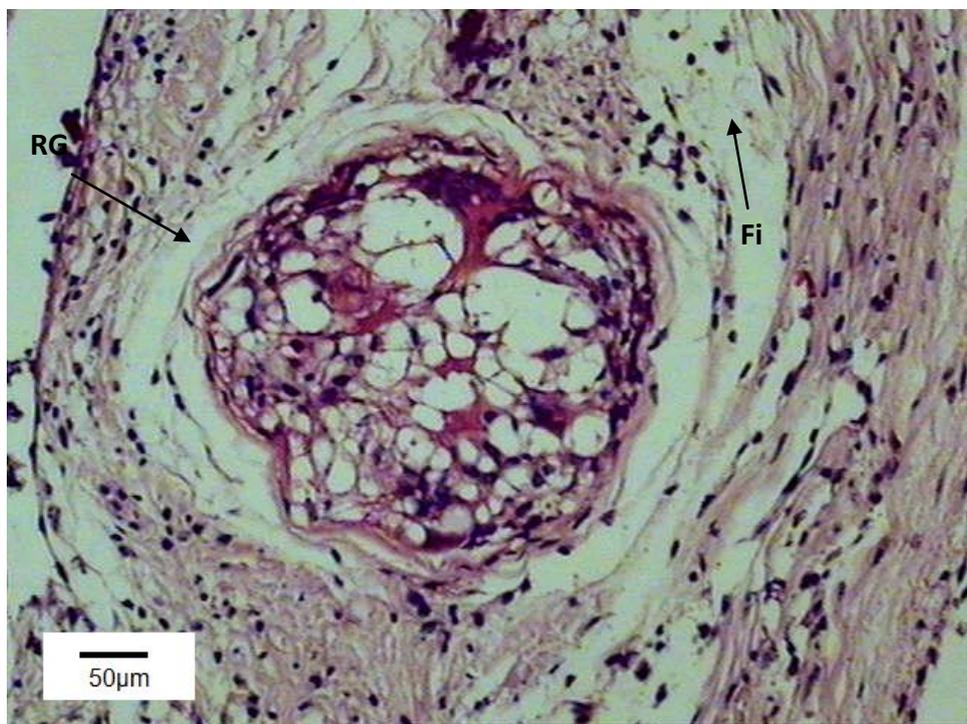


FIGURA 43 - Grupo III (HE / 20X / 45 dias) Reação granulomatosa ocasional. Presença de material amorfo não colagênico, fibrina. [RG – Reação Granulomatosa; Fi - Fibrina].

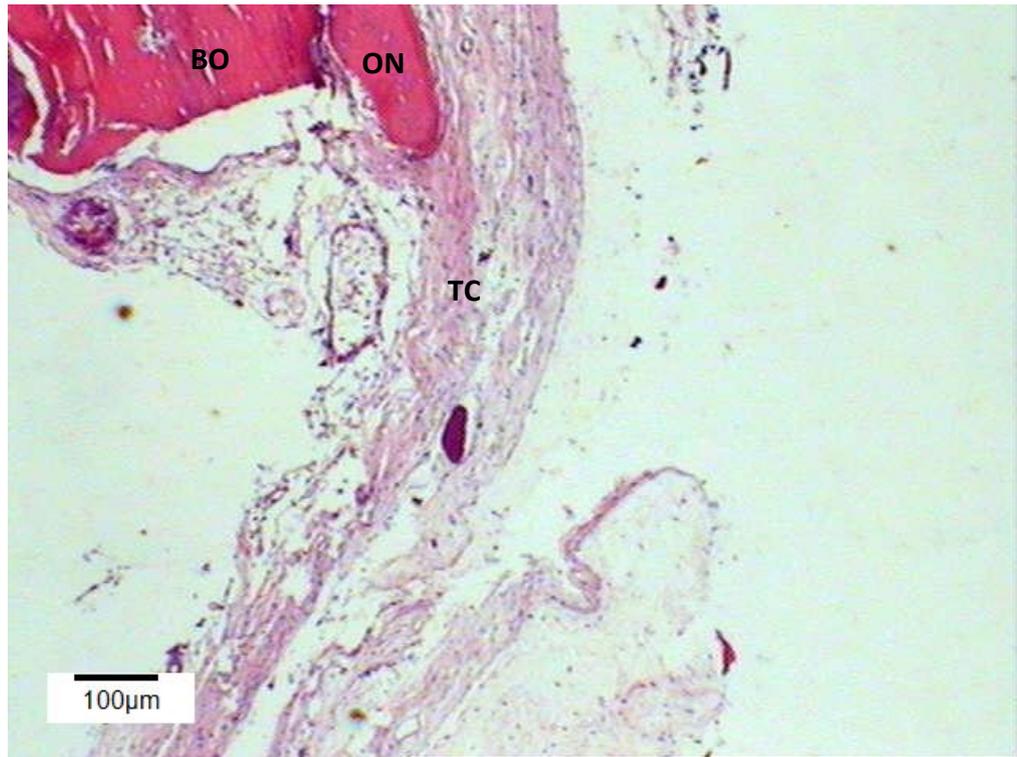


FIGURA 44 - Grupo III (HE / 10X / 120 dias) - Discreta neoformação óssea reparativa restrita as margens do defeito. Presença de tecido conjuntivo mais delgado com aproximadamente um terço da espessura do osso remanescente. [BO – Borda Óssea; ON – Osso Neoformado; TC – Tecido Conjuntivo].

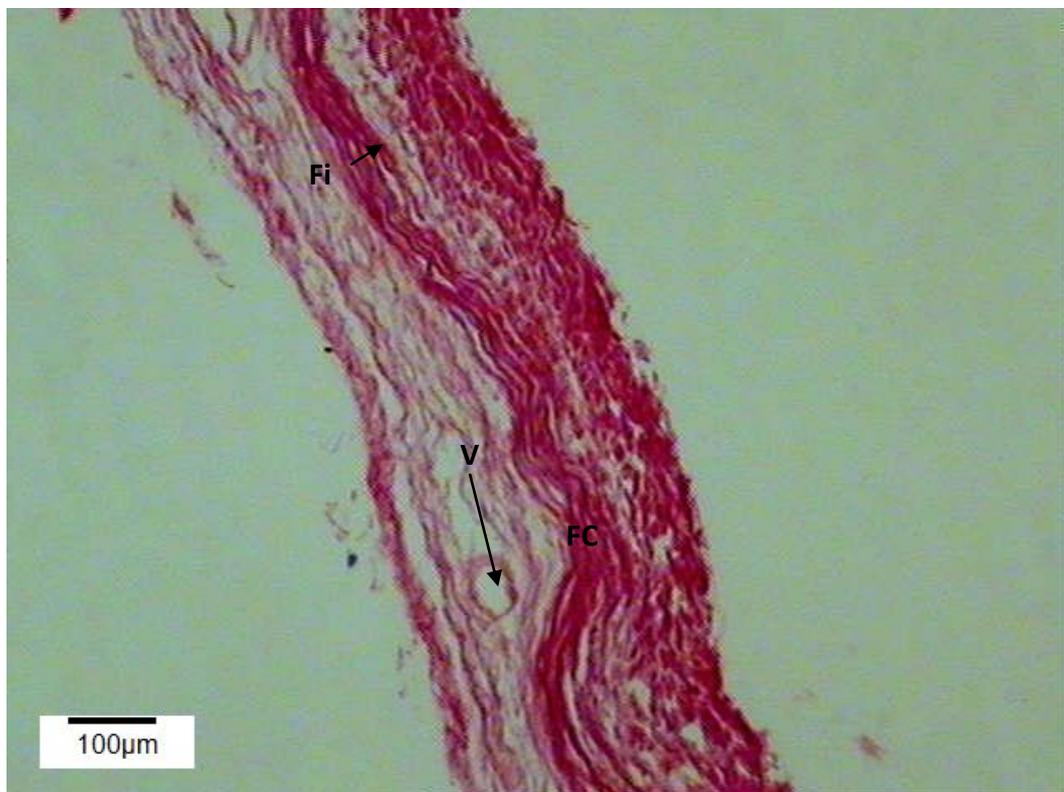


FIGURA 45 - Grupo III (PIFG / 10X / 120 dias): Presença de tecido conjuntivo mais adensado ocupando todo o defeito. Preservação dos espaços vasculares. [FC- Fibras Colágenas; V – Vasos; Fi - Fibrina].

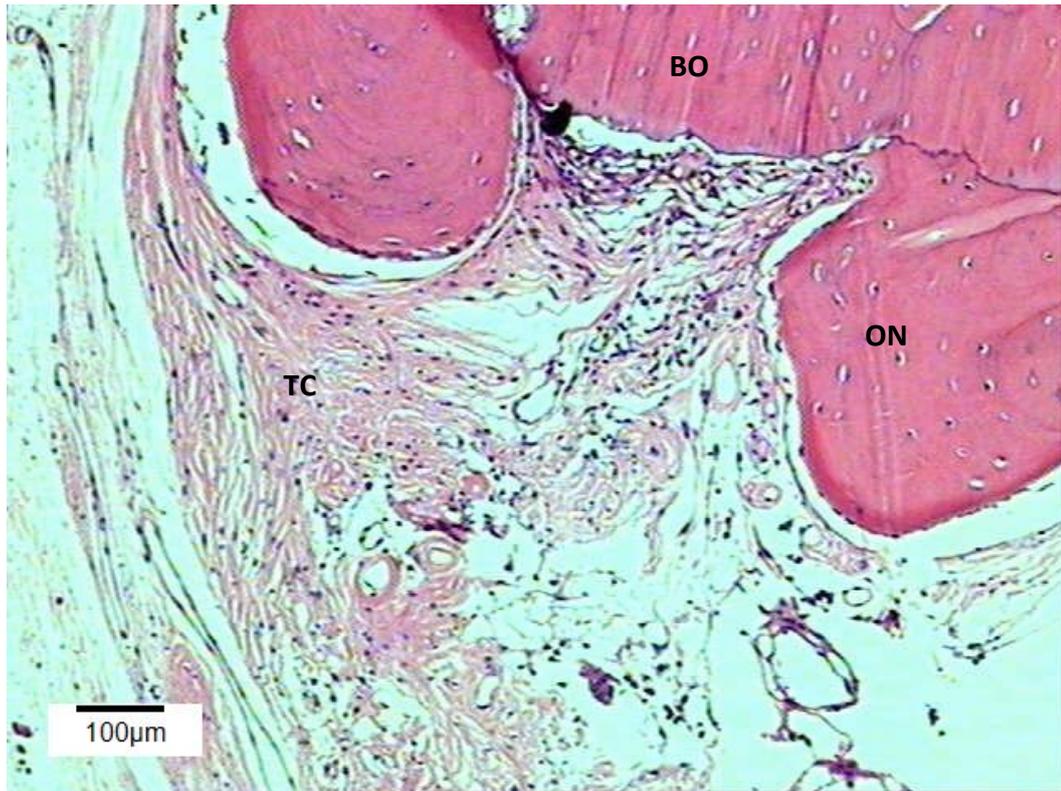


FIGURA 46 - Grupo III (HE / 10X / 120 dias) - Discreta neoformação óssea reparativa. Permanência dos espaços capilares. [BO – Borda Óssea; ON – Osso Neoformado; TC – Tecido Conjuntivo].



FIGURA 47 - Grupo III (PIFG / 10X / 120 dias) - Presença de tecido fibroso mais denso, com fibras colágenas em várias direções nas áreas mais superficiais. [BO – Borda Óssea; ON – Osso Neoformado; FC – Fibras Colágenas].

5.4 GRUPO IV – DEFEITO ÓSSEO PREENCHIDO COM MICROESFERAS DE HIDROXIAPATITA E FIBRINA

Aos 15 dias, observava-se nas bordas do defeito uma discreta neoformação óssea (FIGURA 48 E 49) com osteoblastos ainda ativos (FIGURA 50). Aos 45 e 120 dias, semelhante ao identificado nos 15 dias, observava-se uma discreta mineralização restrita às margens do defeito estendendo-se entre as microesferas próximas a essa região (FIGURA 48).

O estroma apresentava, aos 15 dias, uma abundante quantidade de células fusiformes, muitas delas dispostas de forma circunjacente as microesferas e na sua periferia foi observada uma reação granulomatosa constituída por muitos macrófagos e células gigantes multinucleadas (FIGURAS 52, 54, 57 E 59). Aos 45 dias foi vista a neoformação vascular e muitas células fusiformes de permeio (FIGURA 60). A reação granulomatosa esteve circunjacente as microesferas aos 15 dias persistindo em intensidade equivalente nos 45 dias. Neste ponto biológico foi visto ainda um infiltrado inflamatório difuso mononuclear (FIGURA 61). Aos 120 dias a reação granulomatosa persistiu com formação de fibrose mais densa circunjacente as microesferas.

O defeito encontrava-se preenchido em toda sua extensão pelas microesferas em multicamadas (FIGURA 48) e por tecido conjuntivo frouxo (FIGURA 55) exibindo neoformação vascular acentuada (FIGURAS 50 E 58) e denso infiltrado inflamatório mononuclear com predomínio linfocitário aos 15 dias (FIGURAS 51 E 53). Aos 45 dias a presença de múltiplas camadas de esferas e a formação do tecido conjuntivo frouxo foram também observadas. Em torno das microesferas, concentricamente, existem células fusiformes acompanhadas de fibrose espessa que circunscreve separadamente cada esfera (FIGURAS 61 E 62). Aos 120 dias o defeito encontrava-se preenchido em toda a sua extensão por múltiplas camadas de esferas, permeadas por tecido conjuntivo mais denso, com estroma menos celuloso e com mais fibrose (FIGURAS 63 E 64). Observava-se ainda a presença de um moderado infiltrado inflamatório mononuclear com predomínio linfocitário.

As microesferas parecem ser constituídas de material particulado pouco coeso apresentando algumas células fusiformes no seu interior aos 15 dias (FIGURA 57). Semelhantemente, aos 45 e 120 dias, as microesferas apresentam-se microparticuladas (FIGURAS 62 E 64).

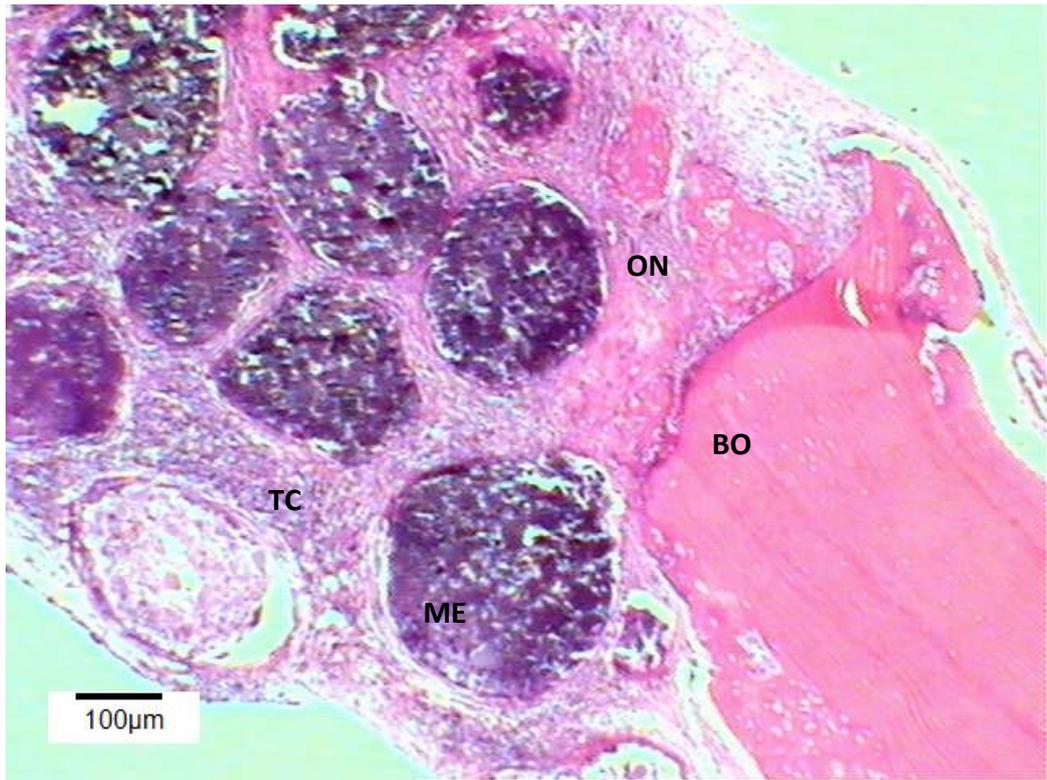


FIGURA 48 - Grupo IV (HE / 1X / 15 dias) – Borda do defeito com neoforção óssea reativa. [ME – Microesferas; BO – Borda Óssea; ON – Osso Neoformado; TC – Tecido Conjuntivo].

