



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS

ISABELA CERQUEIRA BARRETO

**UTILIZAÇÃO DE MICROESFERAS DE
HIDROXIAPATITA NO REPARO DE DEFEITOS
CRÍTICOS EM CALVÁRIA DE RATO**

Salvador
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ISABELA CERQUEIRA BARRETO

**UTILIZAÇÃO DE MICROESFERAS DE
HIDROXIAPATITA NO REPARO DE DEFEITOS
CRÍTICOS EM CALVÁRIA DE RATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas, nível Mestrado, Área de Concentração em Bioengenharia Tecidual, Universidade Federal do Rio de Janeiro, em parceria com a Universidade Federal da Bahia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Farina de Souza

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

Salvador
2008

B273 Barreto, Isabela Cerqueira.

Utilização de microesferas de hidroxiapatita no reparo de defeitos críticos em calvária de rato / Isabela Cerqueira Barreto. Salvador, 2008.

104 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Farina de Souza.

Co-Orientador: Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro / Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Odontologia, 2008.

1. Materiais biocompatíveis. 2. Calvária. 3. Hidroxiapatita. 4. Microesferas. I. Universidade Federal do Rio de Janeiro. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Odontologia III. Souza, Marcos Farina. IV. Rosa, Fabiana Paim. V. Título.

CDU 616.314.2-002

Dedico este trabalho, com todo o meu amor,

A meu pai, Osvaldo, meu grande incentivador, pelas sábias lições de persistência,
honestidade e humanidade.

A minha mãe, Ervene, pela ternura, carinho, atenção e amor, dedicados a mim, por
toda a vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, força maior e luz, que me impulsiona a seguir meus caminhos.

A Osvaldo e Ervene Barreto, pai e mãe, as “jóias raras” da minha vida, pelo incentivo, por torcer pelas minhas vitórias e, principalmente, pelo amor dispensado.

Ao Prof. Dr. Marcos Farina de Souza, meu Orientador, por dividir comigo suas experiências profissionais, com seus ricos conhecimentos, inteligência e grande entusiasmo pela ciência.

À Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa, Coordenadora Adjunta do Mestrado Fora de Sede e co-Orientadora deste trabalho, pelo apoio e por acreditar no meu potencial, desde que foi minha orientadora na Especialização de Periodontia. Obrigada!

Ao Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto, Coordenador da Pós-graduação em Ciências Morfológicas, e ao Prof. Dr. Radovan Borojevic, idealizadores e responsáveis pela implantação do Mestrado Fora de Sede no Estado da Bahia.

Ao Dr. Alexandre Malta Rossi, à Dra. Maria Helena Leão, à Sílvia Santos e aos demais pesquisadores responsáveis pela confecção do biomaterial utilizado neste estudo.

À Profa. Dra. Maria das Graças Farias Pinto, Coordenadora do Centro de Criação de Animais de Experimentação da Escola de Medicina Veterinária da UFBA, e equipe, pela cessão do espaço físico para o desenvolvimento da etapa experimental desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Roberto Paulo de Araújo, diretor do Instituto de Ciências da Saúde na época da implantação do Mestrado Fora de Sede, pelo incentivo e por viabilizar a implantação desta pós-graduação e à Profa. Dra. Maria Thereza Barral de Araújo, atual diretora.

Ao Dr. Aryon de Almeida Barbosa Júnior pela polidez e análise histológica deste trabalho.

Ao Dr. Marcos André Vannier, a Cláudio Figueira e aos demais pesquisadores do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Fundação Oswaldo Cruz de Salvador pela ótima receptividade.

Aos pesquisadores do Laboratório de Biomineralização do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ, em especial ao Prof. Dr. Leonardo Andrade, pela ajuda durante a minha estadia neste laboratório.

A Fúlvio Miguel, companheiro e amigo de importância ímpar para a realização deste trabalho. A sua presença e apoio foram fundamentais em todos os momentos.

À Fabiana Lopes, minha dupla constante e companheira no Rio de Janeiro, por participar efetivamente de todas as fases deste trabalho e compartilhar das dificuldades.

À Edmália Barreto, pessoa iluminada, pela delicadeza e boa vontade em ensinar a etapa cirúrgica e pela ajuda em diversos momentos.

Às técnicas de laboratório, Cátia e Cristina, pela paciência e dedicação no processamento dos espécimes.

Aos colegas de mestrado, pelo convívio nesta jornada.

Aos colegas do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA.

Ao amigo Victor Luiz, por me acolher com muita amabilidade, algumas vezes, em sua residência.

À Rhyna Carla, minha nova amiga, pelas dicas e conselhos.

À Catarina Araújo, pela delicadeza em ensinar o processamento de microscopia eletrônica de transmissão.

À Eliana Rosa, pela compreensão ao longo destes anos.

Aos professores Dr. Fernando Oliveira e Dra. Elizabeth Carvalho, grandes incentivadores no início da minha formação acadêmica.

À Ritinha, pelo empenho na esterilização dos instrumentais.

À Zuleide, pela ajuda e apoio constantes.

A todos os parentes, principalmente à Grazi e Léo, meus irmãozinhos, pelo imenso carinho e presença constante em minha vida, e aos amigos que sempre torceram pelas minhas vitórias.

À CAPES e à UFRJ pelo financiamento, que possibilitou a realização desta pesquisa.

Agradeço, especialmente, aos animais, que contribuíram com suas vidas em prol da ciência.

“O degrau da escada não foi inventado para repousar, mas apenas para sustentar o pé o tempo necessário para que o homem coloque o outro pé um pouco mais alto.”

Aldous Huxley

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS	x
	LISTA DE TABELAS	xviii
	LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xix
	RESUMO	xx
	ABSTRACT	xxi
1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1	TECIDO ÓSSEO E BIOENGENHARIA TECIDUAL	24
2.2	BIOMATERIAIS CERÂMICOS	32
2.3	BIOCERÂMICAS DE HIDROXIAPATITA	34
3	OBJETIVOS	38
3.1	OBJETIVO GERAL	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1	BIOMATERIAL	39
4.2	GRUPO EXPERIMENTAL	41
4.3	TÉCNICA CIRÚRGICA	42
4.4	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	43
4.5	ETAPA LABORATORIAL	45
5	RESULTADOS	49
5.1	GI – PONTO BIOLÓGICO DE 15 DIAS	49
5.2	GI – PONTO BIOLÓGICO DE 45 DIAS	52
5.3	GI – PONTO BIOLÓGICO DE 90 DIAS	54
5.4	GI – PONTO BIOLÓGICO DE 120 DIAS	56
5.5	GII (DEFEITOS PREENCHIDOS COM ESFERAS DE HA) – PONTO BIOLÓGICO DE 15 DIAS	58
5.6	GII – PONTO BIOLÓGICO DE 45 DIAS	63
5.7	GII – PONTO BIOLÓGICO DE 90 DIAS	68
5.8	GII – PONTO BIOLÓGICO DE 120 DIAS	72
6	DISCUSSÃO	84
7	CONCLUSÃO	92
	REFERÊNCIAS	93

ANEXO

104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Organização hierárquica do tecido ósseo (Adaptado de STEVENS e GEORGE, 2005).	23
Figura 2.	Estrutura cristalina da HA observada na direção do eixo <i>c</i> (KAY, YOUNG, POSNER, 1964).	25
Figuras 3-6.	Imagens de MEV das microesferas sinterizadas, que mostram a morfologia e textura do material, em diferentes aumentos. A figura 3 d mostra que a superfície do material é bastante rugosa, considerando-se a dimensão típica de uma célula (fotomicrografias cedidas por pesquisadores do CBPF).	38
Figura 7.	Imagem por MET que mostra a disposição dos cristais de HA após tratamento térmico. Notar que o material não foi homoganeamente sinterizado, pois alguns cristais se encontram individualizados no interior da estrutura. A elipse destaca uma região do biomaterial em que a sinterização foi efetiva. A amostra foi incluída em resina epóxi e cortada em ultramicrótomo (SALEM, 2006).	38
Figura 8.	Incisão bicoronal cutânea.	41
Figura 9.	Remoção do perióstio.	41
Figura 10.	Confecção de defeito ósseo com fresa trefina.	41
Figura 11.	Defeito ósseo confeccionado. Barra = 4 mm.	41
Figura 12.	Implantação do biomaterial.	41
Figura 13.	Sutura do retalho cutâneo. Barra = 4 mm.	41
Figura 14.	Vista dorsal da região de seleção do espécime (Adaptado de BARRETO, 2006).	42
Figura 15.	Diagrama esquemático da vista transversal da extensão linear do defeito ósseo com 8 mm de extensão, exemplificando o caso da lesão original (Adaptado de MIGUEL <i>et al.</i> , 2006). Este esquema representa o que é visto pelo observador olhando diretamente a superfície de corte o material. No caso	45

	deste trabalho, sempre orientamos a região voltada para a dura-máter para baixo.	
Figura 16.	Vasos sangüíneos (asterisco preto), células inflamatórias (seta amarela), fibroblastos (seta branca), tecido conjuntivo (asterisco branco) e formação de ossificação reparativa contígua à margem óssea, indicado por asterisco amarelo (GI 15 dias – HE).	47
Figura 17.	Fibras de colágeno (asterisco branco) e vasos sangüíneos (asterisco preto) na região central do defeito (GI 15 dias – Picrossírius).	48
Figuras 18 e 19.	Fibroblastos (seta branca) e tecido conjuntivo fibroso (asterisco branco) próximos à borda óssea (asterisco amarelo). Pode-se observar a produção de matriz osteóide (asterisco vermelho) pelos osteoblastos (seta vermelha) e os osteócitos (seta preta) (GI 15 dias – Azul de toluidina e fucsina básica).	49
Figura 20.	Tecido conjuntivo fibroso na região do defeito ósseo (asterisco branco) e borda óssea (asterisco amarelo) (Azul de toluidina e fucsina básica – GI 45 dias). A região de osso neoformado é facilmente observada na extremidade da borda óssea, pela desorganização do arranjo fibrilar, quando comparado ao do osso original.	50
Figura 21.	Presença de vasos sangüíneos (asterisco preto), fibroblastos (seta branca) e tecido conjuntivo fibroso (asterisco branco), e poucas células inflamatórias (seta amarela) próximo à borda óssea, indicada por asterisco amarelo (GI 45 dias – HE).	51
Figura 22.	Tecido conjuntivo fibroso formado na região central do defeito (GI 45 dias – HE).	51
Figura 23.	Borda óssea (asterisco amarelo) e região do defeito preenchida por tecido conjuntivo fibroso (asterisco branco) e vaso sangüíneo (asterisco preto) (GI 90 dias – Azul de toluidina e fucsina básica).	52