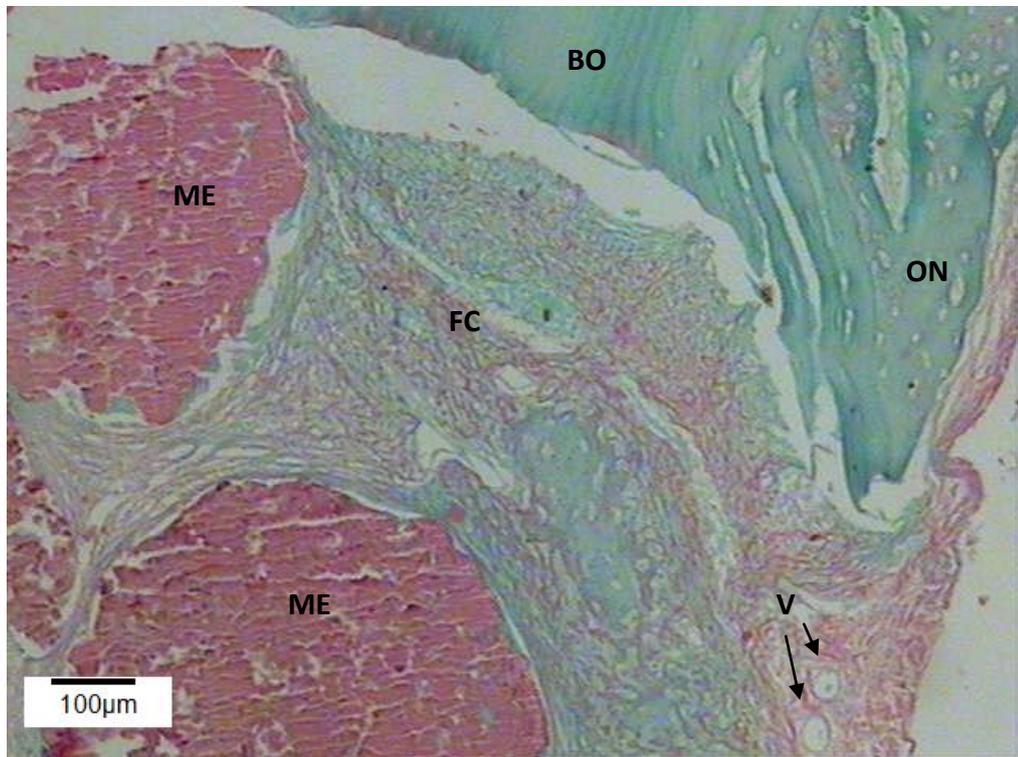


FIGURA 49 - Grupo IV (PIFG / 10X / 15 dias) – Borda do defeito com limitada neoforção óssea reativa. [ME – Microesferas; BO – Borda Óssea; ON – Osso Neoformado; FC – Fibras Colágenas; V - Vasos].

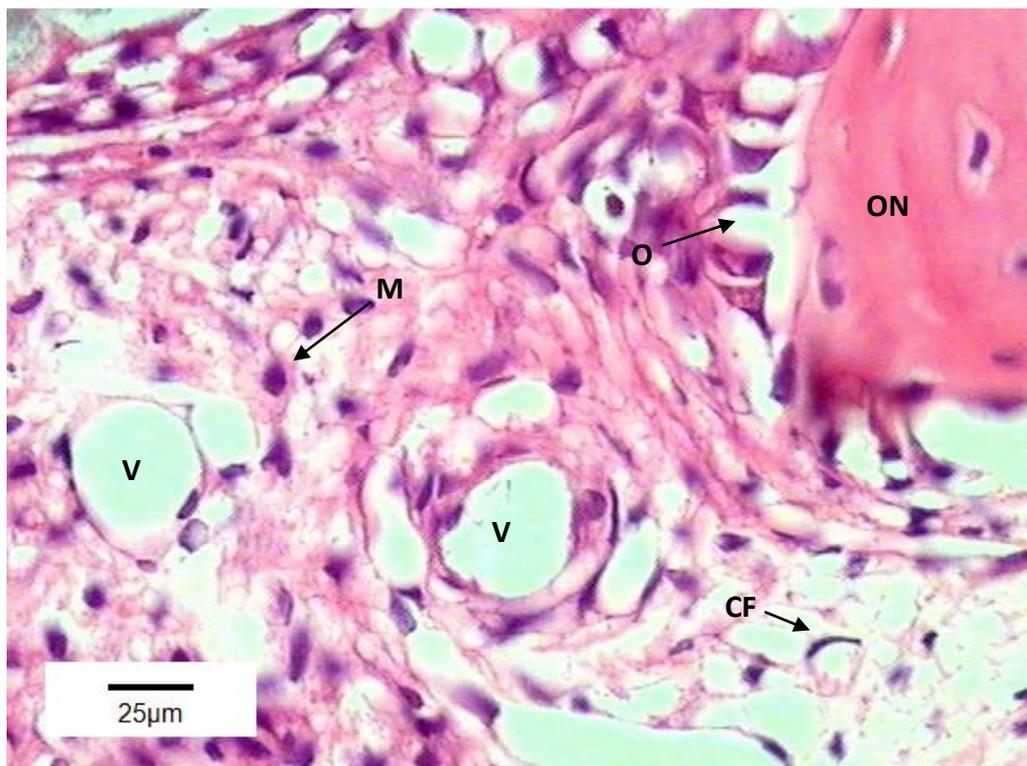


FIGURA 50 - Grupo IV (HE / 40X / 15 dias) - Neoformação vascular acentuada e moderado infiltrado inflamatório mononuclear. Presença de osteoblastos ainda ativos na superfície do osso neoformado. [V – Vasos; M- Macrófagos; O – Osteoblastos; ON – Osso Neoformado; CF – Células Fusiformes].

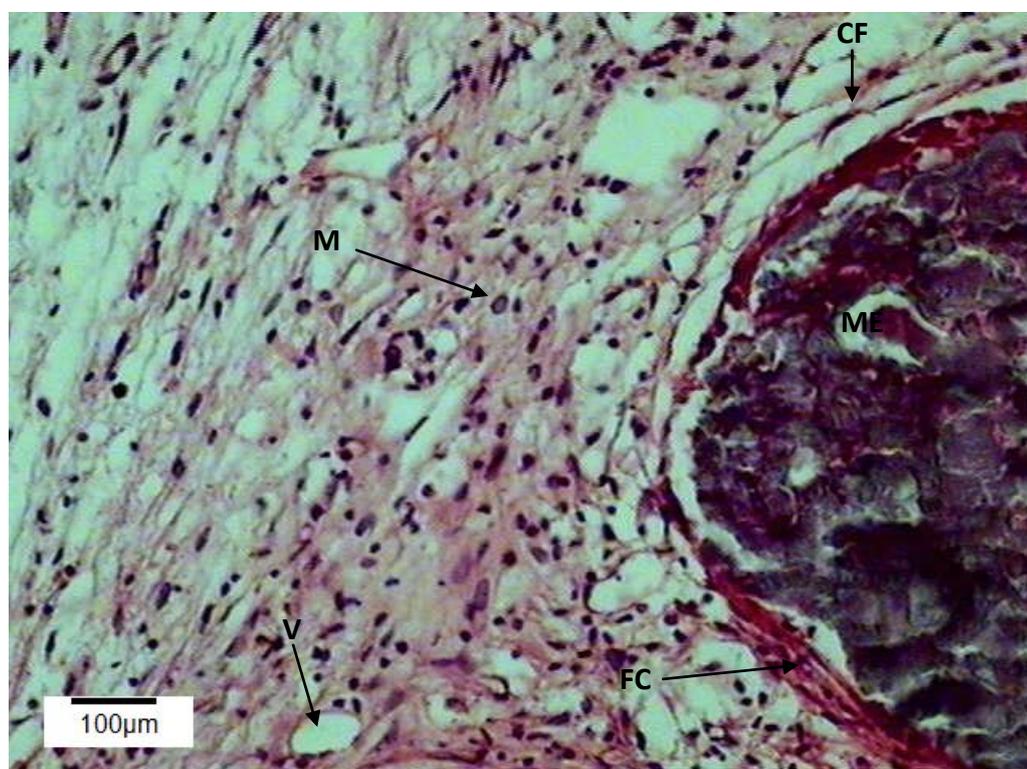


FIGURA 51 - Grupo IV (HE / 10X / 15 dias) – Fibras Colágenas concêntricas em torno das microesferas. [V – Vasos; FC – Fibras Colágenas; M – Macrófagos; ME – Microesferas].

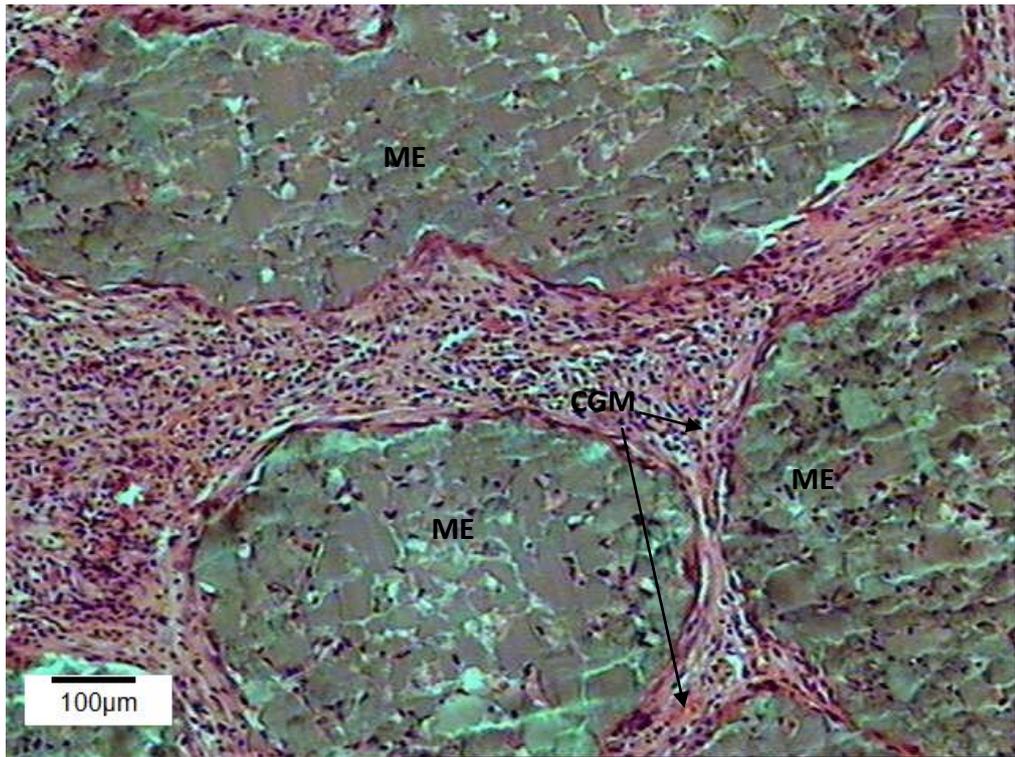


FIGURA 52 - Grupo IV (HE / 10X / 15 dias) – Estroma celuloso com presença de infiltrado inflamatório mononuclear. Presença de células gigantes multinucleadas. [CGM – Células Gigantes Multinucleadas; ME – Microesferas].

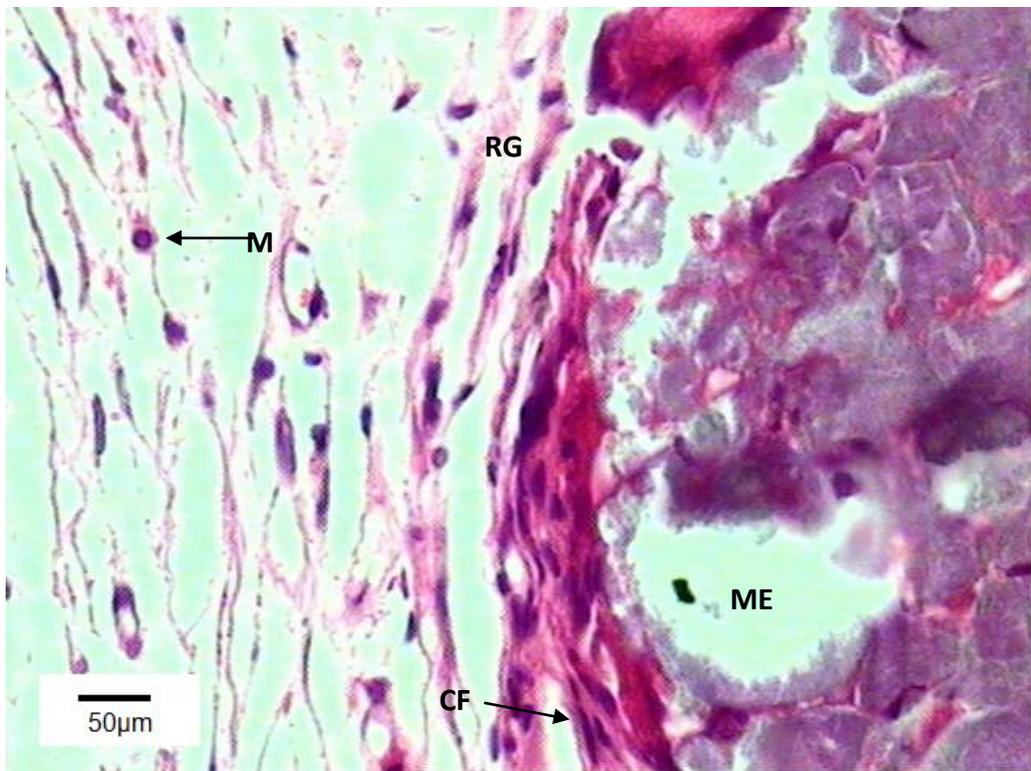


FIGURA 53 - Grupo IV (PIFG / 40X / 15 dias) – Interface entre biomaterial e interstício com reação granulomatosa. [RG – Reação Granulomatosa; CF – Células Fusiformes; ME – Microesferas; M - Macrófagos].

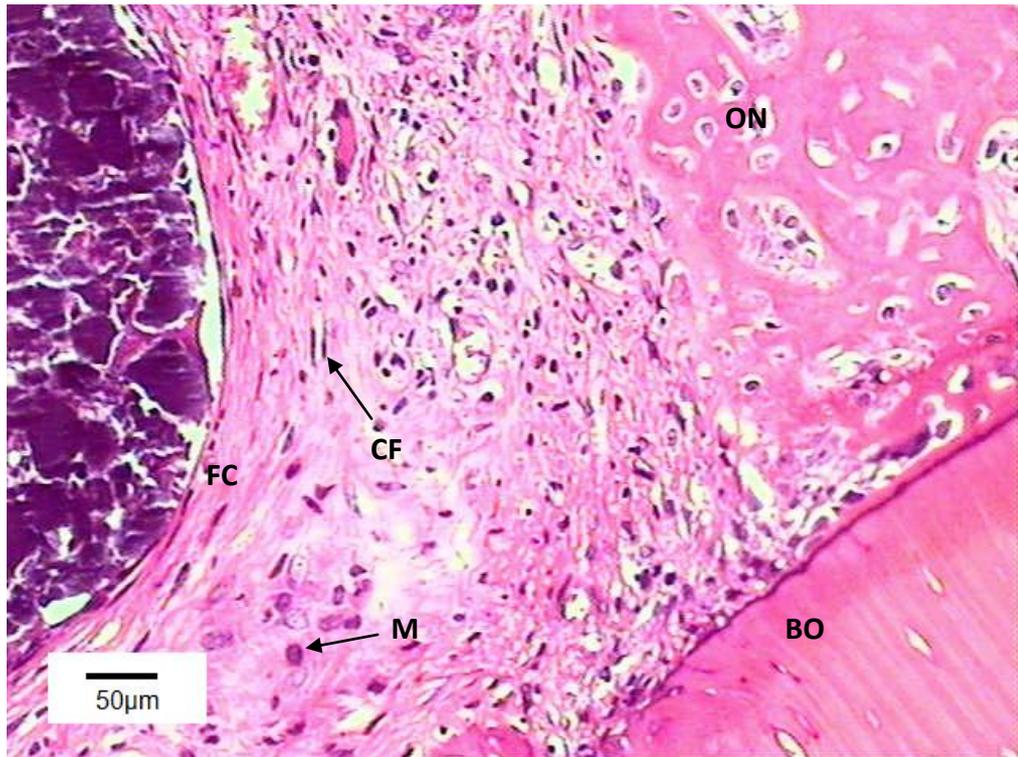


FIGURA 54 - Grupo IV (HE / 20X / 15 dias) - Grande quantidade de células fusiformes dispostas de forma circunjacente as microesferas. [CF – Células Fusiformes; ON – Osso Neoformado; BO – Borda Óssea; M- Macrófagos; FC – Fibras Colágenas].

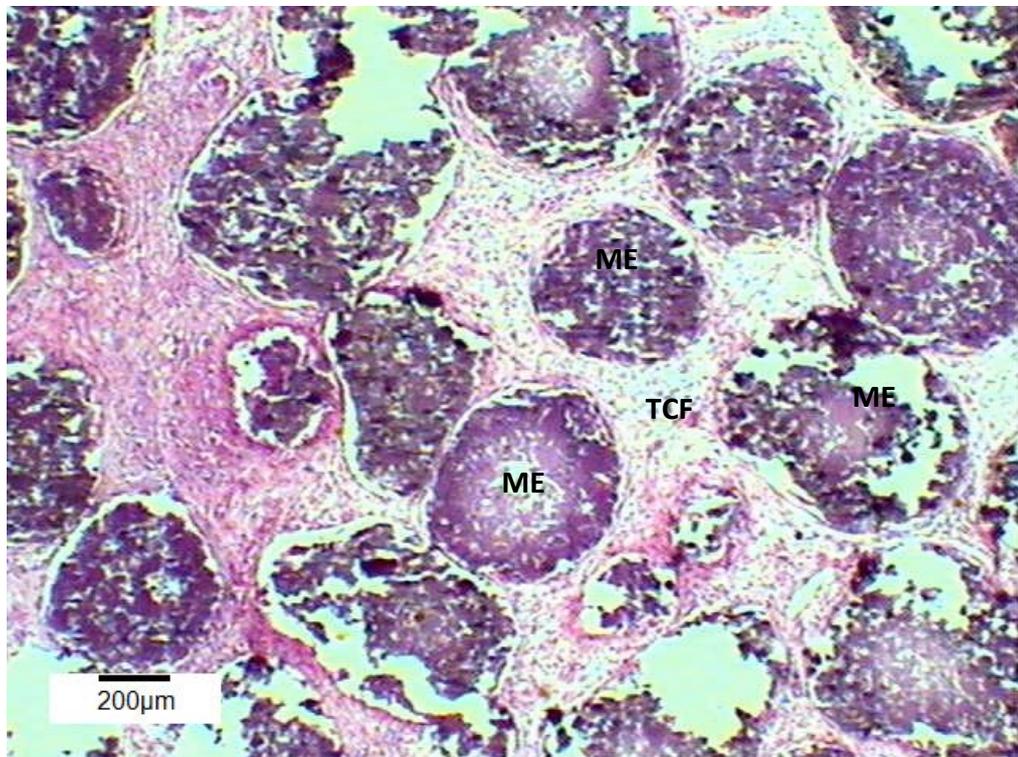


FIGURA 55 - Grupo IV (HE / 1X / 15 dias) - Defeito preenchido por microesferas em multicamadas com tecido conjuntivo frouxo de permeio. [TCF – Tecido Conjuntivo Frouxo; ME - Microesferas].

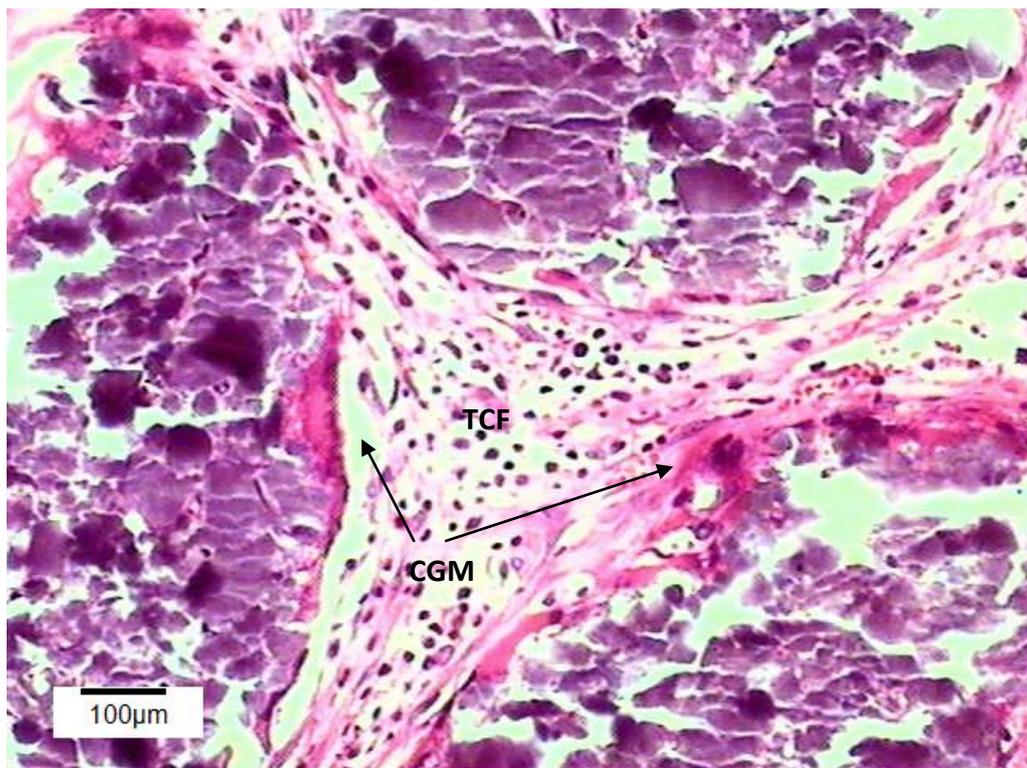


FIGURA 56 - Grupo IV (HE / 10X / 15 dias) - Tecido conjuntivo frouxo permeando as microesferas nos espaços triangulares formados entre elas. [TCF – Tecido Conjuntivo Frouxo; CGM – Células Gigantes Multinucleadas].

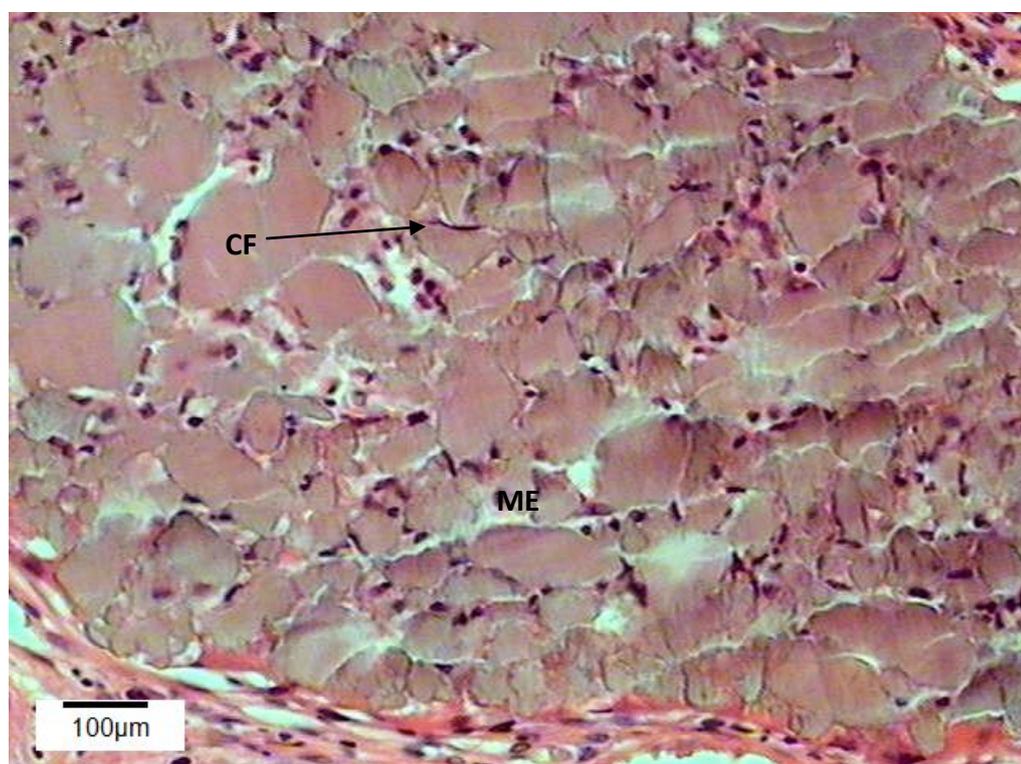


FIGURA 57 - Grupo IV (HE / 20X / 15 dias): Microesfera constituída de material particulado pouco coeso apresentando algumas células fusiformes no seu interior. [ME – Microesferas; CF – Células Fusiformes].

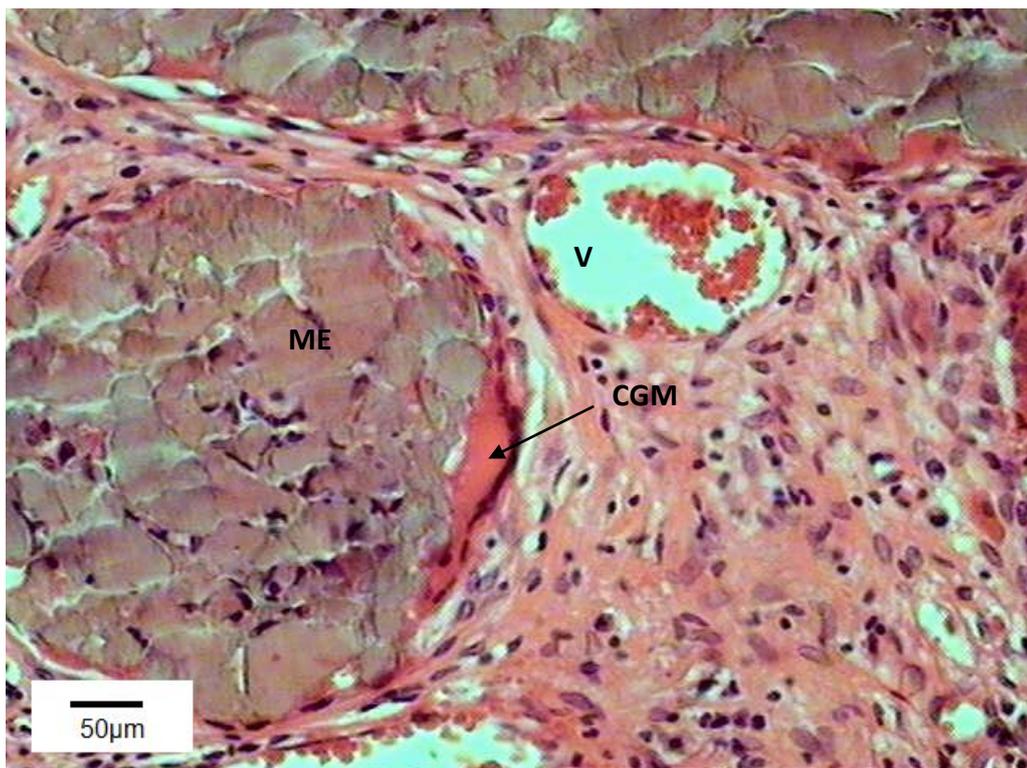


FIGURA 58 - Grupo IV (HE / 20X / 15 dias): Presença de células gigantes multinucleadas em torno do biomaterial. [ME – Microesferas; V – Vasos; CGM – Células Gigantes Multinucleadas].

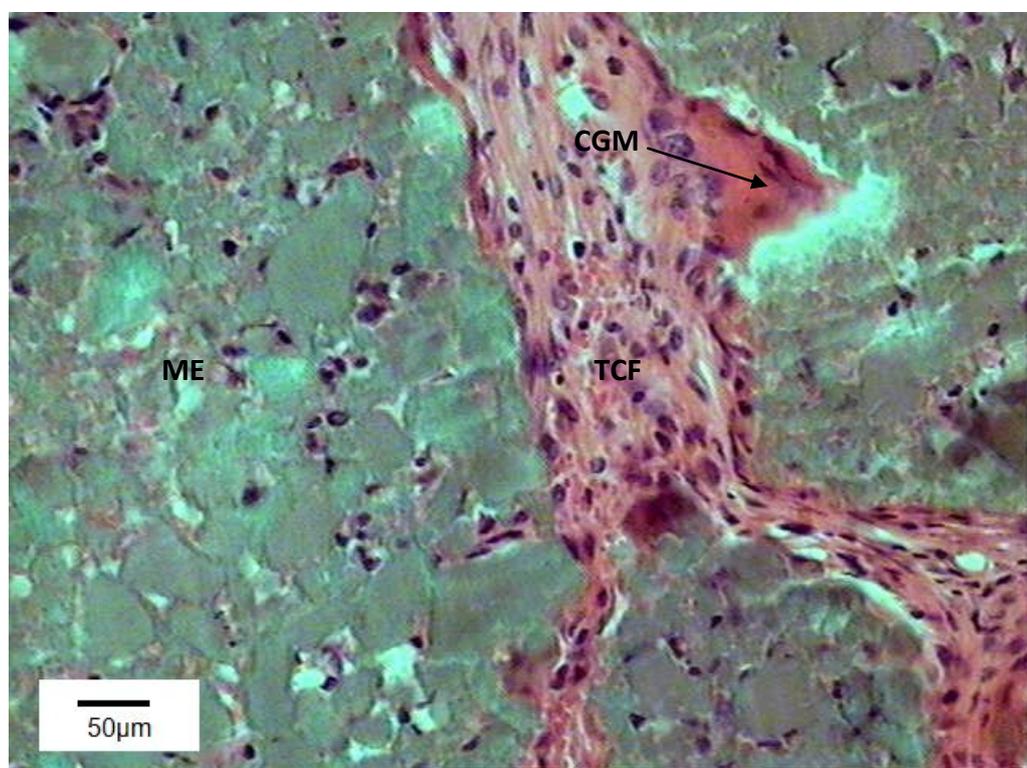


FIGURA 59 - Grupo IV (HE / 20X / 15 dias): Tecido conjuntivo frouxo preenchendo espaços entre as microsferas. Presença de células gigantes multinucleadas em torno do biomaterial. [ME – Microesferas; TCF – Tecido Conjuntivo frouxo; CGM – Células Gigantes Multinucleadas].