Figura 24.	Fibras de colágeno (asterisco branco) e formação de tecido ósseo (asterisco amarelo) em contigüidade à margem óssea (GI 90 dias – Goldner).	53
Figura 25.	Tecido conjuntivo fibroso situado na região central do defeito (GI 90 dias – Picrossírius).	53
Figura 26.	Fibroblastos arranjados paralelamente entre si (seta branca) e formação de tecido conjuntivo fibroso nas proximidades da borda óssea, indicada por asterisco amarelo (GI 120 dias – Azul de toluidina e fucsina básica).	54
Figura 27.	Osteoblastos (seta vermelha) na borda óssea (asterisco amarelo) e presença de tecido conjuntivo fibroso (asterisco branco) e células inflamatórias, indicadas por seta amarela (GI 120 dias – Goldner).	55
Figura 28.	Tecido conjuntivo fibroso denso na região de confecção do defeito ósseo (GI 120 dias – HE).	55
Figuras 29 e 30.	Fragmentação do biomaterial de forma não homogênea na região próxima à borda óssea. Notar a diferença de tamanho das partículas do biomaterial. A figura 30 apresenta círculo que delimita algumas partículas com diferentes tamanhos (GII 15 dias – HE).	57
Figuras 31 e 32.	Observar fragmentação do biomaterial (asteriscos) e presença de células inflamatórias (seta) entre os fragmentos do biomaterial, sendo que algumas estão aderidas a estes. No lado superior esquerdo, na figura 32, células gigantes estão indicadas por seta. Em paralelo ao processo inflamatório, observou-se formação de tecido ósseo (Figura 31) (GII 15 dias – Goldner).	58
Figuras 33 e 34.	Notar a formação de tecido ósseo reparativo (asterisco vermelho) nas proximidades da borda óssea com osteoblastos (seta amarela) e osteócitos (seta preta) na figura 33. Observar, também, a presença de vasos	59

- sangüíneos (asterisco preto), células inflamatórias e fibroblastos (seta branca) na figura 34 nas adjacências da margem óssea (GII 15 dias – Goldner).
- Figuras 35 e 36. Septos de tecido conjuntivo fibroso circundando o biomaterial, indicados por asteriscos (GII 15 dias - Picrossírius). 60
- Figura 37. Visão dorsal do tecido ósseo, observado à esquerda (asterisco vermelho) do defeito, preenchido pelo biomaterial à direita. Uma partícula menos fragmentada está circulada em branco. Notar a presença de vasos sangüíneos, indicados por asterisco branco (GII 45 dias – sem coloração). 61
- Figuras 38 e 39. Fragmentação das microesferas próxima à borda óssea na figura 39 e na região central do defeito de acordo com a figura 38. Observar, em ambas as figuras, a diferença no tamanho das partículas (GII 45 dias – HE). 62
- Figura 40. Notar a formação de tecido conjuntivo fibroso (asterisco) nesta região do defeito ósseo e observar, também, célula gigante no centro desta figura, apontada por seta (GII 45 dias – HE). 63
- Figuras 41 e 42. Tecido ósseo neoformado em contigüidade à borda óssea, com presença de osteoblastos (seta amarela) e osteócitos (seta branca), fibroblastos (seta preta) e fibras colágenas (asterisco branco) nas proximidades da borda óssea e entre as partículas fragmentadas (elipse). Observam-se também vasos sangüíneos (asterisco preto) e inflamação crônica (GII 45 dias – Goldner). 64
- Figura 43 e 44. Septos de fibras de colágeno circundando as partículas do biomaterial (asterisco branco), observados na figura 43. A figura 44 evidencia as fibras de colágeno mais densas (asterisco branco) e vasos sangüíneos 65

- (asterisco preto) na proximidade da borda óssea (GII 45 dias – Picrossírius).
- Figura 45. Tecido conjuntivo fibroso (asterisco branco) circundando as partículas do biomaterial (asterisco preto) nas proximidades da borda óssea (GII 90 dias – Picrossírius). 66
- Figuras 46 e 47. Fragmentação do biomaterial e formação, entre as partículas, de tecido conjuntivo fibroso mais denso (asterisco branco) (GII 90 dias – HE). 67
- Figuras 48 e 49. Região central do defeito mostra biomaterial com partículas bastante fragmentadas (elipse branca), fibroblastos (seta preta), fibras de colágeno (asterisco branco), vasos sangüíneos (asterisco preto) com células inflamatórias mononucleares (elipse vermelha) (GII 90 dias – Goldner). 68
- Figuras 50 e 51. Neoformação óssea (indicada por asterisco vermelho) justaposta às partículas do biomaterial na figura 50, próxima à borda óssea. A figura 51 corresponde ao mesmo campo visual da figura anterior, obtida por microscopia de polarização. As regiões em amarelo e azul correspondem ao tecido ósseo (GII 90 dias – sem coloração). 69
- Figuras 52. Tecido ósseo (asterisco amarelo), formado na região central do defeito circundando o biomaterial (asterisco preto) com osteoblastos (seta amarela) e osteócitos (seta branca). Notar também tecido conjuntivo fibroso (asterisco branco), fibroblastos (seta preta), e células inflamatórias (seta vermelha) (GII 90 dias – Goldner). 69
- Figuras 53 e 54. Visão dorsal da região do defeito ósseo. Notar, na figura 53, que a maioria das esferas (áreas escuras circulares) neste campo se encontra íntegra. Porém, em algumas regiões observa-se intensa fragmentação 71

do material (áreas escuras mais difusas – asterisco). Em torno de diversas esferas íntegras, observa-se um contorno com aparência típica de formação óssea (seta), o que não é observado com a mesma intensidade nas áreas onde houve fragmentação. A figura 54 corresponde ao mesmo campo visual da figura anterior, obtida por microscopia de polarização. As regiões iluminadas apresentam alta birrefringência, o que é sabidamente causado pelo tecido ósseo. A região iluminada à direita corresponde ao osso já existente fora do defeito (GII 120 dias – sem coloração).

- | | | |
|------------------|---|----|
| Figura 55. | Detalhe de uma região em que a microesfera (asterisco branco) está envolvida parcialmente por tecido ósseo (asterisco vermelho), próximo à borda óssea (GII 120 dias – sem coloração). | 72 |
| Figuras 56 e 57. | Nestas figuras, observam-se esferas fragmentadas (asterisco preto) circundadas principalmente por tecido ósseo (asterisco vermelho), e também por tecido conjuntivo fibroso (asterisco branco). A figura 57 mostra uma visão mais aproximada da figura 56 com formação de tecido ósseo, com osteoblastos (seta amarela) e osteócitos (seta branca), circundando as partículas (GII 120 dias – Goldner). | 73 |
| Figuras 58 e 59. | A figura 58 mostra o biomaterial (asterisco preto) circundado por tecido ósseo (asterisco vermelho) e por tecido conjuntivo fibroso, indicado por asterisco branco (GII 120 dias – Azul de toluidina e fucsina básica). A figura 59 mostra uma secção do mesmo bloco, com visão mais aproximada da figura 58. Observar os vasos sangüíneos presentes no tecido conjuntivo fibroso (elipse branca) e os osteócitos no interior do tecido | 74 |

- ósseo, indicados por setas vermelhas na figura 59 (GII 120 dias – Azul de Richardson).
- Figuras 60 e 61. Estas figuras exibem o tecido ósseo neoformado (asterisco vermelho) com osteócitos (seta vermelha) ao redor do biomaterial (asteriscos preto). Já a figura 61, mostra o tecido conjuntivo fibroso (asterisco branco) com fibroblastos (seta branca) e vasos sangüíneos (asterisco amarelo), formado de permeio às partículas do biomaterial (GII 120 dias – Azul de toluidina e fucsina básica com contraste interferencial). 75
- Figuras 62 e 63. A figura 62 mostra a fragmentação das partículas e tecido conjuntivo fibroso (asterisco branco) próximas à borda óssea (asterisco amarelo) e formação de tecido ósseo ao redor de partículas, indicado por asterisco vermelho. A figura 63 exhibe uma visão mais aproximada do tecido conjuntivo fibroso denso, formado entre as partículas fragmentadas, algumas delineadas por elipse (GII 120 dias – HE). 76
- Figura 64. Partículas fragmentadas do biomaterial com células inflamatórias próximas às partículas. Uma célula gigante aderida ao biomaterial está indicada por seta (GII 120 dias – HE). 77
- Figuras 65 e 66. Inflamação crônica ao redor de partículas (asterisco vermelho) na região central do defeito ósseo (células inflamatórias circundadas por elipse), com presença de vasos sangüíneos (asterisco preto), fibroblastos (seta) e tecido conjuntivo fibroso ressaltado por asterisco branco (GII 120 dias – Goldner). 78
- Figuras 67 e 68. Notar o tecido ósseo (asterisco vermelho) sendo formado justaposto ao tecido conjuntivo fibroso. Observar osteoblastos (seta amarela), matriz osteóide (seta preta) e osteócitos (seta vermelha). O tecido conjuntivo fibroso formado ao redor das partículas com 79

- fibroblastos e vasos sangüíneos são observados nas duas figuras (GII 120 dias – Azul de toluidina e fucsina básica com contraste interferencial).
- Figuras 69 e 70. Tecido conjuntivo fibroso (asterisco branco) em permeio ao biomaterial (asterisco preto) com presença de células inflamatórias (setas brancas na figura 69). A Figura 70 mostra o biomaterial circundado por tecido ósseo (asterisco vermelho), com osteócito (seta vermelha) e por tecido conjuntivo fibroso, um fibroblasto está apontado com seta preta (GII 120 dias – Azul de toluidina e fucsina básica com contraste interferencial). 80
- Figuras 71. Tecido conjuntivo fibroso (asterisco branco) com vasos sangüíneos (asterisco amarelo), circundando as partículas (asterisco preto), próximos ao tecido ósseo (asterisco vermelho), onde se observa, indicado por seta vermelha, osteócito (GII 120 dias –Azul de Richardson). 81
- Figuras 72. Tecido conjuntivo fibroso (asterisco branco) de permeio ao biomaterial, ressaltado por asterisco preto (GII 120 dias – Picrossírius). 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Distribuição de animais de acordo com os grupos e pontos biológicos (dias).	39
Tabela 2.	Protocolo de processamento histológico, em resina, dos espécimes. Todas as etapas foram feitas à temperatura de 4° C.	44
Tabela 3.	Composição das substâncias I, II e III.	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CBPF	Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
Fiocruz	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
GI	Grupo I
GII	Grupo II
HE	Hematoxilina e eosina
HA	Hidroxiapatita
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
LBTB	Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mL	Mililitro
mm	Milímetro
M	Molar
nm	Nanômetro
n ^o .	Número
Rpm	Rotações por minuto
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
VM	Vesículas da matriz
μm	Micrometro
°C	Graus Celsius
®	marca registrada

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio de análise histológica, o potencial regenerativo de um biomaterial constituído por microesferas de hidroxiapatita sinterizadas, em defeito ósseo com dimensão crítica. Foram utilizados 48 ratos machos adultos, nos quais se realizaram defeitos transfixados de 8 mm de diâmetro na região da calvária. Estes animais foram divididos aleatoriamente e eqüitativamente em dois grupos: grupo I (GI – controle), no qual o defeito ósseo confeccionado permaneceu vazio; e grupo II (GII), em que o defeito foi preenchido pelo biomaterial (microesferas com diâmetro entre 400 e 600 μ m). Os animais foram sacrificados aos 15, 45, 90 e 120 dias de pós-operatório e analisados, por meio de microscopia óptica, por diversas colorações. No grupo controle, a neoformação óssea restringiu-se às bordas ósseas e houve formação de tecido conjuntivo fibroso em toda a extensão do defeito. Notou-se, no GII, que muitas microesferas deslocaram do defeito e foi observado também que aquelas que permaneceram no defeito fragmentaram-se de forma heterogênea, o que pode ter sido causado por uma sinterização não-homogênea do material. Concluiu-se que, nas condições experimentais, o biomaterial utilizado promoveu osteocondução, com formação de tecido ósseo a circundar algumas esferas, sobretudo aquelas mais íntegras, e principalmente aquelas situadas nas proximidades das margens ósseas; porém não foi capaz de induzir a regeneração óssea em toda a extensão da lesão, havendo, em muitas regiões, formação de tecido conjuntivo fibroso, principalmente nas regiões em que houve maior fragmentação e dispersão do biomaterial. Resposta inflamatória crônica granulomatosa foi observada nos pontos biológicos estudados.