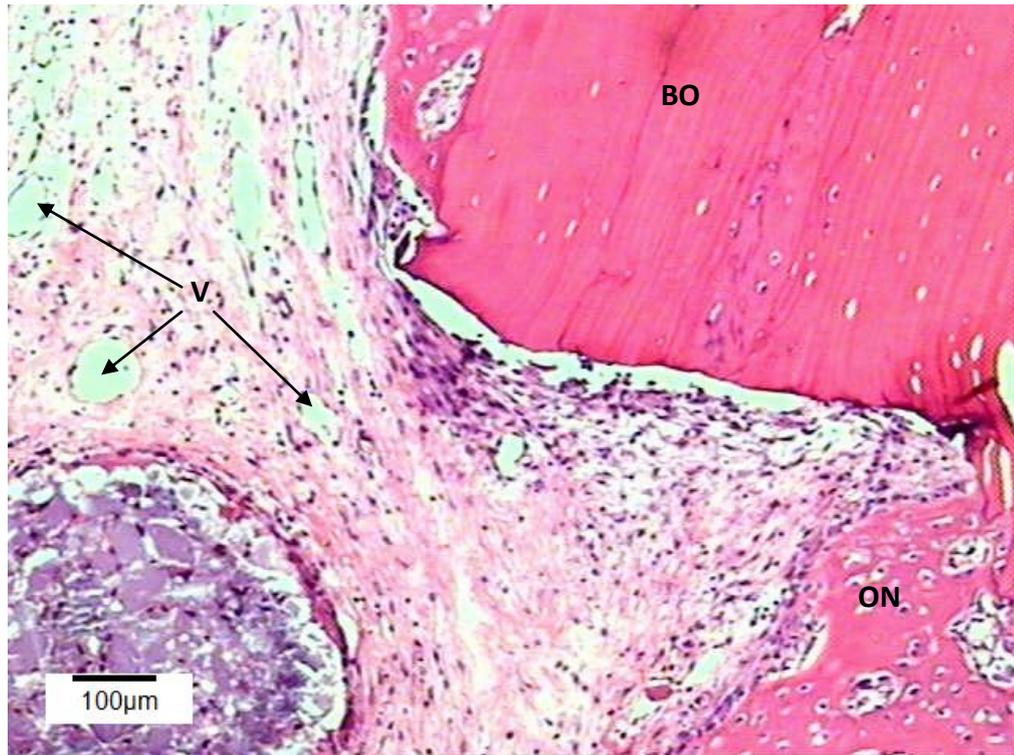


FIGURA 60 - Grupo IV (HE / 10X / 45 dias): Borda óssea revelando discreta neoformação óssea reativa restrita a borda do defeito. [ON – Osso Neoformado; BO – Borda Óssea; V - Vasos].

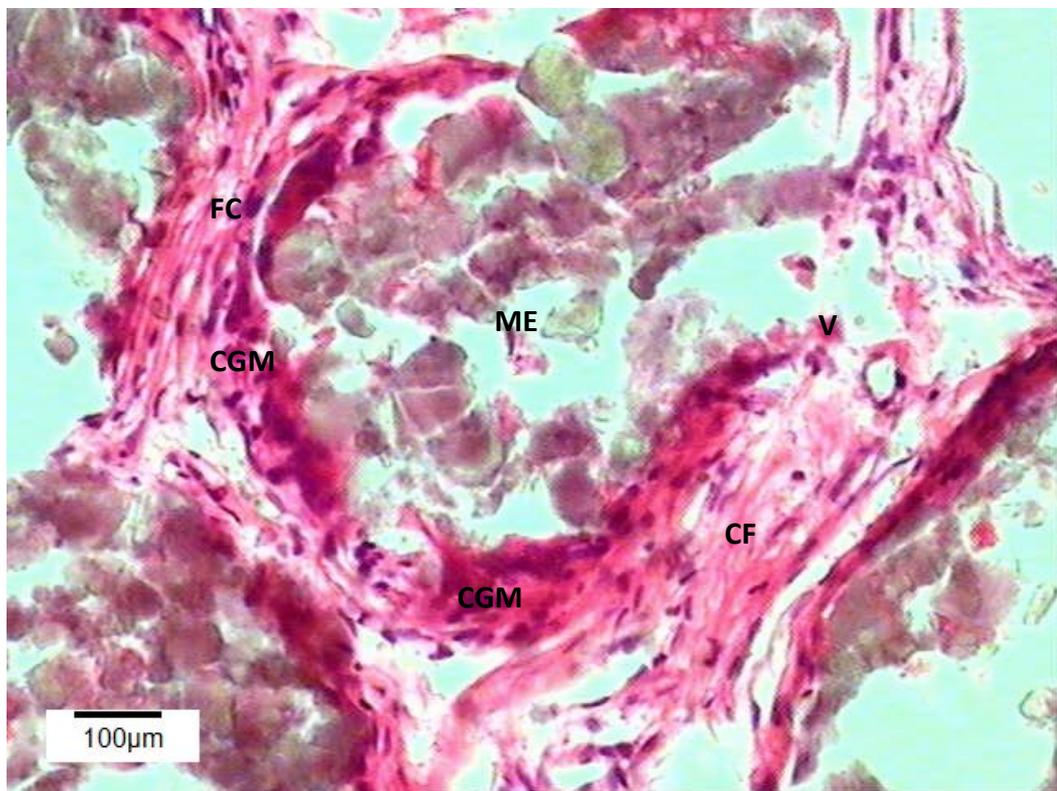


FIGURA 61 - Grupo IV (PIFG / 10X / 45 dias) - Presença de grande quantidade de células macrofágicas circundando as microesferas e formação, em torno de cada microesfera, de fibrose. [ME – Microesferas; FC – Fibras Colágenas; CF – Células Fusiformes; V – Vasos; CGM – Células Gigantes Multinucleadas].

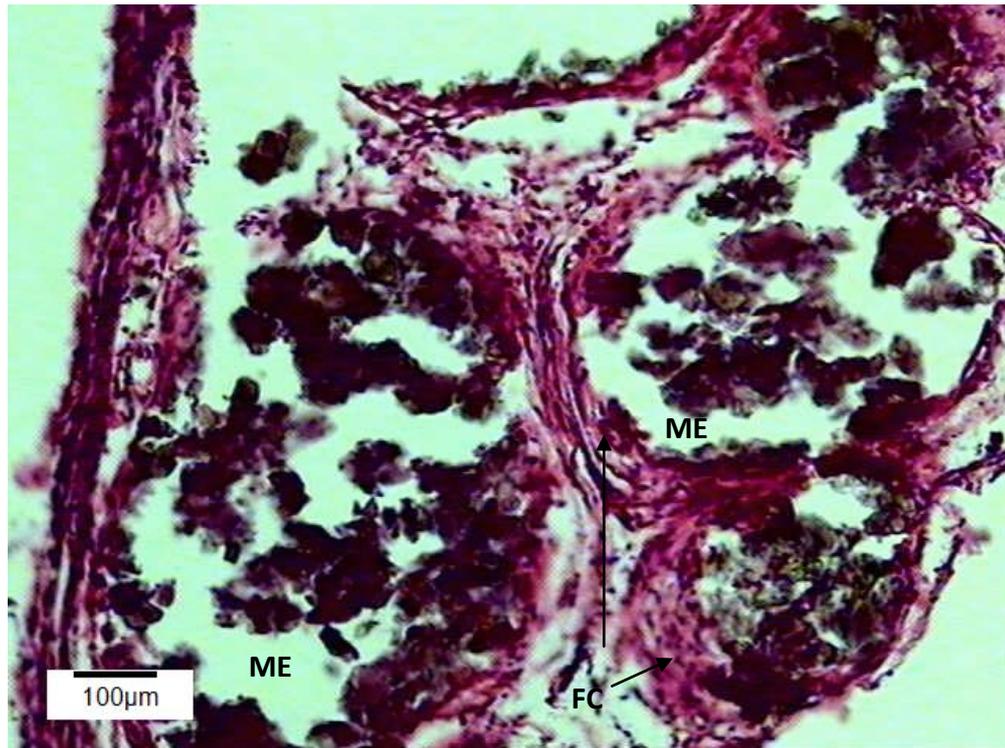


FIGURA 62 - Grupo IV (HE / 10X / 45 dias) - Formação, em torno de cada microesfera, de cápsula fibrosa que permanece com a fragmentação do biomaterial. [ME – Microesferas; FC – Fibras Colágenas].

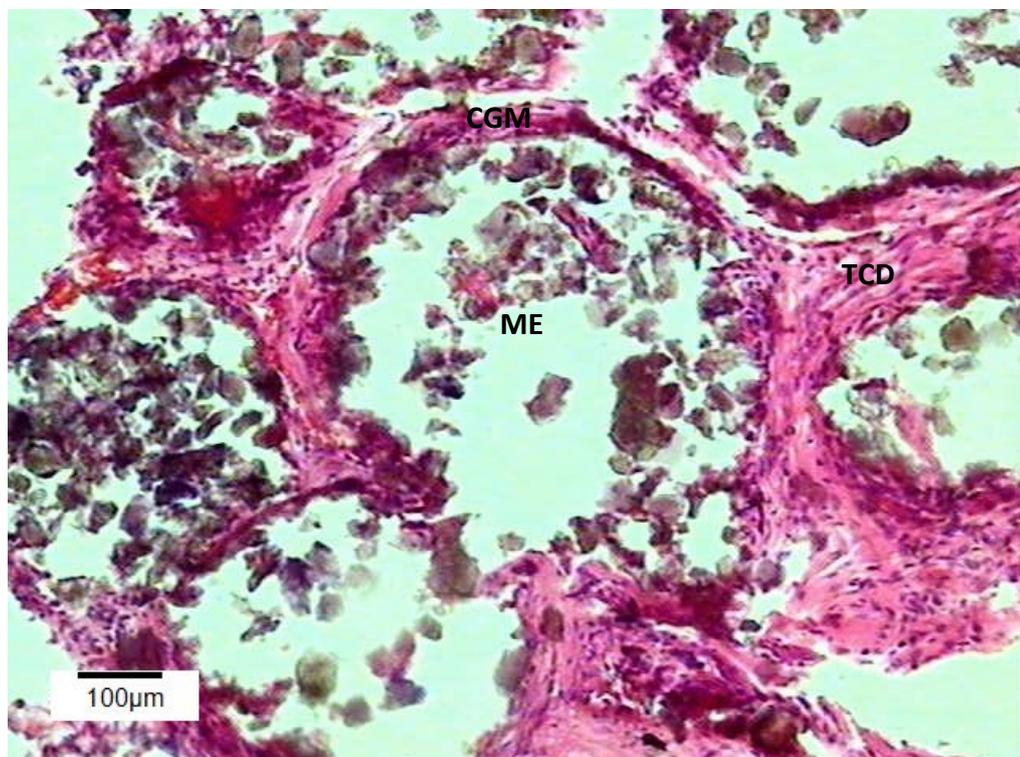


FIGURA 63 - Grupo IV (PIFG / 10X / 120 dias): Presença de tecido conjuntivo denso entre as microesferas. [ME – Microesferas; TCD – Tecido Conjuntivo Denso; CGM – Células Gigantes Multinucleadas].

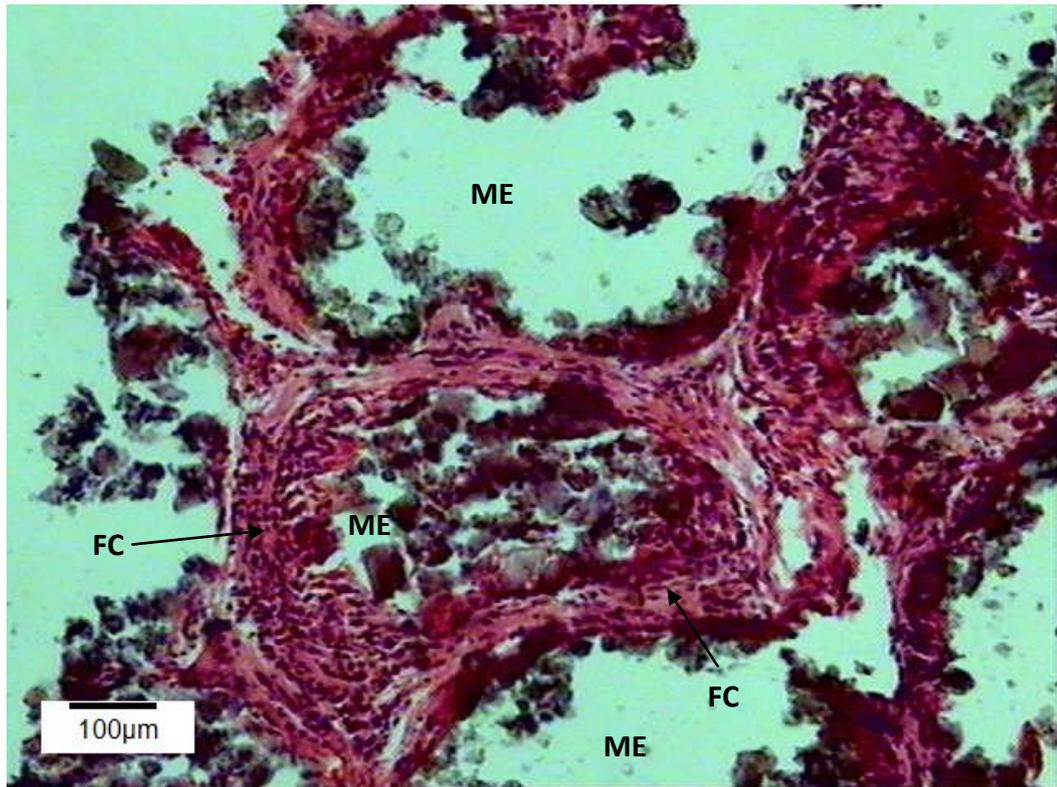


FIGURA 64 - Grupo IV (PIFG / 10X / 120 dias): Presença de cápsula fibrosa em torno do biomaterial. [ME – Microesferas; FC – Fibras Colágenas].

6.DISSCUSSÃO

O tecido ósseo, em função da sua capacidade regenerativa é, em muitas situações, capaz de restabelecer perfeitamente sua anatomia e suas propriedades mecânicas através de processos complexos que envolvem atividade local e sistêmica e participam deste processo vários tipos de células, enzimas e fatores de regeneração tecidual (PINHEIRO *et al.*, 2004). Esse tecido, quando lesado, é capaz de se regenerar, sem a formação de cicatriz fibrosa (DELACURE, 1994).

No entanto, a extensão do reparo e a velocidade com a qual ocorrerá dependem da localização anatômica, da etiologia e das dimensões da lesão, além das características biológicas de cada indivíduo. A capacidade reparativa óssea tem limites podendo falhar caso certas condições não forem atendidas. Os fatores que impedem ou previnem o reparo ósseo são falhas de vascularização, defeitos sobre-estendidos e tecidos competidores com alta atividade de proliferação (PINHEIRO *et al.*, 2004). Além disso, outros fatores que impedem a regeneração óssea devem ser considerados como a interposição de tecido mole ou a presença de osso necrótico entre os fragmentos ósseos, infecção local e a inadequada imobilização do material implantado com o seu conseqüente deslocamento (BARRIAS *et al.*, 2005).