Palavras-chave: Biomaterial; Calvária; Defeito crítico; Hidroxiapatita; Microesfera; Reparo.

ABSTRACT

The aim of this study was to make a histological analysis of the regenerative potential of sintered hydroxyapatite microspheres, used as grafts in critical-size bone defects. Transfixed bone defects of 8 mm diameter were produced in the calvaria region of 48 adult male rats. The rats were distributed randomly and equally in two groups: group I (GI – control) without the implantation of the biomaterial; and group II (GII) with the implantation of hydroxyapatite microspheres (diameters ranging from 400 to 600 μ m). The animals were sacrificed after 15, 45, 90 and 120 days, and cross sections of the calvaria region were obtained and analysed by optical microscopy using different histological staining solutions. In control group, bone neoformation was restricted to the edge of the defect, while fibrous connective tissue formation was found along the extension of the defect. In GII, it was noted that many microspheres dislocated from the region of the defect and several microspheres that remained in the implanted region became heterogeneously fragmented. The fragmentation was due probably to the non homogeneous compaction of the original nanoparticles before sintering. We concluded, based on the experimental conditions performed in this work, that the biomaterial was capable to promote osteoconduction, with bone neoformation occurring in regions near and surrounding some spheres, especially those whose fragmentation was not very intense, and mainly in those spheres situated near the edges of the bone defect. Nevertheless, in most part of the wound, it was found the formation of fibrous connective tissue, principally in places rich in highly fragmented particles from the biomaterial. In some sites, at the biological points of 90 and 120 days, the collagen fibers were strongly compacted.

Keywords: Biomaterial; Calvaria; Critical size defect; Hydroxyapatite; Microsphere; Repair.

1 INTRODUÇÃO

A bioengenharia tecidual é uma área interdisciplinar focada na produção de substitutos biológicos, com a finalidade de restaurar a função perdida de um tecido ou órgão (LANGER e VACANTI, 1999). No campo da bioengenharia tecidual óssea, tem-se estudado os eventos celulares encontrados durante a regeneração, o que tem possibilitado o desenvolvimento de técnicas e materiais que induzam à melhor neoformação dos tecidos em estudo. Assim, as pesquisas científicas têm norteado o desenvolvimento de biomateriais capazes de elucidar respostas celulares específicas, que direcionem a formação de novo tecido ósseo (SHIN, JO, MIKOS, 2003).

Embora o tecido ósseo, fisiologicamente, apresente remodelação constante e boa capacidade regenerativa, quando a perda tecidual atinge dimensões críticas, este mecanismo não ocorre espontaneamente e o defeito é preenchido por tecido conjuntivo fibroso. Assim, a regeneração de defeitos ósseos críticos representa um desafio na área biomédica (KIM *et al.*, 2006; MIGUEL *et al.*, 2006). Destarte, as formas de preenchimento destes defeitos podem ser realizadas por enxertos ósseos autógenos, homogêneos ou heterogêneos. Os enxertos autógenos são eleitos como de primeira escolha para este preenchimento, porém a sua aplicação torna-se limitada quando há a necessidade de grande quantidade de enxerto, o que gera maior morbidade, desconforto ao paciente e tempo prolongado de recuperação. A utilização dos enxertos homogêneos e heterogêneos envolve certos riscos, como a transmissão de doenças e antigenicidade (LEGEROS, 2002; WU *et al.*, 2004). Logo, os biomateriais representam uma opção aos enxertos ósseos.

Biomateriais podem ter origem natural como, por exemplo, colágeno e quitosano, ou sintética, como metais e cerâmicas (HUTMACHER, 2000). Dentre os

diferentes tipos de biomateriais cerâmicos, a hidroxiapatita (HA) tem sido estudada, extensivamente e aplicada clinicamente como biomaterial regenerativo, substituto do enxerto de osso autógeno (KAWACHI *et al.*, 2000; LEGEROS, 2002).

Este tipo de biomaterial se destaca em função de sua similaridade com a fase mineral do tecido ósseo. Ademais, a HA é um material biocompatível, radiopaco, osteocondutor, capaz de adsorver proteínas de adesão, fatores de crescimento e estabelecer condições locais necessárias à diferenciação de células osteogênicas para a formação de tecido ósseo (RIMINUCCI e BIANCO, 2003). A HA pode ser utilizada em diversas formas de apresentação, como pó, grânulos, pasta, discos, blocos, microesferas, dentre outras.

A implantação de microesferas de HA em defeitos ósseos viabiliza o crescimento vascular e tecidual nos espaços entre estas partículas. Quando utilizadas, por meio de sistemas injetáveis, tem sido proposto que estes biomateriais sejam capazes de proporcionar o preenchimento de defeitos ósseos de diferentes formatos e tamanhos, por meio de cirurgias minimamente invasivas (BARRIAS *et al.*, 2005). No entanto, anteriormente à sua aplicação clínica, estes biomateriais necessitam ser avaliados, *in vitro* e *in vivo*, para que sua citotoxicidade e biocompatibilidade, respectivamente, sejam consideradas, com conseqüente redução dos efeitos adversos.

Em vista disto, este trabalho propõe avaliar, *in vivo*, o potencial regenerativo de um biomaterial cerâmico no formato de microesferas para regeneração óssea.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TECIDO ÓSSEO E BIOENGENHARIA TECIDUAL

O osso é um tipo de tecido conjuntivo especializado calcificado, principal constituinte do esqueleto, e possui funções, como apoio aos músculos esqueléticos, proteção aos órgãos vitais e à medula óssea e reserva metabólica de íons, principalmente cálcio e fosfato, para todo o organismo (MEGHJI, 1992).

Dentre as células associadas a este tecido, três tipos são exclusivos: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, responsáveis, respectivamente, pela síntese, manutenção e reabsorção do tecido ósseo (HING, 2004). Os osteoblastos têm origem em células mesenquimais indiferenciadas (BEZERRA *et al.*, 2005) e quando recobrem superfícies ósseas quiescentes, tornam-se achatados e alongados e são denominados células de revestimento ósseo (SODEK e MCKEE, 2000). Já aqueles que ficam embebidos e aprisionados na matriz mineralizada são denominados osteócitos (HING, 2004). Diferentemente dos osteoblastos, os osteoclastos são formados a partir de células do sistema monocítico-fagocitário, que se fusionam e originam a células multinucleadas (TEITELBAUM, 2000; BEZERRA *et al.*, 2005).

Macroscopicamente, o osso maduro é classificado em cortical ou compacto, que possui maior densidade de matriz óssea, e trabecular ou esponjoso, que exibe cavidades intercomunicantes visíveis, onde se encontra a medula óssea (HING, 2004). Revestindo este tecido, existem duas membranas conjuntivas, uma externa, denominada perióstio e uma interna, o endóstio. Estas membranas, também, nutrem as células presentes neste tecido. O perióstio possui duas camadas, uma camada interna, composta de células precursoras dos osteoblastos, e uma camada

externa, rica em vasos sanguíneos e nervos, fibroblastos e fibras de colágeno. O endóstio é composto por uma única camada achatada de osteoblastos (HING, 2004).

O tecido ósseo é um compósito (Figura 1), formado pela fase orgânica, constituída por proteínas, lipídeos, peptídeos, glicoproteínas e polissacarídeos; e pela fase inorgânica, formada por fosfato de cálcio, carbonatos, sódio, flúor, citrato e magnésio (LEGEROS, 2002). Estas duas fases interagem para fornecer propriedades mecânicas de elasticidade, resistência e dureza, únicas ao tecido ósseo (HING, 2004).

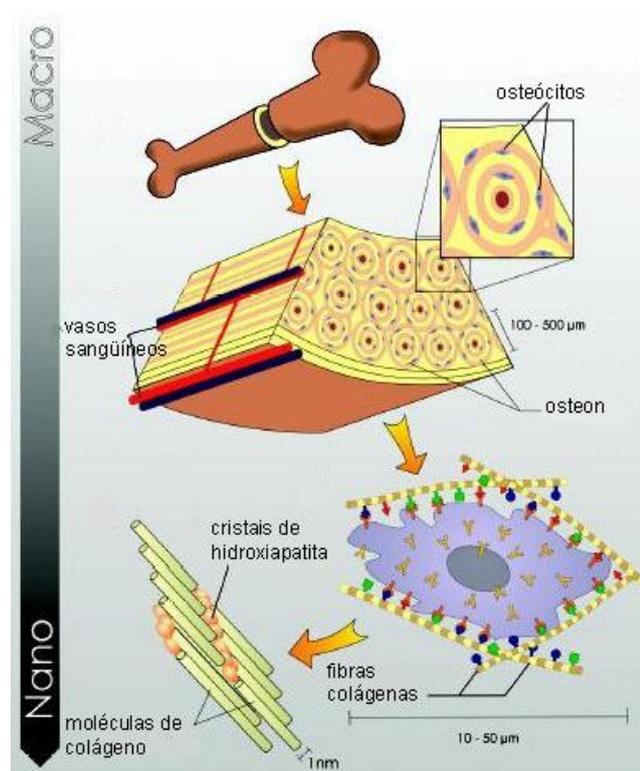


Figura 1. Organização hierárquica do tecido ósseo (Adaptado de STEVENS e GEORGE, 2005).