A manutenção da integridade do periosteio também é um fator determinante da capacidade regenerativa (BRAZ *et al.*, 2003; LEMPERLE *et al.*, 1996). Por esta razão, neste experimento, o periosteio foi removido uma vez que, quando o objetivo é avaliar o potencial osteogênico de um biomaterial, é recomendada sua remoção já que contém células progenitoras com capacidade de se diferenciarem em osteoblastos sendo estimuladas a produzir novo osso (HONMA, 2008). Quando removido durante a confecção do defeito, células provenientes de outros sítios precisam migrar e se diferenciarem para que a regeneração aconteça (HONMA, 2008). Lemperle e colaboradores (1996) puderam observar que em defeitos críticos na calvária de cães, quando o periosteio não foi preservado, a regeneração óssea ocorreu de maneira limitada (LEMPERLE *et al.*, 1996).

Histologicamente, em todos os animais onde a neoformação óssea foi observada, o osso recém formado apresentou aspecto imaturo, acompanhado de intensa formação vascular e fibras colágenas organizadas irregularmente, não se observando ainda a presença de canais de Havers com morfologia bem definida. Ao longo do tempo, o osso adquire aspecto de osso maduro, podendo-se identificar a presença de osteócitos e uma aparente estabilidade, características compatíveis com o padrão descrito em outros experimentos (JUNQUEIRA;

CARNEIRO, 2004; LYNCH; GENKO, MARX, 1999; MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005).

Nos defeitos críticos, a formação óssea limita-se às áreas periféricas sendo preenchido em toda extensão por tecido conjuntivo fibroso (HONMA *et al.*, 2008) como o observado no grupo I (grupo controle) no qual todo o defeito foi ocupado por tecido conjuntivo, inicialmente frouxo (15 dias) mas que se tornou adensado ao longo do tempo (45 e 120 dias). No tecido ósseo, defeitos com dimensões pequenas reparam-se com facilidade, sem deixar cicatriz fibrosa (SEAL; OTERO; PANITCH, 2001), mecanismo que não ocorre em defeitos que apresentam dimensões maiores, definidos como defeitos críticos (GONDIM, 2007; HONMA *et al.*, 2008; SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; SCHMITZ *et al.*, 1990). Apenas uma discreta ossificação reparativa e proliferação vascular foram identificadas nas margens do defeito. Em direção à zona central observa-se uma progressiva diminuição no número de vasos formados e ausência de núcleos de mineralização. Resultados semelhantes foram encontrados por Cardoso (2003), Barreto (2006), Barreto (2008) e Rolim (2010), nos quais nos defeitos críticos não preenchidos com biomateriais observou-se uma inviabilidade da reparação espontânea e a formação de cicatriz fibrosa (BARRETO, 2008; BARRETO, 2006; CARDOSO, 2003; ROLIM, 2010). Com isso, estudos experimentais com o objetivo de avaliar o processo de regeneração óssea devem, portanto, apresentar defeitos com determinadas características morfológicas de extensão e espessura suficientes para impedir a regeneração óssea espontânea (GONDIM, 2007).

O emprego desse modelo experimental utilizado, defeitos críticos de 8,5mm na calvária de ratos, foi escolhido como apropriado para avaliação experimental uma vez que na sua presença tem sido observada uma formação óssea reativa limitada às bordas do defeito permanecendo a área central preenchida por tecido conjuntivo. Embora na bioengenharia tecidual, esse modelo seja o definido para estudar regeneração óssea (BRAZ *et al.*, 2003; DUPOIRIEUX *et al.*, 2001; FLECKENSTEIN *et al.*, 2006; SATO; URIST, 1985; SILVA *et al.*, 2005) o tamanho que o caracteriza como crítico é controverso variando de 4mm (MULLIKEN; GLOWACKI, 1980) a 8mm (BARRETO, 2008; CARDOSO *et al.*, 2007; INTINI *et al.*, 2007; MIGUEL *et al.*, 2006; PAULA, 2008; ROLIM, 2010). Tem ainda como vantagens o custo baixo dos animais, a necessidade de um espaço físico pequeno para sua manutenção, a pequena quantidade de material para realizar o estudo piloto e a facilidade técnica de inserção das partículas dos biomateriais no defeito (SAUERESSIG, 2005; SCHMITZ; HOLLINGER, 1986). Esse modelo possibilita ainda investigar a capacidade

osteogênica e a biocompatibilidade dos biomateriais em uma região anatômica pobre em suprimento sanguíneo e em osso medular (BRAZ *et al.*, 2003; DUPOIRIEUX *et al.*, 2001; FLECKENSTEIN *et al.*, 2006; LIM; LEE; YEO, 2000; SILVA *et al.*, 2005).

Os animais utilizados nesse estudo foram machos adultos com o objetivo de minimizar as influências hormonais esperadas na utilização de fêmeas assim como, em função de nos animais adultos, o metabolismo ósseo ser mais lento e estável, diferente dos animais jovens nos quais a neoformação e a remodelação óssea é mais dinâmica para atender as demandas naturais de crescimento esquelético do animal. Acredita-se ainda que as fêmeas sejam mais sensíveis ao ruído, ao cheiro e às variações de temperatura (AUER *et al.*, 2007; ROLIM, 2010).

Um discreto infiltrado inflamatório mononuclear difuso foi observado no grupo controle aos 15 dias e que regrediu ao longo do tempo. Esse mecanismo condiz com o observado no início do reparo devido à lesão tecidual causada pela confecção do defeito ósseo, de forma semelhante a aquela encontrada por Barreto (2006), Paula (2008), Barreto (2008) e Rolim (2010). Durante a confecção do defeito ocorrem rompimentos vasculares, seguido de extravasamento sanguíneo, formação de coágulo, desenvolvimento de inflamações aguda e crônica, liberação de citocinas, fatores de crescimento que atuam ativando ou inibindo a ação dos macrófagos e de outras células envolvidas com a reparação tecidual, como fibroblastos e células inflamatórias (ANDERSON *et al.*, 1999; ANDERSON; RODRIGUES; CHANG, 2008).

Embora a presença de reação inflamatória crônica tenha sido observada em todos os grupos, foi mais acentuada nos grupos onde houve a implantação do biomaterial no defeito (Grupos II, III, IV). No grupo II, com implantação das microesferas de hidroxiapatita, desenvolveu-se uma reação granulomatosa, com presença de macrófagos e células gigantes multinucleadas circundando as microesferas que foi reduzida progressivamente ao longo do tempo, caracterizando uma reação de corpo estranho. Essa reação mostrou-se mais prolongada que em experimentos anteriores, os quais registraram sua permanência, porém por até 15 dias (ANDERSON; RODRIGUES. CHANG, 2008). No grupo III, no qual foi utilizado o selante de fibrina, a inflamação mostrou-se intensa em toda extensão do defeito com a presença de infiltrado inflamatório mononuclear mesmo aos 120 dias. No grupo IV, quando foi associada a utilização do selante de fibrina à hidroxiapatita pode-se observar uma adição entre as características inflamatórias identificadas nos grupos onde os biomateriais foram utilizados

isoladamente, com intensa reação inflamatória mononuclear ao longo de todo defeito e presença de células gigantes multinucleadas, macrófagos e células fusiformes predominando em torno das microesferas.

Dentre estas microesferas, a utilizada em nosso experimento, hidroxiapatita com razão molar Ca/P igual a 1,67 é a que se assemelha ao principal componente presente na fase mineral dos ossos, a mais estudada e aplicada clinicamente (BEST *et al.*, 2008). Uma forma de classificar os biomateriais à base de fosfato de cálcio é através da razão molar Ca/P sendo que, quando essa razão varia de 0,5 a 2,0 configura uma cerâmica biocompatível e osteocondutora. Embora a hidroxiapatita utilizada apresente razão molar de 1,67, não apresentou boa biocompatibilidade e sua atividade osteocondutora foi limitada. É importante a compreensão de que os biomateriais, substitutos ósseos disponíveis, apresentam propriedades osteocondutoras, mas pouca ou nenhuma atividade osteoindutora (GIANNOUDIS; DINOPOULUS; TSIRIDIS, 2005). Devem direcionar a forma geral e a estrutura do tecido a ser substituído, promovendo a adesão celular e subsequente crescimento tecidual permitindo a difusão de nutrientes e células através do seu arcabouço (FLECKENSTEIN *et al.*, 2006; ROSE *et al.*, 2004).

Espera-se que na utilização de biomateriais para regeneração de defeitos críticos, o período de degradação deste coincida com o período de cicatrização natural do osso, ou seja, que o biomaterial funcione como um andaime que não impeça a osteogênese (CHEN *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2008). Os principais fatores que influenciam na velocidade com a qual a reabsorção do biomaterial ocorre são a porosidade, a cristalinidade e a área superficial (GOSAIN *et al.*, 2002) propriedades físicas de um biomaterial. As propriedades químicas referem-se especialmente à composição química, à razão molar cálcio/fosfato, ao grau de impureza elementar e à substituição iônica na estrutura atômica (KARAGEORGIU; KAPLAN, 2005; YANG; DENNISON; ONG, 2005).

Nossos testes *in vivo* puderam demonstrar que os biomateriais utilizados não apresentaram boa biocompatibilidade, induzindo intensa reação inflamatória que influenciou no processo de reparação óssea. Destaca-se com isso a importância de se utilizar testes *in vivo* para avaliação do comportamento *in situ* do biomaterial a ser utilizado. Nestes testes, os biomateriais devem mostrar-se atóxicos, não carcinogênicos, biocompatíveis, induzir baixa resposta inflamatória, possuir propriedades mecânicas semelhantes às do tecido receptor,

velocidade de degradação adequada à regeneração, estimular reações bioquímicas e biológicas favoráveis a sua função (BET *et al.*, 2003; LASKIN, 1982; TEMONOFF; MIKOS, 2000).

A utilização das microesferas nesse experimento reafirmou sua eficiência na contribuição para regeneração tecidual criando espaços triangulares entre suas superfícies que foram preenchidos por células, vasos, fibras colágenas e, próximas às margens do defeito, por matriz ostóide. Essa técnica regenerativa, utilizando biomateriais em forma de microesferas, tem sido recomendada por permitir aumento na velocidade de regeneração tecidual (CHESMEL *et al.*, 1998; MARCACCI *et al.*, 2007). A estrutura das microesferas cerâmicas são favoráveis a neoformação óssea por possibilitar uma maior migração celular, neovascularização, produção de matriz extra-celular, passagem de nutrientes essenciais às atividades celulares, como fatores de crescimento através dos espaços formados entre elas (CHESMEL *et al.*, 1998; MARCACCI *et al.*, 2007) (FIGURA 43).

As formas de apresentação do biomaterial estão relacionados ainda com a sua solubilidade, e na forma de microesferas, a área superficial em contato com fluidos teciduais apresenta-se aumentada contribuindo para sua maior solubilidade. É válido ressaltar que para os materiais cerâmicos e/ou compósitos, o grau de solubilidade resulta também da temperatura de confecção e pode interferir no crescimento celular. As cerâmicas de hidroxiapatita interagem com os fluidos teciduais após sua implantação apresentam degradação, resultando em dissolução dos seus cristais e aumento da concentração local de íons cálcio e fosfato, favorecendo para a precipitação do fosfato de cálcio nos microporos do biomaterial, ocorrendo simultaneamente a neoformação óssea (TAMPIERI *et al.*, 2005).

A dissolução da hidroxiapatita sinterizada depende da pureza e da temperatura de sinterização sendo que a hidroxiapatita sinterizada pura a altas temperaturas, utilizada em nosso experimento, mostra muito menos degradação e é geralmente considerada não-absorvível, embora alguma alteração na superfície já tenha sido relatada. Neste trabalho desde os primeiros tempos biológicos foi observada uma fragmentação das microesferas, porém, estas se mantiveram com o formato de microesferas em função da reação de fibrosa que impediu sua dissolução pelo tecido.

A porosidade tem implicação semelhante determinando maior área de superfície e com isso maior solubilidade. Diversos estudos avaliaram a influência do tamanho das partículas, dos poros e da interconectividade entre os poros, necessários a osteogênese no reparo ósseo (HING; BEST; BONFIELD, 1999; KLENKE *et al.*, 2008; MARCACCI *et al.*, 2007). Esse

tamanho ideal não está bem definido podendo resultar em diversas possibilidades de respostas biológicas influenciadas pela própria característica físico-química do biomaterial. O tamanho dos poros internos e na superfície do biomaterial pode servir de parâmetros para diferenciar as diversas hidroxiapatitas. A forma porosa permite o crescimento de tecido fibrovascular por entre os poros, isso pode ajudar a estabilizar o enxerto e evitar micromovimentações (LONG, 2008). Segundo Gauthier e colaboradores (2001), o espaço necessário para a passagem de células osteoprogenitoras no interior do biomaterial, que permite uma formação de tecido ósseo no seu interior, deve ser de no mínimo 100µm (GAUTHIER *et al.*, 2001).

As microesferas empregadas neste estudo tinham diâmetros de 250 a 425µm, ou seja, de acordo com as dimensões preconizadas pelos estudos descritos na literatura, e superfície porosa o que favorece a adsorção de moléculas mediadoras da sinalização, quimiotaxia e adesão celular de células inflamatórias, angiogênicas e osteogênicas (SOLTAN; SMILER; CHOI, 2009). O tamanho ideal das microesferas recomendado varia de 200 a 500µm sendo que partículas inferiores a 50µm podem induzir citotoxicidade (KLENKE *et al.*, 2008; MENDONÇA, 2005).

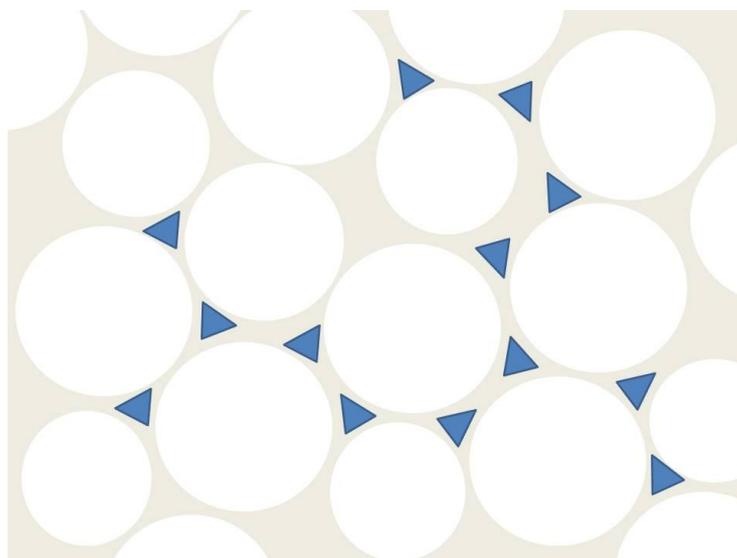


FIGURA 43 – Desenho esquemático do preenchimento do defeito com microesferas (○) resultando na formação de espaços triangulares (▲) que permitem a proliferação vascular, migração celular e formação de matriz osteóide.

Em todos os grupos (I, II, III, IV) observou-se a estabilização do osso neoformado ao longo do tempo com redução gradual na formação óssea reparativa e identificação da presença de osteoblastos que aos 15 dias manifestava característica de atividade. Observa-se uma intensa atividade osteoblástica na secreção de matriz extracelular nas primeiras semanas após a confecção de defeitos independentes da sua dimensão. Porém, em defeitos críticos,

essa atividade é progressivamente reduzida cessando independente da conclusão do reparo ósseo. Adicionalmente, células progenitoras deixam de se diferenciar em osteoblastos por meio de mecanismos ainda não esclarecidos (HONMA, 2008). Atribui-se em parte, que a inflamação desencadeada na confecção do defeito, sendo este crítico ou não, estimula a ação dos osteoblastos assim como a diferenciação de células progenitoras deixem osteoblastos (GORTZ *et al.*, 2004; HONMA, 2008; RIFAS; ARACKAL; WEITAMANN, 2003). Entretanto, a atividade funcional dos osteoblastos e o potencial de células progenitoras em se diferenciar em osteoblastos podem diminuir quando a inflamação é reduzida. Mais estudos são necessários para melhor compreensão de como a inflamação pode regular a atividade funcional dos osteoblastos e a diferenciação das células progenitoras (HONMA, 2008).

Biomateriais à base do fosfato de cálcio possuem propriedades peculiares como semelhança com a composição mineral óssea, capacidade de conduzir a formação de osso resistente na interface biomaterial/osso, osteocondutividade fornecendo um arcabouço apropriado para formação óssea. Portanto, biomateriais a base de fosfato de cálcio são potencialmente úteis na engenharia de tecidos especialmente para a regeneração de tecidos duros (LEGEROS, 2002). Utilizados como materiais de enxerto ósseo são ainda considerados materiais bioativos devido a sua capacidade de participar ativamente no processo de cicatrização e/ou regeneração do tecido ósseo (MURUGAN; HAMAKRISHNA, 2005). Dentre eles a hidroxiapatita é a mais estudada sendo amplamente utilizada nas situações clínicas desfavoráveis a reparação (KAWACHI *et al.*, 2000).

A hidroxiapatita é o constituinte principal da fase mineral dos tecidos calcificados e compõe um biomaterial sintético cerâmico de fosfato de cálcio (LE GUEHENNEC; LAYROLLE; DALCUSI, 2004) sendo esperada na sua presença a formação de osso jovem com intensa atividade de osteoblastos e uma neovascularização mais evidente (BRAZ *et al.*, 2003). Funciona como um suporte para a migração de células osteoprogenitoras permitindo a aposição óssea (DUARTE *et al.*, 2006).

Segundo Kawachi e colaboradores (2000), as cerâmicas de hidroxiapatita são degradadas lentamente *in vivo* e começam a ser reabsorvida em ensaios clínicos, após quatro a cinco anos de sua implantação. Essa é uma das razões de sua limitação pois a absorção é uma propriedade importante do biomaterial, necessária a neoformação óssea (KAWACHI *et al.*, 2000).

Na utilização das microesferas de hidroxiapatita (grupos II e IV) foi observada a presença de acentuado infiltrado inflamatório mononuclear que persiste aos 45 dias sofrendo redução aos 120 dias, mas mantendo-se ainda presente. A presença de células gigantes multinucleadas e macrófagos em torno do biomaterial, assim como uma intensa proliferação de células fusiformes com formação de fibrose espessa que circunscreve separadamente cada microesfera, resultando aos 120 dias, na formação de uma cápsula fibrosa, caracteriza ainda uma reação de corpo estranho. Essa reação não foi identificada em experimentos que utilizaram materiais semelhantes nos quais o biomaterial apresentou-se fragmentado, porém, disperso em toda extensão do defeito (BARRETO, 2006; BARRETO, 2008; PAULA, 2008; ROLIM, 2010). Porém a fragmentação irregular do biomaterial foi identificada acompanhada de reação inflamatória crônica granulomatosa com presença de macrófagos e células gigantes multinuclear em torno das microesferas (BARRETO, 2006; PAULA, 2008). Inúmeros experimentos indicam a hidroxiapatita como substituto ósseo uma vez que se observa uma osteointegração ao tecido sem causar reação inflamatória ou reação de corpo estranho (BRAZ *et al.*, 2003; REZENDE *et al.*, 1998).

A hidroxiapatita utilizada nesse experimento foi caracterizada como de alta cristalinidade e as modificações na cristalinidade e no tamanho dos cristais, induzidas pelo processo de sinterização, podem interferir na propriedade de interação dos biomateriais com o tecido influenciando na adesão, proliferação, diferenciação celular e no metabolismo tecidual (FONSECA, 2007). A alta cristalinidade apresentada pelo biomaterial utilizado pode ter contribuído para a menor formação óssea e pela resposta inflamatória observada, sendo sua solubilidade diminuída e a adesão e proliferação de células pré-osteoblasticas prejudicada.

Estruturas altamente cristalinas, como as utilizadas nesse experimento, são mais resistentes às alterações e à absorção em longo prazo. Yang, Dennison e Ong, em 2005, avaliaram o efeito da cristalinidade de discos de hidroxiapatita na adsorção de proteínas e na adesão de células precursoras de osteoblastos. Observaram que a eliminação de íons fosfato foi menor nos discos de hidroxiapatita com maior cristalinidade justificando que a maior liberação ocorre nas hidroxiapatitas amorfas. Os autores relacionaram também a alta cristalinidade com a baixa taxa de dissolução (YANG; DENNISON; ONG, 2005).

A hidroxiapatita, como biomaterial para regeneração óssea, é amplamente pesquisada no meio científico utilizada isoladamente ou em combinação com outros biomateriais. Zhang e colaboradores (2010) afirmaram que a consolidação de um reparo ósseo de defeito crítico

ocorre 6 meses após a sua confecção, na utilização de um compósito de hidroxiapatita e poliamida (ZHANG *et al.*, 2010). Atuando como substrato para a osteogênese, é classificada como um material osteocondutivo, porém Kurashina e colaboradores (2002) afirmaram apresentar ainda atividade osteoindutora promovendo a formação óssea quando implantadas na musculatura em experimentos com coelhos (KURASHINA *et al.*, 2002).

A hidroxiapatita utilizada neste experimento (grupo II e IV) mostrou-se constituída por material particulado, pouco coeso permitindo, ocasionalmente, a migração de células fusiformes para o seu interior. A propriedade osteocondutora deste biomaterial foi observada uma vez que a formação óssea limitou-se às bordas do defeito em todos os tempos biológico, estendendo-se entre as microesferas localizadas à margem do defeito. Porém na região central, mesmo permanecendo as microesferas no sitio de implantação, nenhuma formação óssea reativa foi observada contrapondo informações acerca do seu potencial osteoindutivo.

Resultados diferentes foram encontrados por Barreto (2006), Paula (2008), Barreto (2008), Rolim (2010) onde toda extensão do defeito foi preenchido pela biomaterial fragmentado e por tecido ósseo neoformado (BARRETO, 2006; BARRETO, 2008; PAULA, 2008; ROLIM, 2010). A formação da cápsula fibrosa em torno das microesferas impediu a sua dispersão pelo defeito e dificultou a penetração de células no seu interior sendo uma das razões para a limitada neoformação óssea observada neste experimento.

Resultados semelhantes foram encontrados por Fella e colaboradores (2007) onde ocorreu a formação de tecido fibroso com presença mais evidente de macrófagos na utilização dos grânulos de menor dimensão, enquanto que a ocorrência de células gigantes foi maior no caso dos grânulos de dimensões intermediárias e grandes. Segundo os autores a resposta inflamatória superior no primeiro caso traz benefícios, pois o processo inflamatório poderia facilitar a migração de células progenitoras para região que poderiam se diferenciar em osteoblastos (FELLAH *et al.*, 2007).

Com função aglutinante o selante de fibrina utilizado neste experimento apresentou efetividade uma vez que, na sua utilização com as microesferas de hidroxiapatita (grupo IV), estas permaneceram no sitio de implantação formando múltiplas camadas. No grupo II, no qual as microesferas foram utilizadas exclusivamente, observou-se uma maior fragmentação destas assim como seu mais frequente deslocamento. A regeneração óssea está condicionada a inúmeros fatores dentre eles a estabilidade mecânica. Como os biomateriais podem ser facilmente deslocados do seu sitio de implantação é importante o uso de agentes aglutinantes

como o selante de fibrina, para a formação de uma rede firme e mecanicamente estável, com boas propriedades adesivas (LE GUEHENNEC; LAYROLLE; DALCUSI, 2004; ROSLINDO; VIOLA; GASPAR, 2007).

A forma de grânulos, pó e microesferas de fosfato de cálcio são difíceis de manter no defeito pela falta de estabilidade estrutural. Para resolver este problema o fosfato de cálcio pode ser misturado com uma ampla gama de polímeros biodegradáveis que são desenvolvidos para serem utilizados como ligantes, incluindo polímeros naturais ou polímeros sintéticos, para evitar sua migração do local de implantação (CHEN *et al.*, 2009).

Na utilização do selante de fibrina em nosso experimento (grupo III e IV) pode-se confirmar a intensa angiogênese logo aos 15 dias, assim como a presença ocasional de tecido de granulação e embora não se observe a formação de novos vasos nos tempos biológicos de 45 e 120 dias, há a permanência dos espaços vasculares. Além das propriedades físicas de adesão, o selante de fibrina possui propriedades biológicas relacionadas à sua contribuição no crescimento de vasos sanguíneos nas áreas do defeito ósseo, na formação de tecido de granulação altamente vascularizado (LE GUEHENNEC; LAYROLLE; DALCUSI, 2004).

Embora relatos apresentados na literatura caracterizem o selante de fibrina como material osteocondutor, funcionando como arcabouços naturais para a fixação e crescimento celular (LE GUEHENNEC; LAYROLLE; DALCUSI, 2004; SCHMOEKEL *et al.*, 2005) nosso experimento permitiu concluir que a neoformação óssea reativa revelou-se muito limitada mesmo nas bordas do defeito, inferior a observada no grupo controle (grupo I), o que indica uma reduzida propriedade osteocondutora e propriedades osteoindutoras ausentes. No grupo III (com implantação do selante de fibrina) todo defeito foi preenchido por um tecido conjuntivo frouxo especialmente na área mais superficial, enquanto na região próxima a dura-máter este tecido se apresentava mais adensado. Resultados semelhantes foram identificados no tecido conjuntivo que permeava as microesferas no grupo IV (com microesferas de hidroxiapatita e selante de fibrina). Pode-se atribuir esse resultado a uma resposta tecidual diante da reação inflamatória desencadeada pelo selante de fibrina que, no defeito, foi depositado sobre a dura-máter, ou seja, na região mais profunda. Apesar desses elementos, os resultados de estudos utilizando o selante de fibrina são bastante controversos.

Estudos anteriores demonstram que a combinação da fibrina e enxerto ósseo autógeno pode aumentar a taxa de osteogênese óssea devido a liberação de inúmeros fatores plaquetários que potencializam o processo de cicatrização, promovem a formação de tecidos

de granulação, além da angiogênese, proliferação de fibroblastos e síntese de matriz extracelular (HUH *et al.*, 2006).

A contribuição para o processo de cicatrização óssea alveolar em ratos foi demonstrado por Carvalho, Bombonato e Bretengani (1997) onde, através de estudo histomorfométrico, observou-se logo na primeira semana formação de um delicado trabeculado ósseo permeado por osteoblastos além de vasos neoformados e do coágulo remanescente. Posteriormente pode-se observar uma neoformação óssea progressiva sendo o alvéolo preenchido por tecido conjuntivo maduro e trabeculado ósseo (CARVALHO; BOMBONATO; BRETENGANI, 1997).

Porém Jarzem e colaboradores (1996) observaram que a sua associação com aloenxertos, em experimentos animais, resultava em uma menor quantidade de osso neoformado do que naqueles com o transplante ósseo sozinho, atribuindo estes resultados a uma reação imunológica entre proteínas humanas e dos animais experimentais (JARZEM *et al.*, 1996).

No entanto, Lucht e colaboradores (1986), demonstraram que o uso do selante de fibrina juntamente com fragmentos ósseos autólogos presentes em tibia de cães não interferiu na cicatrização óssea (LUCHT *et al.*, 1986). Okamoto e colaboradores (1995) demonstraram em estudo sobre regeneração óssea que a presença do selante de fibrina não interferiu na formação do tecido conectivo e ósseo (OKAMOTO *et al.*, 1995).

O fundamento para sua utilização no processo de regeneração óssea tem respaldo no princípio de que os fatores de crescimento plaquetários atuam diretamente, aumentando a proliferação de pré-osteoblastos, e indiretamente, por promover uma maior angiogênese (EPPLEY; WOODSELL; HIGGINS, 2004). Além dos benefícios físicos, a fibrina também acelera o processo de cicatrização óssea do enxerto, pela presença de numerosos diferentes fatores de crescimento liberados após a ativação do material (HUH *et al.*, 2006).

A avaliação prospectiva da cicatrização óssea induzida pelo uso isolado do selante de fibrina é pouco explorada (CORREA, 2005), havendo um número limitado de biópsias realizadas para investigar a osteointegração do biomaterial (LE GUEHENNEC; LAYROLLE; DALCUSI, 2004). A maioria dos resultados positivos observados com a utilização do selante de fibrina foi em ensaios clínicos com humanos (LE GUEHENNEC; LAYROLLE;

DALCUSI, 2004). Nestes, o selante de fibrina tem demonstrado boa tolerabilidade e poucos casos de eventos adversos foram relatados (ALVING *et al.*, 1995; DUNN; GOA, 1999).

Os resultados observados da associação entre microesferas de hidroxiapatita e selante de fibrina em nosso experimento foram uma reação inflamatória intensa com presença de intenso infiltrado inflamatório e reação granulomatosa que persiste até os 120 dias, contribuindo para o retardo na formação óssea inclusive nas bordas do defeito. Porém, experimentos descritos na literatura afirmam que essa associação poderia desenvolver um biomaterial com aplicações clínicas como substitutos do osso sendo as propriedades físicas, químicas e biológicas de ambas acumuladas para preparação de substitutos ósseos avançados (LE GUEHENNEC; LAYROLLE; DALCUSI, 2004). Por meio de avaliação clínica e histológica, Daculsi e colaboradores (1992) observaram resultados positivos na implantação de fosfato de cálcio e selante de fibrina em defeitos ósseos em modelo experimental animal e ensaios clínicos (DACULSI *et al.*, 1992). Adicionalmente, em estudo experimental animal, utilizando fibrina sintética e fibrina natural pode-se concluir que a reabsorção do material biocerâmico e a reconstrução óssea ocorreu de maneira similar nos dois grupos avaliados (JEGOUX *et al.*, 2005). Essa associação entre grânulos de fosfato de cálcio e fibrina tem sido amplamente utilizada por cirurgiões para que o material se torne mais facilmente manipulável auxiliando na cimentação dos grânulos nos locais de implantação. Além de gerar um composto mecanicamente mais fácil de trabalhar sugere-se que a mistura contribui para processos de regeneração (JEGOUX *et al.*, 2005).

Embora o selante de fibrina tenha desenvolvido uma intensa reação inflamatória, a reação imunológica no nosso experimento ocorreu moderadamente não sendo atribuída a essa reação os efeitos negativos observados. Em ensaios clínicos, mais do que em estudos experimentais em animais, resultados favoráveis podem ser esperados, pois menor reação imunológica é observada em função da utilização da fibrina com componentes humanos (LE GUEHENNEC; LAYROLLE; DALCUSI, 2004).

Porém, Carmagnola e colaboradores (2000, 2002) observaram que uma combinação entre os biomateriais selante de fibrina e a cerâmica tem efeitos negativos na osteogênese. Esses experimentos foram conduzidos em espécies animais utilizando selantes de fibrina de origem humana, sendo o resultado obtido atribuído a possíveis reações imunológicas que podem comprometer a migração de células osteoprogenitores (CARMAGNOLA *et al.*, 2000).

Nossos resultados permitiram concluir que o selante de fibrina interferiu negativamente na reparação óssea uma vez que, quando da sua utilização, a formação óssea mesmo nas bordas do defeito mostrou-se muito limitada e até mesmo, em alguns animais, ausente. Resultados similares foram obtidos por Albrektsson e colaboradores (1982) que relataram efeitos negativos na utilização do selante de fibrina sobre a cicatrização óssea. Utilizando um modelo animal, mostraram não haver formação de tecido ósseo nem contribuição na cicatrização óssea (ALBREKTSSON *et al.*, 1982). De forma semelhante Cunin e colaboradores (2000) observaram menor neoformação óssea na utilização da fibrina atribuída à limitada infiltração de células osteoprogenitoras observadas na cavidade do defeito (CUNIN *et al.*, 2000).