Aproximadamente 95% do componente orgânico da matriz extracelular deste tecido são representados pela proteína colágeno tipo I (MEGHI, 1992). Os componentes desta proteína são secretadas pelos osteoblastos para o meio

extracelular como procolágeno, em um arranjo espacial em tripla hélice. Este arranjo ocorre em decorrência da presença dos peptídeos de registro, localizados nas extremidades da molécula de colágeno. No meio extracelular, estes peptídeos são removidos por proteases e a molécula de colágeno passa a ser denominada de tropocolágeno, que se polimeriza para formar as fibrilas, que por sua vez se agregam em fibras. Quando analisadas ao microscópio eletrônico, as moléculas desta proteína, nas fibrilas, possuem um comprimento e diâmetro aproximados de 300 nm e 1,5 nm, respectivamente. Na fibrila de colágeno, estas moléculas estão alinhadas paralelamente formando estruturas como placas. As placas se sobrepõem, e apresentam um deslocamento de aproximadamente um quarto de seu comprimento no sentido do maior eixo das moléculas. A cada quatro conjuntos de placas, a estrutura se repete, o que determina regiões de sobreposição denominadas *overlap*, quando a fibrila de colágeno é observada na direção perpendicular ao seu eixo maior por microscopia eletrônica de transmissão (MET). As regiões de superposição não são contínuas e medem aproximadamente 27 nm de comprimento, pois, no plano de cada placa, as moléculas estão deslocadas em cerca de 40 nm na direção do eixo maior da estrutura e formam regiões “vazias”, conhecidas como *gaps*. Os *gaps* são túneis orientados perpendicularmente ao eixo da fibrila (RHO *et al.*, 1998).

A matriz orgânica é composta, ainda, de pequena quantidade de proteínas não-colagênicas, como osteopontina, sialoproteína óssea, osteonectina e osteocalcina. Especula-se que estas participem da regulação do tamanho, orientação e modo de deposição dos cristais minerais (RHO, KUHN-SPEARING, ZIOUPOS, 1998; HING, 2004).

A fase inorgânica é constituída pelos íons cálcio e fosfato, que formam cristais de HA (HING, 2004) com fórmula química representada por $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Além destes, outros íons estão associados à HA, como carbonato, citrato, sódio, magnésio, potássio, cloreto e flúor. Os íons da superfície da HA são hidratados, existindo uma camada de água e íons em volta do cristal, o que facilita a troca iônica entre este e o líquido intersticial. A HA biológica apresenta, na sua estrutura cristalina (Figura 2), íons carbonato, principalmente localizados em sítios de fosfato (HEANEY, 2003; HING, 2004).

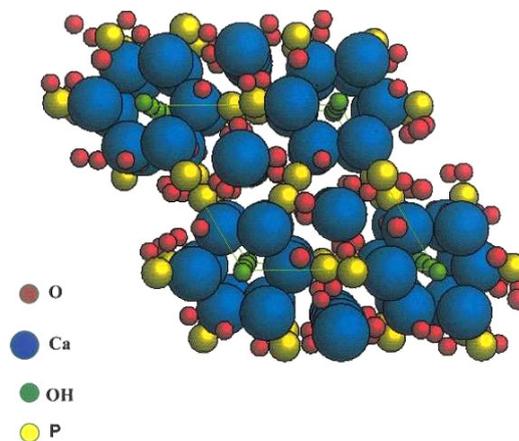


Figura 2. Estrutura cristalina da HA observada na direção do eixo *c* (KAY, YOUNG, POSNER, 1964).

O osso apresenta-se metabolicamente ativo e em constante remodelação, regulado por fatores locais e hormonais (SODEK e MCKEE, 2000). Este mecanismo fisiológico consiste em reabsorção, seguida de aposição óssea, fundamental para a homeostase e qualidade tecidual (ERLEBACHER *et al.*, 1998; SARAIVA e LAZARETTI-CASTRO, 2002; BEZERRA *et al.*, 2005).

O início da mineralização óssea requer a presença de vesículas da matriz (VM), originárias da membrana celular (SANTIN *et al.*, 2006) dos osteoblastos e condroblastos (ANDERSON, 2003). Estas VM possuem canais de cálcio, que

facilitam o influxo deste íon do meio extracelular para o interior destas (SANTIN *et al.*, 2006), que são ricas em fosfatase alcalina, uma enzima glicoprotéica, que induz a liberação de íons fosfato (TAKANO *et al.*, 2000; SANTIN *et al.*, 2006). Uma vez que a concentração destes íons no interior das vesículas supere a constante do produto de solubilidade para o mineral a ser formado, inicia-se a nucleação (ANDERSON, 2003), seguida pela rápida formação dos cristais de HA (BALCERZAK *et al.*, 2003). Estes agregados cristalinos crescem e rompem as vesículas (KATCHBURIAN e ARANA, 1999); em consequência, ocorre a mineralização das regiões entre as fibrilas de colágeno (TAKANO *et al.*, 2000). A partir de certo estágio, ocorre a mineralização nas regiões de *gaps* das fibrilas (BALCERZAK *et al.*, 2003), a qual não depende da presença das VM.

Neste tecido, o mecanismo de reparo ocorre por meio de regeneração, sem a formação de cicatriz fibrosa (DELACURE, 1994). Após uma lesão no periósteo e tecido ósseo, há a formação de um hematoma e morte dos osteócitos adjacentes à área lesionada, com necrose local do tecido ósseo circunjacente à fratura (HING, 2004). Em seguida, células inflamatórias, fibroblastos e células-tronco são recrutados para este sítio em decorrência da liberação de fatores de crescimento e citocinas, que possuem um papel fundamental para o reparo (STREET *et al.*, 2002; CARANO e FILVAROFF, 2003; HING, 2004). Este evento leva à proliferação das células do periósteo e à formação do calo ósseo na área lesionada, com consequente neoformação óssea, constituída, inicialmente, por osso imaturo, gradualmente substituído por osso lamelar (HING, 2004). Ao mesmo tempo, há neoformação vascular, a partir de vasos sanguíneos já existentes, mecanismo denominado de angiogênese. Finalmente, ocorre a remodelação tecidual e redução

do tecido neoformado para o tamanho ósseo inicial (STREET *et al.*, 2002; CARANO e FILVAROFF, 2003).

É válido ressaltar que a consolidação do reparo neste tecido está condicionada a determinadas condições, tais como amplo suprimento sanguíneo, estabilidade mecânica, presença de um arcabouço tridimensional (SALGADO, 2002) e tamanho do sítio lesionado, pois em regiões em que a morfologia e dimensão do defeito são extensas e críticas ao reparo o mecanismo regenerativo, torna-se limitado e, desta forma, há formação de cicatriz fibrosa com comprometimento funcional ou estético (KIM *et al.*, 2006). Torna-se, portanto, premente o desenvolvimento de biomateriais ou técnicas regenerativas com o objetivo de restabelecer a estrutura e função perdidas, haja vista que os enxertos autógenos, homogêneos e heterogêneos, empregados clinicamente na atualidade, apresentam limitações, como dificuldade de obtenção (autógeno), risco de transmissão de doenças e antigenicidade (homógeno e heterógeno) (LEGEROS, 2002). Portanto, a bioengenharia tecidual óssea encontra-se frente ao desafio fundamental de desenvolver os biomateriais e procedimentos que levem à otimização de materiais para a recuperação do tecido. Para tal, este novo campo da área biomédica emprega princípios das engenharias de materiais, química e mecânica, e das ciências biológicas (LANGER e VACANTI, 1999; STEVENS e GEORGE, 2005; MIGUEL *et al.*, 2006). Neste campo, os pesquisadores tentam mimetizar o processo natural de reparo ósseo, por meio da utilização de arcabouços, carregados ou não com células ou proteínas adsorvidas (ANSELME, 2000; UEDA *et al.*, 2000; UEMURA *et al.*, 2003). Estes biomateriais podem estar disponíveis na forma de membranas, blocos, géis, pós, partículas, entre outras.

A confecção destes biomateriais deve ser realizada com materiais apropriados, que apresentem fabricação e custo acessíveis. Ademais, devem ser 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 à sua função, e possuir estabilidade mecânica adequada sem, no entanto, alterar sua composição quando esterilizados ou manipulados, previamente à sua implantação (LASKIN, 1982; PARK, 1984; GURGEL, 2000; TEMONOFF e MIKOS, 2000; BET *et al.*, 2003).

Os biomateriais podem ser classificados em naturais ou sintéticos. Como exemplo do primeiro grupo, tem-se o colágeno, o coral, o quitosano e o alginato. Estas substâncias possuem, como vantagens, facilitar a adesão celular, a baixa toxicidade e baixa resposta inflamatória. Todavia, apresentam algumas desvantagens, como baixa resistência mecânica, podem ser facilmente desnaturados e freqüentemente requerem modificações físico-químicas, com a finalidade de aumentar a sua durabilidade, quando implantados *in vivo*, o que pode limitar sua aplicação clínica, dependendo do sítio de implantação (LANGER e VACANTI, 1999; VATS *et al.*, 2003).

Já os biomateriais sintéticos, produzidos a partir de metais, polímeros e cerâmicas (KAWACHI *et al.*, 2000), possuem propriedades como resistência, velocidade de degradação, microestrutura e permeabilidade, que podem ser controladas durante o processo de fabricação (LANGER e VACANTI, 1999). Quando combinados com outros materiais, tanto naturais quanto sintéticos, formam biomateriais híbridos ou compósitos (VATS *et al.*, 2003).

Os biomateriais, quando aplicados *in vivo*, promovem osteogênese por meio de três mecanismos: osteocondução, osteoestimulação ou osteoindução. No primeiro mecanismo, o arcabouço propicia a migração, adesão, inserção e proliferação celular (MISCH e DIETSH, 1993; MARCANTONIO, MARCANTONIO, CIRELLI, 1999). A osteoestimulação estimula as células osteogênicas do leito receptor ou do próprio enxerto ósseo a sintetizarem matriz osteóide (MARCANTONIO, MARCANTONIO, CIRELLI, 1999; SUH *et al.*, 2001), enquanto que os enxertos osteoindutores incitam células mesenquimais indiferenciadas a diferenciarem-se em osteoblastos, inclusive em sítios ectópicos (MISCH e DIETSH, 1993; GOSAIN *et al.*, 2002).

Para testar estes mecanismos e, assim, assegurar sua eficácia clínica, é de fundamental importância realizar estudos experimentais em modelos animais apropriados. Neste contexto, defeitos ósseos críticos, os quais não possuem a capacidade de se regenerar espontaneamente durante a vida do animal (SCHMITZ e HOLLINGER, 1986), realizados em calvária de rato adulto, têm sido amplamente utilizados por diversos autores para avaliar o potencial osteogênico de novos biomateriais (TAKAGI e URIST, 1982; SCHMITZ *et al.*, 1990; MARDEN *et al.*, 1994; BOSCH, MELSEN, VARGERVIK, 1995; LIM, LEE, YEO, 2000; RUPPRECHT *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2004; CARDOSO *et al.*, 2006; MIGUEL *et al.*, 2006).