A cicatrização óssea continua a ser um grande desafio para pesquisadores e clínicos (FINDIKCIOGLU *et al.*, 2009) sendo necessário o desenvolvimento de pesquisas com biomateriais que possam contribuir para a regeneração óssea. No modelo experimental utilizado nesse experimento, a hidroxiapatita desenvolveu intensa reação inflamatória o que pode ter resultado na limitada neoformação óssea reparativa observada na sua utilização. O selante de fibrina desenvolveu uma reação inflamatória ainda mais intensa, resultando em formação óssea reparativa ainda menor e em alguns casos ausente, porém, sua eficiência como agente aglutinante foi constatada.

7. CONCLUSÕES

Conclui-se que:

- As microesferas de hidroxiapatita utilizadas mostraram limitada propriedade osteocondutora;
- As microesferas de hidroxiapatita apresentaram pouca biocompatibilidade e induziram reação de corpo estranho;
- O selante de fibrina não promoveu a regeneração óssea, entretanto atuou como agente aglutinante das microesferas de hidroxiapatita;
- O selante de fibrina potencializa a formação vascular assim como, uma reação inflamatória crônica intensa;

REFERÊNCIAS

AARDEN, E.M.; BURGER, E.H.; NIJWEIDE, P.J. Function of osteocytes in bone. **J Cell Biochem**, Nova York, v.55, n.3, p.287-299, jul. 1994.

AHMED, T.A.E.; DARE, A.V.; HINCKE, M. Fibrin: A Versatile Scaffold for Tissue Engineering Applications. **Tissue Eng Part B Rev**, Nova York, v.14, n.2, p.199-215, jun. 2008.

ALBREKTSSON, T. et al. Fibrin adhesive system (FAS) influence on bone healing rate. A microradiographical evaluation using the bone growth chamber. **Acta Orthop Scand**, Copenhagen, v.53, n.5, p.757-763, oct. 1982.

ALVING, B. et al. Fibrin sealant: summary of a conference on characteristics and clinical uses. **Transfusion**, Filadelfia, v.35, n.9, p.783-790, sep. 1995.

ALSBERG, E. et al. Engineering growing tissues. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v.99, n.19, p.12025-12030, sep. 2002.

ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. **Semin Immunol**, Filadelfia, v.20, n.2, p.86-100, apr. 2008.

ANDERSON, M. L. et al. Critical size defect in the goat's os ilium. A model to evaluate bone grafts and substitutes. **Clin Orthop Relat Res**, Nova York, n.364, p.231-239, jul. 1999.

ANDRADE, A.D. et al. Biologia óssea: uma revisão da literatura. **Rev ImplantNews**, São Paulo, v.4, n.6, p.659-662, 2007.

ANDRADE, L.R. Biomateriais utilizados em Bioengenharia ortopédica. **Estud Biol**, Paraná, v.28, n.63, p.17-23, abr/jun. 2006.

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, Guildford, v.21, n.7, p.667-681, apr. 2000.

AUER, J.A. et al. Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use. **BMC Musculoskelet Disord**, London, v. 8, p.1-13, aug. 2007.

BARBANTI, S.H.; ZAVAGLIA, C.A.C.; DUEK, E.A.R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros**, São Carlos, v.15, n.1, p.13-21, 2005.

BARRETO, E.C. **Avaliação in vivo do reparo de defeito ósseo com biomaterial do tipo microesferas cerâmicas**. 2006. 103f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Odontologia, Salvador, 2006.

BARRETO, I.C. **Utilização de microesferas de hidroxiapatita no reparo de defeitos críticos em calvária de ratos**. 2008. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro; Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Odontologia, Salvador, 2008.

BARRIAS, C.C. et al. Effect of calcium phosphate addition to alginate microspheres: modulation of enzyme release kinetics and improvement of cell adhesion. **Key Eng Mater**, Stafa-Zurich, v.284-286, p.689-692, apr. 2005.

BAUER, T.; MUSCHLER, G.F. **Bone graft materials**: an overview of the basic science. **Clin Orthop Relat Res**, Nova York, v.371, p.10-27, feb. 2000.

BECKER, W. et al. Variations in bone regeneration adjacent to implants augmented with barriers membranes alone or with demineralized freeze-dried bone or autologous grafts: a study in dogs. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lombard, v.10, n.2, p.143-154, mar/apr. 1995.

BET, M.R. et al. Cell adhesion and cytotoxicity studies over polyanionic collagen surfaces with variable negative charge and wettability. **Biomaterials**, Guildford, v.24, n.1, p.131-137, jan. 2003.

BEST, S.M. et al. Bioceramics: Past, present and for the future. **J Eur Ceramic Society**, Amsterdam, v.28, n.7, p.1319-1327, 2008.

BONASSAR, L.J.; VACANTI, C.A. Tissue Engineering: The First Decade and Beyond. **J Cell Biochem Suppl**, Nova York, v.30/31, p.297-303, 1998.

BORD, S. et al. Production of collagenase by human osteoblast and osteoclast in vivo. **Bone**, Nova York, v.19, n.1, p.35-40, jul. 1996.

BRAZ, F. et al. Emprego de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita no reparo de defeito induzido em crânio de ratos. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v.18, n.1, p.19-24, jan/fev. 2003.

BROWN, G.D. et al. Hydroxyapatite cement implant for regeneration of periodontal osseous defects in humans. **J Periodontol**, Indianapolis, v.69, n.2, p.146-157, fev. 1998.

BURCHARDT, H. The Biology of Bone Graft Repair. **Clin Orthop Relat Res**, Nova York, v.174, p.28-42, apr. 1983.

BURG, K.J.L.; PORTER, S.; KELLAM, J.F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**, Guildford, v.21, n.23, p.2347-2359, dec. 2000.

CANCEDDA, R. et al. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. **Matrix Biol**, Stuttgart, v.22, n.1, p.81-91, mar. 2003.

CARDOSO, A.K.M.V. **Análise histomorfológica da implantação de biovidros em defeito crítico criado em calvária de rato**. 2003. 130f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Odontologia, Salvador, 2003.

CARDOSO, M.J.L. et al. Homeostase do cálcio e marcadores do metabolismo ósseo no hipertireoidismo felino – revisão. **Arch Veter Sci**, Paraná, v.12, n.1, p.17-27, 2007.

CARMAGNOLA, D. et al. Bone healing around implants placed in a jaw defect augmented with Bio-Oss®. An experimental study in dogs. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v.27, n.11, p.799-805, nov. 2000.

CARVALHO, T.L.L.; BOMBONATO, K.F.; BRETENGANI, L.G. Histometric analysis of rat alveolar wound healing. **Braz Dent J**, Riberão Preto, v.8, n.1, p.9-12, jan/jun. 1997.

CARVALHO, P.S.P.; BASSI, A.P.F.; VIOLIN, L.A. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais. **Rev ImplantNews**, São Paulo, v.1, n.3, p.255-259, jan/jun.2004.

CHAN, S.M.; BOISJOLY, H. Advances in the use of adhesives in ophthalmology. **Curr Opin Ophthalmol**, Filadelfia, v.15, n.4, p.305-310, aug. 2004.

CHEN, K.Y. et al. Reconstruction of calvarial defect using a tricalcium phosphate-oligomeric proanthocyanidins cross-linked gelatin composite. **Biomaterials**, Guildford, v.30, n.9, p.1682-1688, mar. 2009.

CHEMEL, K.D. et al. Healing response to various forms of human demineralized bone matrix in athymic rat cranial defects. **J Oral Maxillofac Surg**, Filadelfia, v.56, n.7, p.857-863, jul. 1998.

CORREA, B.S.; BICAS, H.E.A. Estudo sobre a aplicabilidade de adesivos biológicos à reinserção de músculo ocular externo em coelhos – I Experimento I - Medidas dos tempos dos procedimentos, das forças de adesão mioescleral e estudos clínico e histopatológico. **Arq Bras Oftalmol**, São Paulo, v.68, n.5, p.599-607, jul. 2005.

CORREA, M.E.P. **Adesivos de fibrina: avaliação clínica e experimental**. 2005. 137f. Tese (Doutorado em Clínica Médica) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, 2005.

COSTA, R.C.C.; MIGUEL, F.B.; ROSA, F.P. Estratégias de bioengenharia tecidual na reconstrução óssea. **Rev Cienc Med Biol**, Salvador, v.4, n.1, p.70-76, jan/apr. 2005.

CUNIN, G. et al. Experimental vertebroplasty using osteoconductive granular materials. **Spine**, Paris v.25, n.9, p.1070-1076, may. 2000.

DACULSI, G. et al. Macroporous biphasic calcium phosphate efficiency in mastoid cavity obliteration: experimental and clinical findings. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, St. Louis, v.1001, n.8, p.669-674, aug. 1992.

DELACURE, M. Physiology of bone healing and bone grafts. **Otolaryngol Clin North Am**, Filadelfia, v.27, n.5, p.859-874, oct. 1994.

DOROZHUKIN, S.V. Bioceramics of calcium orthophosphates. **Biomaterials**, Guildford, v.31, n.7, p.1465-1485, mar. 2009.

DOURADO, E. R. **Preparação e caracterização de hidroxiapatita nanoestruturada dopada com estrôncio**. 2006. 128f. Dissertação (Mestrado) - Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, Rio de Janeiro, 2006.

DUARTE, T.S et al. Osteointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães: aspectos histológicos. **Arq Bras Med Vet Zootec**, Belo Horizonte, v.58, n.5, p.849-853, out. 2006.

DUCHEYNE, P.; QIU, Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. **Biomaterials**, Guildford, v.20, n.23/24, p.2287-2303, dec. 1999.

DUNN, C.; GOA, K. Fibrin sealant: a review of its use in surgery and endoscopy. **Drugs**, Nova York, v.58. n.5, p.863-886, nov. 1999.

DUPOIRIEUX, L. et al. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. **Int J Oral Maxillofac Surg**, Filadelfia, v.30, n.1, p.58-62, feb. 2001.

EPPLEY, B.L.; WOODSELL, J.E.; HIGGINS, J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. **Plast Reconstr Surg**, Dallas, v.114, n.6, p.1502-1508, nov. 2004.

FELLAH, B.H. et al. Inflammatory reaction in rats muscle after implantation of biphasic calcium phosphate micro particles. **J Mater Sci Mater Med**, London, v.18, n.2, p.287-294, feb. 2007.

FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL, I. et al. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, Valencia, v.11, n.1, p.E47-51, jan. 2006.

FILVAROFF, E.H. VEGF and bone. **J Musculoskel Neuron Interact**, Athens, v.3, n.4, p.304-307, aug. 2003.

FINDIKCIOGLU, K. et al. Effect of Platelet-Rich Plasma and Fibrin Glue on Healing of Critical-Size Calvarial Bone Defects. **J Craniofac Surg**, Boston, v.20, n.1, p.34-40, jan. 2009.

FLECKENSTEIN, K.B. et al. Effect of a hydroxyapatite tricalcium phosphate alloplast on osseous repair in the rat calvarium. **J.Periodontol**, Indianapolis, v.77, n.1, p.39-45, jan. 2006.

FONSECA, F. M. **Biocerâmicas Porosas Bifásicas e trifásicas à base de hidroxiapatita produzidas por Gelcasting**. 2007. 102p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Biomateriais) – Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2007.

GAROFALO, G.S. Autogenous, allogenic and xenogenic grafts for maxillary sinus elevation: literature review, current status and prospects. **Minerva Stomatol**, Torino, v.56, n.7-8, p.373-392, jul/aug. 2007.

GAUTHIER, O. et al. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics versus injectable bone substitute: a comparative study 3 and 8 weeks after implantation in rabbit bone. **J Mater Sci Mater Med**, London, v.12, n.5, p.385-390, may. 2001.

GIANNOUDIS, P.V.; DINOPOULUS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: An update. **Injury**, Bristol, v.36, n.3, p.S20-S27, nov. 2005.

GONDIM, A.L.M. **Efeito da laserterapia na biomodulação da osteogênese em defeitos críticos confeccionados em calota craniana de ratos**. 2007. 117f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Porto Alegre, 2007.

GORTZ, B. et al. Arthritis induces lymphocytic bone marrow inflammation and endosteal bone formation. **J Bone Miner Res**, Nova York, v.19, n.6, p.990–998, jun. 2004.

GOSAIN A.K. et al. A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part I. **Plast Reconstr Surg**, Dallas, v.109, n.2, p.619-630, feb. 2002.

GUIMARÃES, S. C. **A patologia básica da cavidade bucal**. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1982.

HADJIDAKIS, D.J.; ANDROULAKIS, I.I. Bone remodeling. **Ann N Y Acad Sci**, Nova York, v.1092, p.385-396, dec. 2006.

HING, K.A. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? **Philos Transact A Math Phys Eng Sci**, Londres, v.362, n.1825, p.2821-2850, dez. 2004.

HING, K.A.; BEST, S.M.; BONFIELD, W. Characterization of porous hydroxyapatite. **J Mater Sci Mater Med**, London, v.10, n.3, p.135-145, mar. 1999.

HONMA, T. et al. Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. **Oral Dis**, Houndmills, v.14, n.5, p.457-464, jul. 2008.

HUH, J.Y. et al. The effect of platelet-enriched fibrin glue on bone regeneration in autogenous bone grafts. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v.101, n.4, p.426-431, abr. 2006.

INTINI, G. et al. A comparative analysis of bone formation induced by human demineralized freeze-dried bone and enamel matrix derivative in rat calvaria critical-size bone defects. **J Periodontol**, Indianapolis, v.79, p.1217-1224, jul. 2008.

JARZEM, P. et al. The effect of fibrin sealant on spinal fusions using allograft in dogs. **Spine**, Paris, v.21, n.11, p.1307-1312, jun. 1996.

JEGOUX, J. et al. In vivo biological performance of composites combining micro–macroporous biphasic calcium phosphate granules and fibrin sealant. **Arch Orthop Trauma Surg**, Berlim, v.125, n.3, p.153-159, 2005.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KAIGLER, D.; MOONEY, D. Tissue engineering's impact on dentistry. **J Dent Educ**, Washington, v.65, n.5, p.456-462, jan. 2001.

KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial *scaffolds* and osteogenesis. **Biomaterials**, Guildford, v.26, n.27, p.5474-91, sep. 2005.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral**. 2.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004.

KAWACHI, E.Y. et al. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Quim Nova**, São Paulo, v.23, n.1, p.518-522, 2000.

KLENKE, F.M. et al. Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo. **J Biomed Mater Res A**, Hoboken v.85, n.3, p.777-786, jun. 2008.

KURASHINA, K. et al. Ectopic osteogenesis with bifasic ceramics of hydroxyapatite and tricalcium phosphate in rabbits. **Biomaterials**, Guildford, v.23, n.2, p.407-412, jan. 2002.

LANGER, R S.; VACANTI, J. P. Tissue engineering: the challenges ahead. **Sci Am**, Nova York, v.280, n.4, p.86-89, apr. 1999.

LASKIN, D.M. State of the art alveolar ridge augmentation. **Compend Contin Educ Dent**, Jamesburg, n.2, p.546-548, 1982.

LEGEROS, R.Z. Properties of Osteoconductive Biomaterials: Calcium Phosphates. **Clin Orthop Relat Res**, Nova York, v.395, p.81-98, feb. 2002.

LE GUEHENNEC, L.; LAYROLLE, P.; DALCUSI, G. A review of bioceramics and fibrin sealant. **Eur Cell Mat**, Glasgow, v.8, p.1-11, sep. 2004

LEMPERLE, S.M. et al. Comparison of protected bone regeneration, osteoconduction with coralline hydroxyapatite implants, and cancellous bone autografts in large cranial and mandibular defects in dogs. **Plastic Reconstr Surg**, Dallas, v.101, n.3, p.660-672, mar. 1996.

LIM, S.C.; LEE, M.J.; YEO, H.H. Effects of various implant materials on regeneration of calvarial defects in rats. **Pathol Int**, Tokyo, v.50, n.8, p.594-602, aug. 2000.