A dimensão exata destes defeitos é controversa na literatura, visto que alguns autores utilizaram defeitos transfixados em calvária de rato com diâmetro de 4 mm (MULLIKEN e GLOWACKI, 1980; COWAN *et al.*, 2004), 5 mm (BOSCH, MELSEN, VARGERVIK, 1998; VERNA *et al.*, 2002; BRAZ *et al.*, 2003), 6 mm (BRUNEL *et al.*, 1996; PRYOR *et al.*, 2005; PRYOR, SUSIN, WIKESJÖ, 2006) e 8 mm (TAKAGI e URIST, 1982; SCHMITZ e HOLLINGER, 1986; LIM LIM, LEE, YEO, 2000; MARINS

et al., 2004; CARDOSO *et al.*, 2006; KNESER *et al.*, 2006; MIGUEL *et al.*, 2006; INTINI *et al.*, 2007). Segundo Miguel *et al.* (2006), utilizar defeitos com 8 mm parece ser o mais apropriado para testar a capacidade regenerativa de biomateriais, visto que, nestes defeitos, há uma neoformação óssea reparativa nas margens, mas ainda resulta tecido conjuntivo fibroso na região central.

O rato, como modelo de estudo, possui vantagens por apresentar baixo custo, exigência de pouco espaço físico para sua criação e manutenção, necessidade de pouca quantidade de biomaterial para preencher o defeito ósseo crítico, facilidade de acomodação do biomaterial no defeito e facilidade para a obtenção de exames imagiológicos (SCHMITZ e HOLLINGER, 1986).

Durante a confecção do defeito, o periósteo, quando preservado, atua como uma barreira física, pois protege o hematoma, previne o colapso do tecido conjuntivo circunvizinho e fornece suprimento vascular e celular, o que favorece a regeneração óssea. No entanto, se esta membrana for extensamente lesada ou removida, a capacidade regenerativa neste tecido torna-se mais dificultada (VERNA *et al.*, 2002). Deste modo, ensaios com biomaterias introduzidos em sítios onde a membrana foi removida, poderão trazer um conhecimento sobre propriedades particulares do material, quanto a seu potencial osteogênico.

2.2 BIOMATERIAIS CERÂMICOS

As cerâmicas são materiais utilizados desde que o gesso Paris (sulfato de cálcio) foi inicialmente empregado em 1892 como um cimento para a fixação de fraturas e preenchimento de defeitos ósseos (TEMENOFF e MIKOS, 2000). No entanto, sua aplicação foi limitada, já que este material apresenta baixa resistência

mecânica, devido a sua rápida fragmentação e degradação, e absorção pelo organismo (KAWACHI *et al.*, 2000).

Após um período sem utilização, na década de 70, os biomateriais cerâmicos voltaram a ser empregados e muitos pesquisadores investigaram a sua citotoxicidade, em testes *in vitro*, e biocompatibilidade, em estudos *in vivo*, o que possibilitou a sua classificação como biocerâmicas. Nesta época, a alumina densa foi a biocerâmica mais difundida. Devido a sua biocompatibilidade e maior resistência mecânica, este biomaterial tem sido utilizado até os dias atuais em próteses ortopédicas (KAWACHI *et al.*, 2000). Outras biocerâmicas, como a zircônia, vitrocerâmicas à base de sílica, o dióxido de titânio e os fosfatos de cálcio também têm sido amplamente utilizadas na atualidade (LU *et al.*, 1999; KAWACHI *et al.*, 2000).

As biocerâmicas podem ser biodegradáveis ou bioativas. As cerâmicas biodegradáveis são absorvidas gradativamente na medida em que há a sua substituição pelo tecido neoformado (DEE *et al.*, 2002), logo, sua velocidade de absorção deve ser semelhante à da neoformação óssea (DUCHEYNE e QIU, 1999; MASTROGIACOMO *et al.*, 2005; SILVA, 2006), enquanto que os produtos originários desta degradação devem ser absorvidos ou eliminados pelo organismo (DEE *et al.*, 2002). O gesso e o fosfato tricálcico representam exemplos deste tipo de cerâmica (KAWACHI *et al.*, 2000).

Já as cerâmicas bioativas são aquelas que se ligam de forma direta ao tecido ósseo, por meio da superfície carbonatada, formada pela dissolução da biocerâmica com liberação de íons cálcio e fosfato, que precipitam no microambiente tecidual, o que resulta em uma íntima associação entre os componentes do tecido e a biocerâmica, participando ativamente do mecanismo reparador deste tecido (DEE *et*

al., 2002; FULMER *et al.*, 2002; LEGEROS, 2002). Em adição, íons, como carbonato, advindo dos fluidos biológicos, também são incorporados ao biomaterial, o que contribui para íntima união entre os componentes do tecido e a biocerâmica. Como exemplos destas biocerâmicas, têm-se o fosfato tricálcico, os biovidros e a HA (LEGEROS, 2002).

Estas cerâmicas, além de bioativas, são biocompatíveis e osteocondutoras, e podem ser utilizadas em diversas formas de apresentação, como pó, partícula, bloco, esfera, o que as torna apropriadas ao reparo de lesões ósseas (KAWACHI *et al.*, 2000; LEGEROS, 2002). Contudo, possuem solubilidade variável (FULMER *et al.*, 2002) e baixa resistência mecânica (KAWACHI *et al.*, 2000; LEGEROS, 2002), que restringem seu uso em regiões onde esta propriedade seja fundamental (KAWACHI *et al.*, 2000).

2.3 BIOCERÂMICAS DE HIDROXIAPATITA

Dentre as cerâmicas à base de fosfato de cálcio, a HA tem sido amplamente utilizada nas condições clínicas onde a recuperação óssea é limitada (LEGEROS, 2002), devido à sua similaridade à fração inorgânica do tecido ósseo, biocompatibilidade (HENCH, 1991; HING, 2004; PATEL *et al.*, 2005), bioatividade, além de sua radiopacidade, o que possibilita a proervação periódica, por meio de exames imaginológicos. A HA pode ter origem natural, derivada de algumas espécies de corais e de osso bovino, ou sintética, que são classificadas em sinterizadas ou não sinterizadas, e podem ser empregadas na forma densa ou porosa (KAWACHI *et al.*, 2000; LEGEROS, 2002).

O processo de sinterização, onde as partículas sólidas se aglutinam pelo efeito do aquecimento a uma temperatura inferior à de fusão, mas suficientemente alta para possibilitar a difusão dos átomos das duas redes cristalinas, torna os cristais de HA mais coesos e mais cristalinos, reduz o volume da amostra e aumenta a resistência mecânica (ROSA, SHAREEF, NOORT, 2000; LEGEROS, 2002; RIBEIRO, BARRIAS, BARBOSA, 2004; TADIC *et al.*, 2004; LACERDA, LAMEIRAS, SILVA, 2006).

Portanto, previamente a este tratamento, é importante associar aos biomateriais cerâmicos agentes de união, como por exemplo, o alginato de sódio, um polímero derivado de algas pardas e bactérias, para que haja a aglomeração das partículas de HA, no caso de se produzirem peças com formatos específicos. Com o tratamento térmico, promovido pelo processo de sinterização, ocorre a remoção do polímero, com conseqüente formação de poros (SUNNY, RAMESH, VARMA, 2002; RIBEIRO, BARRIAS, BARBOSA, 2004). É válido ressaltar que o aumento da temperatura deve ser gradual, fator importante para a manutenção da morfologia do biomaterial (SUNNY, RAMESH, VARMA, 2002).

Outras características relevantes que distinguem a HA das demais cerâmicas à base de fosfato de cálcio são a manutenção do seu volume no sítio implantado ao longo do tempo, visto que esta biocerâmica possui baixa velocidade de degradação, e maior resistência mecânica (HENCH, 1991; GOSAIN *et al.*, 2002). Os fatores relacionados a esta velocidade são área de superfície, cristalinidade, carga de estresse mecânico, bem como o sítio de implantação (GOSAIN *et al.*, 2002).

A existência de poros interconectados favorece a inserção, adesão, proliferação e diferenciação celular no interior de sua estrutura, bem como a neoformação vascular, o que provê aporte nutricional (KAWACHI *et al.*, 2000;

LOGEART-AVRAMOGLOU *et al.*, 2005). No entanto, a presença de poros pode aumentar a área total de superfície, o que diminui a resistência mecânica do arcabouço (LU *et al.*, 1999; UEMURA *et al.*, 2003; LOGEART-AVRAMOGLOU *et al.*, 2005). Quando estes poros são confeccionados com dimensões adequadas, favorecem o crescimento do tecido ósseo, levando a um entrelaçamento do tecido neoformado com a HA, o que proporciona a osteointegração do implante ao tecido ósseo (KAWACHI *et al.*, 2000; GOSAIN *et al.*, 2004; LOGEART-AVRAMOGLOU *et al.*, 2005). De acordo com Lu *et al.* (1999), poros com diâmetros maiores que 100 μm possibilitam a neoformação óssea no interior destes biomateriais. Enquanto que, para Gosain *et al.* (2004), para que este mecanismo ocorra, os poros devem variar entre 200 e 300 μm de diâmetro.

Vários materiais podem ser utilizados com o intuito de promover biocerâmicas porosas: esponja de celulose (FABBRI, CELOTTI, RAVAGLIOLI, 1995), sais cristalinos em associação com polímero hidrossolúvel (TADIC *et al.*, 2004), esponjas de poliuretano (RIPAMONTI *et al.*, 2001) ou alginato de sódio (RIBEIRO, BARRIAS, BARBOSA, 2004), como descrito anteriormente.

Já a HA densa possui maior resistência mecânica e menor potencial de dissolução e degradação, quando comparada à HA porosa, desta forma, não há neoformação óssea no interior deste arcabouço, o que a faz permanecer no leito receptor por um período maior (UEMURA *et al.*, 2003). De acordo com Metsger, Rieger, Foreman (1999), estas cerâmicas densas podem ser utilizadas apenas como biomaterial para o preenchimento de defeitos ósseos. Porém, se após a implantação, em sítios com alta demanda mecânica, surgirem na sua estrutura rachaduras ou fendas, a neomineralização pode ocorrer no interior do biomaterial (RIMINUCCI e BIANCO, 2003).