LONG, P.H. Medical Devices in Orthopedic Applications. **Toxicol Pathol**, Lawrence, v.36, n.1, p.85-91, 2008.

LUCHT, U. et al. Fibrin sealant in bone transplantation. No effects on blood flow and bone formation in dogs. **Acta Orthop Scand**, Copenhagen, v.57, n.1, p.19-24, feb. 1986.

LYNCH, S.E.; GENKO, R.; MARX, R. Tissue engineering application in maxillofacial surgery and periodontics. **Quintessence**, v.5, p.93-112, jan. 1999.

LYSAGHT, M.J.; NGUY, N.A.; SULLIVAN, K. An economic survey of the emerging tissue engineering industry. **Tissue Eng**, Nova York, v.4, n.3, p.231-238, 1998.

MARCANTONIO JUNIOR, E.; MARCANTONIO, R. A. C.; CIRELLI, J. A. **Atualização em periodontia e implantodontia**. 1 ed. São Paulo: Artes Médicas, 1999.

MARCACCI, M. et al. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. **Tissue Eng**, Nova York, v.13, n.5, p.947-955, may. 2007.

MARINI, E. et al. Morphological investigations on bone formation in hydroxyapatite-fibrin implants in human maxillary and mandibular bone. **Cell Mater**, v.4, n.3, p.231-246, 1994.

MARTIN, R.I.; BROWN, P.W. Aqueous formation of hydroxyapatite. **J Biomed Mater Res**, Hoboken, v.35, n.3, p.299-308, jun. 1997.

MATRAS, H. The use of Fibrin Sealant in Oral and Maxillofacial Surgery. **J Oral Maxillofac Surg**, Filadelfia, v.40, p.617-622, oct. 1982.

MEGHJI, S. Bone remodeling. **Br Dent J**, London, v.172, n.6, p.235-242, mar. 1992.

MENDONÇA, T.A. **Caracterização físico-química e análise histológica do potencial osteocondutor de diferentes implantes xenogênicos no reparo de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de ratos (*Rattus norvegicus*)**. 2005. 110f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) –Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru, Bauru, 2005.

MIGUEL, F.B. et al. Morphological assessment of the behavior of three-dimensional anionic collagen matrices in bone regeneration in rats. **J Biomed Mater Res**, Hoboken, v.78, n.2, p.334-339, aug. 2006.

MISCH, C.E.; DIETSH, F. Bone-grafting materials in implant dentistry. **Implant Dent**, Baltimore, v.2, n.3, p.158-167, 1993.

MOSHER, D.F.; SCHAD, P.E. Cross linking of fibronectin to collagen by blood coagulation Factor XIIIa. **J Clin Invest**, Nova York, v.64, n.3, p.781-787, sep. 1979.

MULLIKEN, J.B.; GLOWACKI, J. Induced Osteogenesis for Repair and Construction in the Craniofacial Region. **Plast Reconstr Surg**, Dallas, v.65, n.5, p.553-59, may. 1980.

MURUGAN, R.; RAMAKRISHNA, S. Development of nanocomposites for bone grafting. **Compos Sci Technol**, v.65, n.15-16, p.2385-2406, dec. 2005.

NAKAMURA, K.; KOSHINO, T.; SAITO, T. Osteogenic response of the rabbit femur to a Hydroxyapatite thermal decomposition product fibrin sealant mixture. **Biomaterials**, Guildford, v.19, n.20, p.1901-1907, oct. 1998.

NIHOUANNEN, D.L. et al. Micro-architecture of calcium phosphate granules and fibrin glue composites for bone tissue engineering. **Biomaterials**, Guildford, v.27, n.13, p.2716-2722, may. 2006.

OKAMOTO, T. et al. Osseous regeneration in the presence of fibrin adhesive material (Tissucol) and epsilon-aminocaproic acid (EACA). **Braz Dent J**, Riberão Preto, v.6, n.2, p.77-83, 1995.

O'KEEFE, R.J. et al. COX-2 has a Critical Role During Incorporation of Structural Bone Allografts. **Ann N Y Acad Sci**, Nova York, v.1068, n.1, p.532-542, apr. 2006.

OONISHI, H. et al. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. **Clin Orthop Related Res**, Nova York, n.334, p.316-325, jan. 1997.

OSATHANON, T. et al. Microporous nanofibrous fibrin-based scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, Guildford, v.29, n.30, p.4091-4099, oct. 2008.

PATEL, N. et al. In vivo assessment of hydroxyapatite and silicate-substituted hydroxyapatite granules using an ovine defect model. **J Mater Sci Mater Med**, London, v.16, n.5, p.429-440, may. 2005.

PAULA, F. L. **Avaliação in vivo um compósito de hidroxiapatita e alginato no reparo ósseo**. 2008. 98f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Odontologia, Salvador, 2008.

PETERSON, L.J. et al. **Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003.

PINHEIRO, A.L. et al. Effect of low level laser therapy on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone. **Braz Dent J**, Riberão Preto, v.14, n.3, p.177-181, 2004.

POSPISILOVÁ, J. Healing of wounds. **Acta Chir Plast**, Praha, v.24, n.4, p.293-303, 1982.

RADOSEVICH, M.; GOUBRAN, H.; BURNOUF, T. Fibrin sealant: scientific rationale, production methods, properties and current clinical use. **Vox Sang**, Basel, v.72, n.3, p.133-143, 1997.

REZENDE, C.M.F. et al. Aspectos clínico-cirúrgicos e radiográficos da hidroxiapatita sintética na diáfise proximal da tíbia de cães. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.50, n.5, p.537-545, 1998.

RIBEIRO, C.C.; BARRIAS, C.C.; BARBOSA, M.A. Preparation and Characterisation of Calcium-Phosphate Porous Microspheres with a Uniform Size for Biomedical Applications. **J Mater Sci Mater Med**, London, v.17, n.5, p.455-463, may. 2006.

RIFAS, L.; ARACKAL, S.; WEITAMANN, N. Inflammatory T cells rapidly induce differentiation of human bone marrow stromal cells into mature osteoblasts. **J Cell Biochem**, Nova York, v.88, n.4, p.650-659, mar. 2003.

RIMINUCCI, M.; BIANCO, P. Building bone tissue: matrices and scaffolds in physiology and biotechnology. **Braz J Med Biol Res**, Riberão Preto, v.36, n.8, p.1027-1036, aug. 2003.

ROACH, H.I. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralization and resorption. **Cell Biol Int**, London, v.18, n.6, p.617-628, jun. 1994.

ROBBINS, S. et al. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000.

ROLIM, A.E.H. **Avaliação de microesferas de hidroxiapatita, dopadas ou não com estrôncio, no reparo de defeito crítico, em calvária de rato**. 2010. 91f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Odontologia, Salvador, 2010.

ROODMAN, G.D. Cell biology of the osteoclast. **Exp Hematol**, v. 27, n. 8, p. 1229-1241, aug. 1999.

ROSA, A.L.; SHAREEF, M.H.; NOORT, R.V. Efeito das condições de preparação e sinterização sobre a porosidade da hidroxiapatita. **Pesqui Odontol Bras**, São Paulo, v.14, n.3, p.273-277, jul./set. 2000.

ROSCHGER, P. et al. Bone mineralization density distribution in health and disease. **Bone**, Nova York, v.42, n.3, p.456-466, mar. 2008.

ROSE, F.R. et al. In vitro assessment of cell penetration into porous hydroxyapatite scaffolds with a central aligned channel. **Biomaterials**, Guildford, v.25, n.24, p.5507-5514, nov. 2004.

ROSLINDO, E.B.; VIOLA, N.V.; GASPAR, A.M.M. Effects of fibrin sealer and resorbable gelatin on the repair of osseous defects in rat tibia. **Braz Oral Res**, São Paulo, v.21, n.3, p.222-227, jul./sep. 2007.

ROUSOU, J. et al. Randomized clinical trial of fibrin sealant in patients undergoing re sternotomy or reoperation after cardiac operations. A multicenter study. **J Thorac Cardiovasc Surg**, St. Louis, v.97, n.2, p.194-203, feb. 1989.

SATO, K.; URIST, M.R. Induced regeneration of calvaria by bone morphogenetic protein (BMP) in dogs. **Clin Orthop**, v. 197, p. 301-311, jul/aug,1985.

SALGADO, J. F. M. **Avaliação da velocidade do processo de regeneração óssea primária, conjugando, a técnica de regeneração óssea guiada com membrana de colágeno aniônico e terapia laser baixa potência**. 2002. 117 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2002.

SAUERESSIG, F. **Avaliação Microscópica do Processo de Reparo Ósseo na Presença de Enxerto Ósseo Humano Liofilizado Mineralizado e Desmineralizado e Membrana de Cortical Bovina em Calota Craniana de Ratos**. 2005. 122f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia da Pontifícia, Porto Alegre, 2005

SCHMITZ, J.; HOLLINGER, J.O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clin Orthop Relat Res**, Nova York, v.205, p.299-308, apr. 1986.

SCHMITZ, J.P. et al. Characterization of rat calvarial nonunion defects. **Acta Anat**, v. 138, n. 3, p. 185–192, 1990.

SCHMOEKEL, H.G. et al. Bone repair with a form of BMP-2 engineered for incorporation into fibrin cell ingrowth matrices. **Biotechnol Bioeng**, Nova York, v.89, n.3, p.253–262, feb. 2005.

SEAL, B.L.; OTERO, T.C.; PANITCH, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **Mater Sci Eng**, v.34, n.4-5, p.147-230, oct. 2001.

SENA, L. A. **Produção e caracterização de compósitos hidroxiapatita-colágeno para aplicações biomédicas**. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia metalúrgica e de materiais) – Universidade Federal da Bahia, Rio de Janeiro, 2004.

SILVA, R.V. et al. The use of hydroxyapatite and autogenous cancellous bone grafts to repair bone defects in rats. **Int J Oral Maxillofac Surg**, Filadelfia, v.34, n.2, p.78-184, mar. 2005.

SIKAVITSAS, V.I.; TEMENOFF, J.S.; MIKOS, A.G. Biomaterials and Bone Mechanotransduction. **Biomaterials**, Guildford, v.22, n.19, p.2581-2593, oct. 2001.

SIVAKUMAR, M.; RAO, K.P. Preparation, Characterization and In Vitro Release of Gentamicin from Coralline Hydroxyapatite-Gelatin Composite Microspheres. **Biomaterials**, Guildford, v.23, n.15, p.3175-3181, aug. 2002.

SOLTAN, M.; SMILER, D.; CHOI, J.H. Bone Marrow: Orchestrated cells, cytokines and growth factors for bone regeneration. **Implant Dent**, Baltimore, v.18, n.2, p.132-141, apr. 2009.

STEVENS, M.M.; GEORGE, J.H. Exploring and Engineering the Cell Surface Interface. **Science**, Washington, v.310, n.18, p.1135-1138, nov. 2005.

SUH, H. et al. A bone replaceable artificial bone substitute: osteoinduction by combining with bone inducing agent. **Artif Organs**, Cleveland, v.25, n.6, p.459-466, jun. 2001.

TAMPIERI, A. et al. Porosity-graded hydroxyapatite ceramics to replace natural bone. **Biomaterials**, Guildford, v.22, n.11, p.1365-1370, jun. 2001.

TEMENOFF, J.S.; MIKOS, A.G. Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering. **Biomaterials**, Guildford, v.21, n.23, p.2405-2412, 2000.

TEIXEIRA, L.J. C. **Potencial osteocondutor de grânulos de hidroxiapatita em defeitos críticos na calvária de ratos**. 2009. 73f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, 2009.

TURNER, C.H. Homeostatic control of bone structure: An application of feedback theory. **Bone**, Nova York, v.12, n.3, p.203-207, 1991.

UEDA, M. et al. Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery. **Mater Sci Eng**, v.13, n.1-2, p.7-14, 2000.

UEMURA, T. et al. Transplantation of cultured bone cells using combinations of scaffolds and culture techniques. **Biomaterials**, Guildford, v.24, n.13, p.2277-2286, jun. 2003.

URIST, M.R., DELANGE, R.J., FINERMAN, G.A.M. Bone cell differentiation and growth factors. **Science**, Washington, v.220, n.4598, p.680-685, may. 1983.

VERNA, C. et al. Healing patterns in calvarial bone defects following guided bone regeneration in rats. A micro-CT scan analysis. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v.29, n.9, p.865-870, sep. 2002.

VERONEZE, M. H. **Influência da suplementação de cálcio sobre os níveis e os indicadores da exposição ao chumbo em mulheres pós-menopausa**. 2008. 129f. Tese (Doutorado em Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

YANG, Y.; DENNISON, D.; ONG, J.L. Protein adsorption and osteoblast precursor cell attachment to hydroxyapatite of different crystallinities. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lomabrd, v.20, n.2, p.187-192, mar./apr., 2005.

YU, D. et al. Bone regeneration of critical calvarial defect in goat model by PLGA/TCP/rhBMP-2 scaffolds prepared by low-temperature rapid-prototyping technology. **Int J Oral Maxillofac Surg**, Filadelfia, v.37, n.10, p.929-934, oct. 2008.

ZHANG, Y.F. et al. Three-dimensional Nanohydroxyapatite/Chitosan Scaffolds as Potential Tissue Engineered Periodontal Tissue. **J Biomater Appl**, Lancaster, v.21, n.4, p.333-349, apr. 2007.

ZÉTOLA, A. L. **Análise comparativa entre o enxerto alógeno e o autógeno para a reconstrução das fendas alveolares dos pacientes fissurados**. 2002. 125f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

WAN, D.C., NACAMULI, R.P., LONGAKER, M.T. Craniofacial bone tissue engineering. **Dent Clin North Am**, Filadelfia, v.50, n.2, p.175-190, apr. 2006.

WANG, Y. et al. Oxygen sensing and osteogenesis. **Ann N Y Acad Sci**, Nova York, v.1117, p.1-11, nov. 2007.

WHITE, E.; SHORS, E. C. Reconstructive implant surgery and implant prosthodontics I. Biomaterial aspects of Interpore-200 porous hydroxyapatite. **Dent Clin North Am**, Filadelfia, v.30, p.49-67, 1986.

WITTKAMPF, A. R. Fibrin sealant as sealant for hydroxyapatite granules. **J Craniofac Surg**, Boston, v.17, p.179-181, 1989.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) (Protocolo nº003-09 CEUA UEFS).



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
Av. Universitária, S/N - Módulo I - 44.031-460 - Feira de Santana -Ba -
Fone: (75) 3224-8398

Feira de Santana, 26 de agosto de 2009.

PARECER

O projeto Nº 003/2009, "AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA, RADIOGRÁFICA E BIOQUÍMICA DA UTILIZAÇÃO DE MICROESFERAS DE HIDROXIAPATITA NO REPARO DE DEFEITO CRÍTICO EM CALVÁRIA DE RATO", de autoria dos estudantes: Ana Clara Alves de Carvalho, Isabela Cerqueira Barreto, Luciana Soares de Almeida Freitas Oliveira e Marion Alves do Nascimento, sob a orientação dos professores Dr. Aryon de Almeida Barbosa Junior e Dra. Fabiana Paim Rosa, incluiu na versão final as modificações e correções encaminhados pelo parecerista (1º e 2º pareceres), as quais foram aceitas pela autora no Item Objetivo Geral e no Formulário do Protocolo Experimental.

Diante do exposto, sou **favorável** à execução do projeto, conforme reunião de conselho do CEUA/UEFS do dia 26 Agosto de 2009.


Prof. Dra. Ana Cerilza Santana Melo
Coordenadora do CEUA/UEFS

Port. 497/2008

Prof.ª Dr.ª Ana Cerilza Santana Melo
Coordenadora do CEUA
Comitê de Ética no Uso de Animais
CEUA/UEFS
Port. 497/2008