De acordo com o exposto, pode-se inferir que os biomateriais cerâmicos compostos por HA biointegram ao tecido ósseo, estabelecendo, assim, continuidade entre este e a biocerâmica. Logo, pode-se dizer que as células osteogênicas são capazes de sintetizar matriz osteóide, que posteriormente torna-se mineralizada, em regiões ínfimas no interior do arcabouço.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, *in vivo*, a capacidade regenerativa de um biomaterial cerâmico formado por microesferas de hidroxiapatita, utilizado como arcabouço em defeito ósseo crítico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A) Padronizar as condições experimentais para o preenchimento de defeito crítico de 8 mm de diâmetro em calvária de rato com microesferas de HA sinterizada.

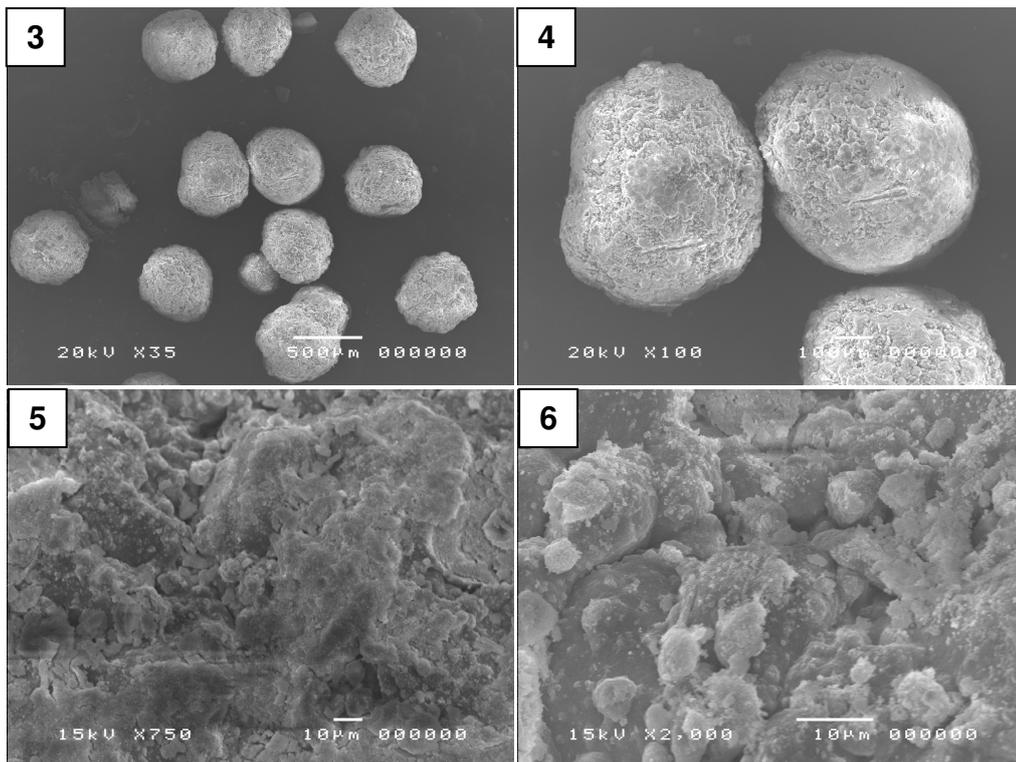
B) Avaliar a regeneração tecidual em torno e no interior das microesferas de HA, inseridas em defeitos ósseos críticos, realizados em calvária de rato, durante 15, 45, 90 e 120 dias, por meio de imagens de microscopia óptica.

C) Avaliar, por microscopia óptica, o biomaterial no interior da lesão ao longo do período experimental.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 BIOMATERIAL

O biomaterial utilizado neste estudo foi desenvolvido, produzido e cedido pelo Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF). Este foi preparado a partir de uma suspensão aquosa de HA e alginato de sódio (Sigma-Aldrich), na proporção de 15:1. Esta mistura foi gotejada em uma solução de cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 - 0,15 \text{ M}$), utilizando-se uma única seringa para formar microesferas com diâmetro entre 400 e 600 μm . Após 24 h de incubação, em temperatura ambiente, estas foram recolhidas com uma peneira apropriada e, em seguida, sinterizadas em rampa de aquecimento até 1100 °C. Esta etapa inclui a manutenção do material na temperatura de 300 °C por 2 h, para remoção do alginato. Este biomaterial foi caracterizado, por meio de MEV e MET de acordo com as figuras 3-6 e 7.



Figuras 3-6. Imagens de MEV das microsferas sinterizadas, que mostram a morfologia e textura do material, em diferentes aumentos. A figura 6 mostra que a superfície do material é bastante rugosa, considerando-se a dimensão típica de uma célula (eletromicrografias cedidas por pesquisadores do CBPF).

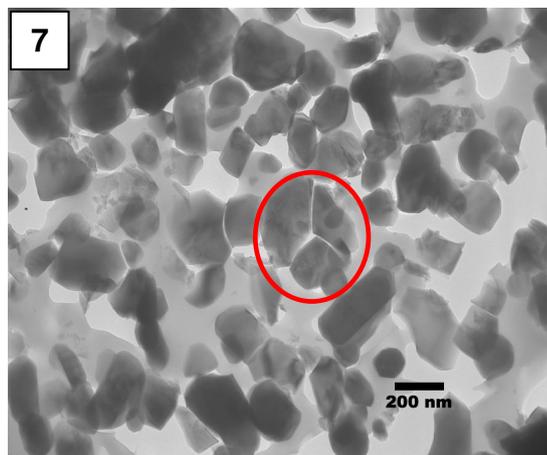


Figura 7. Imagem por MET que mostra a disposição dos cristais de HA após tratamento térmico. Notar que o material não foi homogeneamente sinterizado, pois alguns cristais se encontram individualizados no interior da estrutura. A elipse destaca uma região do biomaterial em que a sinterização foi efetiva. A amostra foi incluída em resina epóxi e cortada em ultramicrotomo (SALEM, 2006).

4.2 GRUPO EXPERIMENTAL

Esta pesquisa foi realizada de acordo com as normas de conduta em experimentação animal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), após a aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) dessa instituição (ofício em anexo).

Neste estudo, foram utilizados 48 *Rattus norvegicus* da linhagem wistar, albinos, machos, adultos, com massa corpórea entre 350 e 420 g, fornecidos, criados e mantidos pelo Centro de Criação de Animais de Experimentação da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Durante todo o experimento, os animais receberam água *ad libitum* e ração sólida (Nuvital) e foram mantidos em espaço climatizado com fotoperíodo de 12-12 h, luz-escuro.

A amostra foi dividida aleatoriamente em dois grupos: grupo I (GI) – defeitos ósseos críticos realizados em calvária de rato sem implantação do biomaterial, caracterizando-o como controle; e grupo II (GII) – implantação de microesferas de HA sinterizadas em defeitos ósseos críticos, confeccionados cirurgicamente em calvária de rato (Tabela 1).

Período (dias) \ Grupo	15	45	90	120	Total
GI	06	06	06	06	24
GII	06	06	06	06	24
Total	12	12	12	12	48

Tabela 1. Distribuição de animais de acordo com os grupos e pontos biológicos (dias).

4.3 TÉCNICA CIRÚRGICA

A técnica cirúrgica empregada foi a mesma utilizada por Takagi e Urist (1982). Para a realização dos defeitos ósseos transfixados, os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de cloridrato de ketamina (Vetaset) na proporção de 0,12 mL/100 g de massa corpórea e analgesia e sedação com injeção intramuscular de cloridrato de xilazina (Copazine 2%) na proporção de 0,06 mL/100 g de massa corpórea. Logo após, os animais foram submetidos à tricotomia, seguida de antiseptia do campo operatório com álcool-iodado e posicionados em decúbito ventral para acesso à calvária. Em seguida, fez-se uma incisão cutânea bicoronal, com lâmina de bisturi nº. 15 (Bencton Dickinson) (Figura 8), com aproximadamente 3,0 cm de extensão, seguida de divulsão, com tesoura (Duflex) de ponta reta e romba, e elevação do retalho para acesso ao perióstio. Seguidamente, incisou-se o perióstio e, com uma espátula nº. 07 (Duflex) e pinça clínica (Duflex) (Figura 9), procedeu-se sua remoção para expor o tecido ósseo. Com uma fresa trefina (Dentoflex) de 8 mm de diâmetro, montada em contra-ângulo (Driller) com redução de 1:16, acoplado em motor cirúrgico (Driller BLM 350) de 1500 rpm, sob irrigação constante com solução fisiológica, confeccionou-se, na porção mediana da calvária, entre os vértices das suturas anterior e posterior, o defeito ósseo circular transfixado com aproximadamente 1,0 mm de espessura (Figuras 10 e 11). Por fim, as microesferas, previamente esterilizadas em autoclave a 120 °C por 30 min, foram implantadas em toda a extensão do defeito (Figura 12), seguida pela reposição e sutura do retalho com fio de seda 4.0 (Ethicon – Johnson & Johnson) (Figura 13).

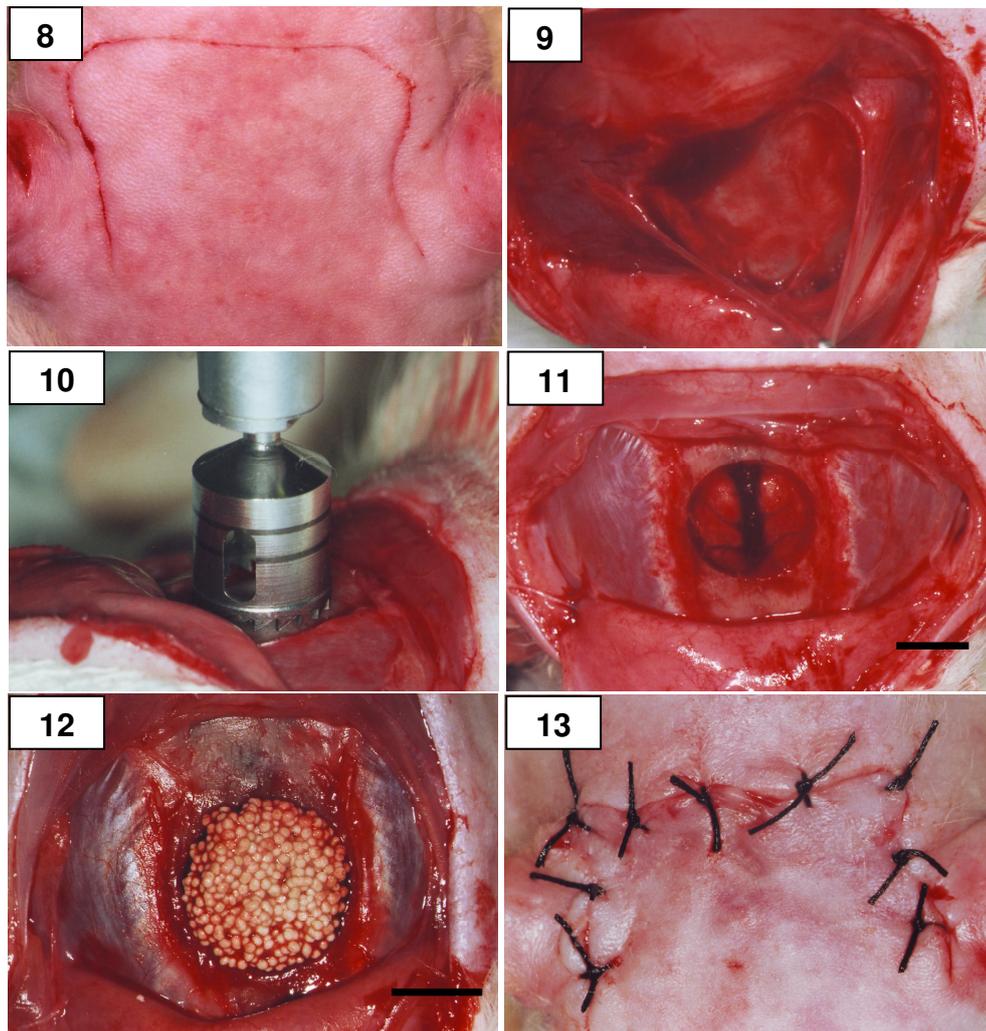


Figura 8. Incisão bicoronal cutânea. Figura 9. Remoção do periósteo. Figura 10. Confeção de defeito ósseo com fresa trefina. Figura 11. Defeito ósseo confeccionado. Figura 12. Implantação do biomaterial. Figura 13. Sutura do retalho cutâneo. Barra = 4 mm.

4.4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Decorridos 15, 45, 90 e 120 dias de pós-operatório, os animais foram sacrificados, com de injeção letal de cloridrato de quetamina via peritoneal. Em seguida, removeu-se a porção superior da calvária, descartando-se todo o tecido mole, com exceção da dura-máter e periósteo. Para isto, utilizou-se espátula nº. 07 e pinça clínica, um alicate de corte (Duflex) e tesoura com ponta reta. Os espécimes

obtidos foram fixados em álcool 70% (etapa I – de acordo com o Tabela 2) em recipientes plásticos identificados.

Previamente ao processamento histológico, procedeu-se à redução dos espécimes com disco de carborundum nº. 409, acoplado a um mandril e a um motor elétrico rotativo (Dremel). Em seguida, cortou-se, transversalmente, a porção anterior da calvária, excluindo cerca de 2 mm do defeito ósseo. Lateralmente e posteriormente, inclui-se aproximadamente 2 mm do tecido ósseo adjacente ao defeito ósseo (Figura 14). Na preparação destinada à inclusão com resina Epóxi, durante o seccionamento da calvária, tomou-se a precaução de irrigar o espécime com solução fixadora do tipo Karnovsky (ver detalhes adiante).

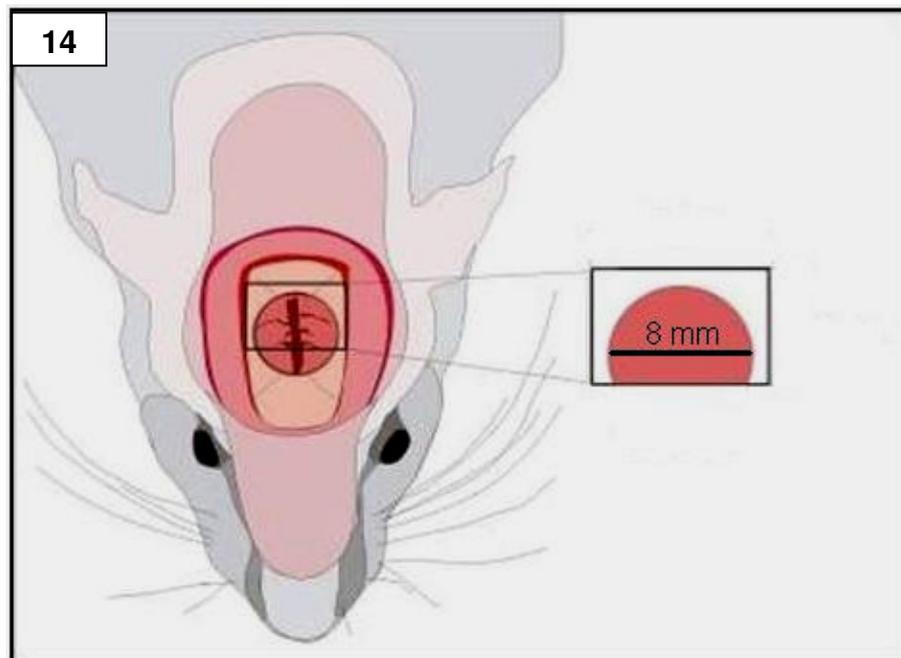


Figura 14. Vista dorsal da região de seleção do espécime (Adaptado de BARRETO, 2006).

4.5 ETAPA LABORATORIAL

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais (LBTB) do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da UFBA. Inicialmente, as amostras previamente fixadas em etanol (cinco animais de cada ponto biológico do GI e GII), foram desidratadas (etapas II, III e IV), e clarificadas (etapa V), como mostrado na Tabela 2, e posteriormente infiltradas em três soluções diferentes (etapas VI, VII e VIII), descritas na tabela 3. Após estas etapas, seguiu-se a inclusão dos espécimes em resina metil-metacrilato. Para isto, 2,0 mL da solução III foram adicionados em frascos de vidro, diâmetro de 26 mm e 45 mm de altura, com tampa rosqueável de plástico, e levados à estufa com temperatura de 39 °C, por dois dias, para formar uma base onde as calvárias foram posteriormente incluídas e estabilizadas, de modo que a região anterior da calvária ficasse voltada para esta base. Após o endurecimento da base, adicionou-se aproximadamente 6 mL da solução III para submergir toda a amostra. Em seguida, os frascos foram fechados e permaneceram, durante três dias, na estufa à 39 °C para polimerização da resina. Em seguida, os blocos foram recortados com um disco polidor nº. 520 (Dremel) para retirar os excessos de resina e possibilitar o seu acoplamento no micrótomo (Leica RM 2255).

Etapas	Solução	Dias
I	Álcool 70%	02
II	Álcool 95%	02
III	Álcool 100%	01
IV	Álcool 100%	01
V	Xilol	01
VI	Solução I	02
VII	Solução II	02
VIII	Solução III	01

Tabela 2. Protocolo de processamento histológico, em resina, dos espécimes. Todas as etapas foram feitas à temperatura de 4° C.

Substância	Solução I	Solução II	Solução III
Metil-Metacrilato	75 mL	75 mL	75 mL
Di-Butil-ftalato	25 mL	25 mL	25 mL
Peróxido de Benzoíla	-	1 g	25 g

Tabela 3. Composição das substâncias I, II e III.

Os blocos foram desbastados com o micrótomo até que a superfície do bloco apresentasse um tamanho equivalente a aproximadamente o diâmetro do defeito. Os cortes utilizados no presente trabalho correspondem à região da amostra demonstrada na figura 15.

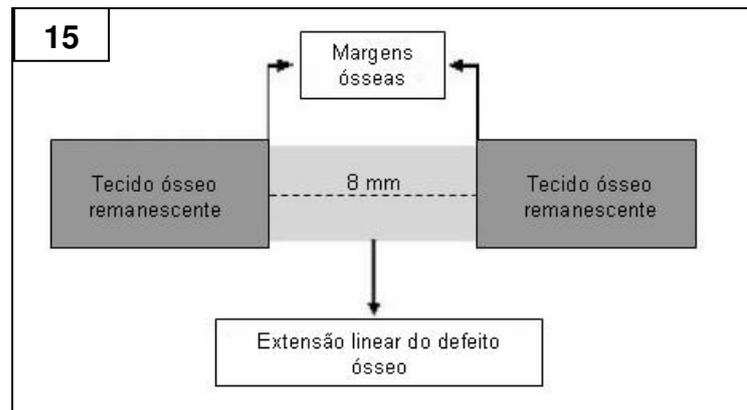


Figura 15. Diagrama esquemático da vista transversal da extensão linear do defeito ósseo com 8 mm de extensão, exemplificando o caso da lesão original (Adaptado de MIGUEL *et al.*, 2006). Este esquema representa o que é visto pelo observador olhando diretamente a superfície de corte do material. No caso deste trabalho, sempre orientamos a região voltada para a dura-máter para baixo.

Os cortes histológicos (6 μm de espessura) foram corados com hematoxilina e eosina (HE), Tricrômico de Masson Goldner (Goldner) para evidenciar o tecido mineralizado e o tecido conjuntivo frouxo, e Picrossírius para destacar as fibras de colágeno. Realizou-se, ainda, em um animal de cada ponto biológico do GI e GII, fixação em solução fixadora do tipo de Karnovsky (glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 2 horas em temperatura ambiente), lavagem em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M por três vezes (pH entre 7,2 e 7,4) por 10 min cada. A região da calvária foi dividida em quatro partes de tamanhos similares com o auxílio de uma lâmina de aço. Duas partes da amostra da calvária foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,2 M por 60 min no escuro. Após esta fase, o material foi lavado no tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Posteriormente, estas amostras passaram pelo processo de desidratação em concentrações crescentes de acetona: 15%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100% (duas vezes) e absoluta por 10 min. A infiltração foi realizada gradativamente, com proporções crescentes (1:3; 1:2; 1:1 e pura) de resina (Polybed 812[®] Polyciences) com duração de 12 h cada. Em seguida, as

amostras foram incluídas individualmente em fôrmas de silicone e mantidas em estufa a 60°C por 48 h para a polimerização da resina. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz) de Salvador.

Posteriormente, no Laboratório de Biomineralização do ICB da UFRJ, alguns destes blocos foram serrados com serra de ourives e polidos, em presença de água abundante, com lixa de carbetto de silício nº. 2000. Em seguida, estes foram fixados em lâmina de vidro, por meio de cola à base de etil-cianoacrilato (Super Bonder[®]), lixados e polidos em água corrente, respectivamente, com lixa de carbetto de silício nº. 220 e lixa de carbetto de silício nº. 2000, corados, analisados e fotografados. Foram executados, ainda, em outros blocos, cortes semi-finos (em torno de 2,5 µm) realizados em ultramicrótomo (Sorvall Porter-Blum MT2B Ultramicrotome) com faca de diamante (Diatome). Estas amostras foram coradas utilizando-se azul de Richardson; e azul de toluidina com fucsina básica.

As observações foram realizadas em microscópio óptico (Zeiss Axioplan), por campo claro, contraste diferencial interferencial de Nomarski e microscopia de polarização utilizando compensador “vermelho de primeira ordem” para evidenciar birrefringência. Todas as fotomicrografias foram obtidas com câmera CCD (Evolution[®] MP 5,0 Color Media Cybernetics) acoplada ao microscópio óptico no Laboratório de Biomineralização do ICB da UFRJ.

5 RESULTADOS

5.1 GI – PONTO BIOLÓGICO DE 15 DIAS

Aos 15 dias, observou-se inflamação crônica discreta e proliferação vascular em toda a extensão do defeito (Figuras 16 e 17). Notou-se também proliferação de fibroblastos, organizados paralelamente, responsáveis pela síntese de tecido conjuntivo fibroso (Figura 19). Foi observada, ainda, ossificação reparativa, restrita às bordas ósseas do defeito (Figuras 16, 18 e 19).

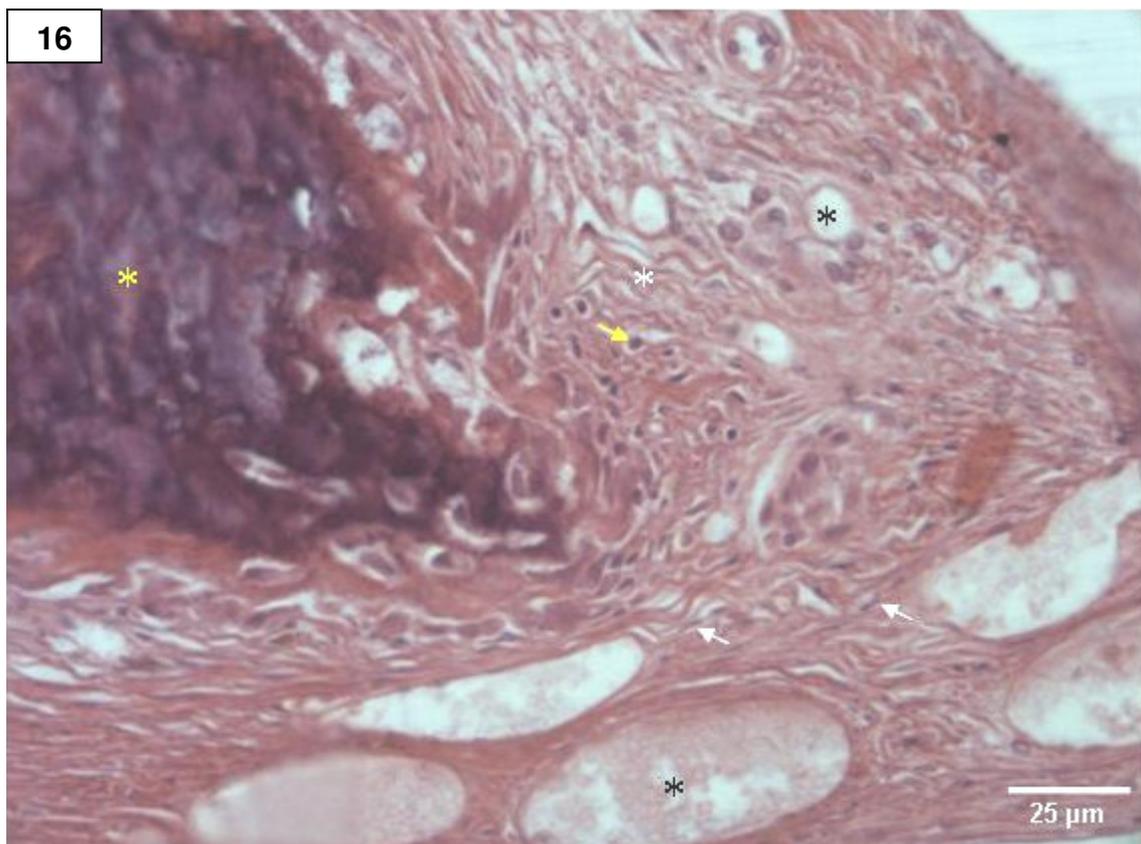


Figura 16. Vasos sangüíneos (asterisco preto), células inflamatórias (seta amarela), fibroblastos (seta branca), tecido conjuntivo (asterisco branco) e formação de ossificação reparativa contígua à margem óssea, indicado por asterisco amarelo (GI 15 dias – HE).

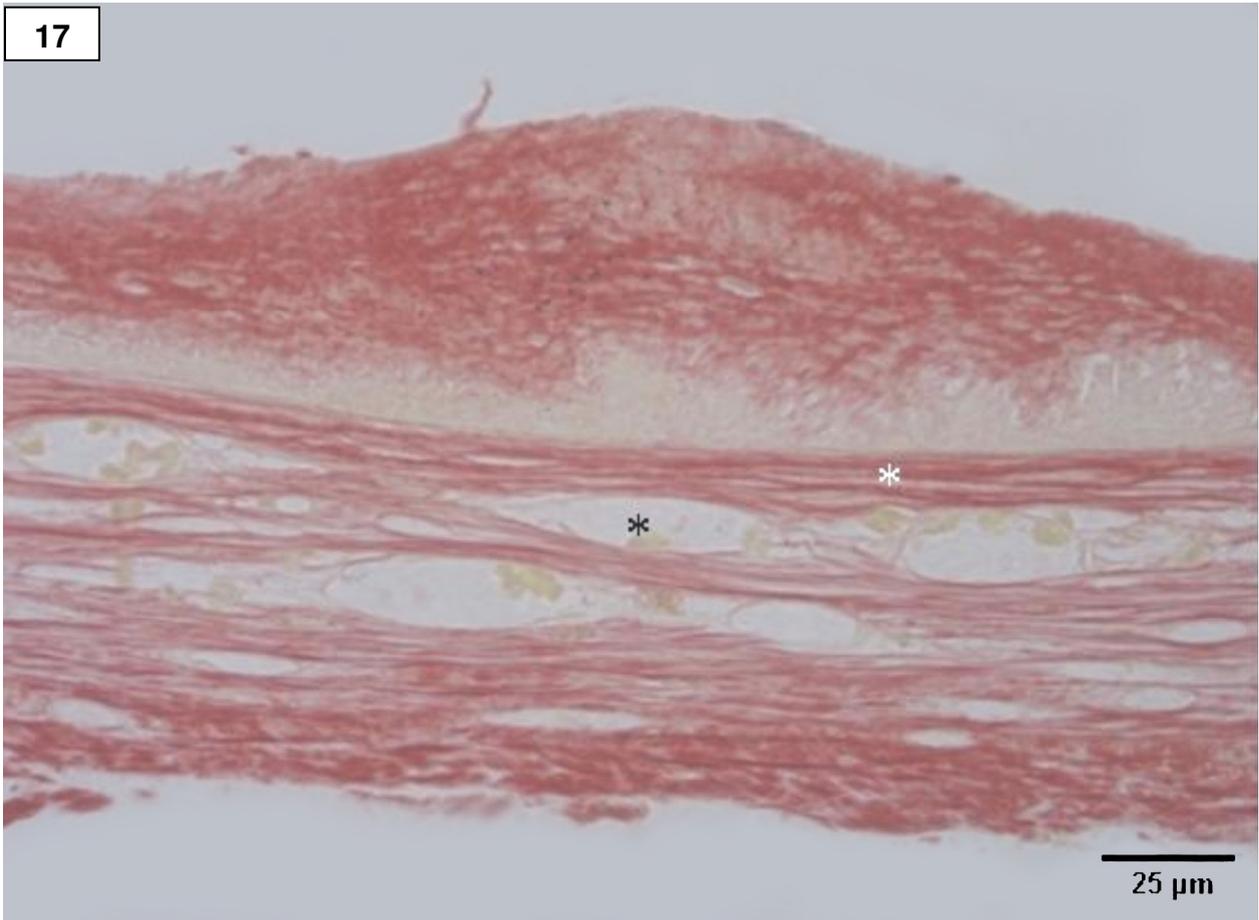
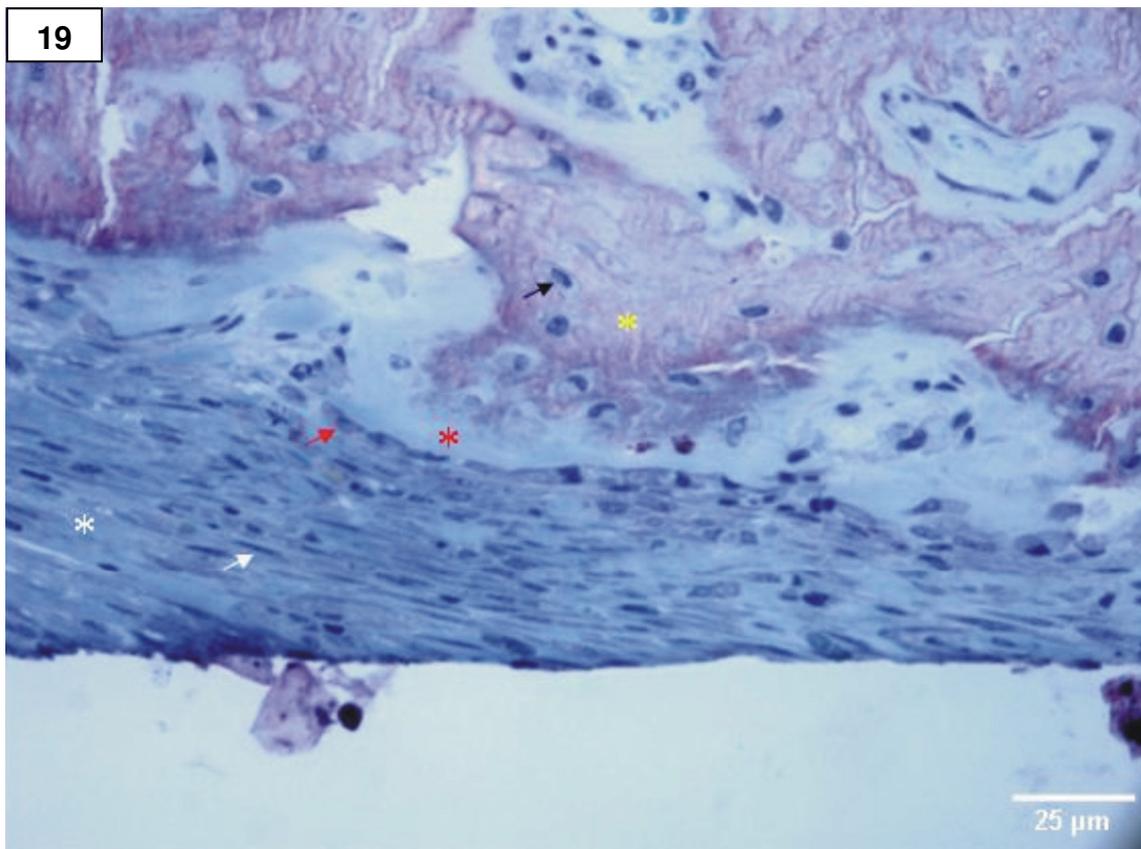
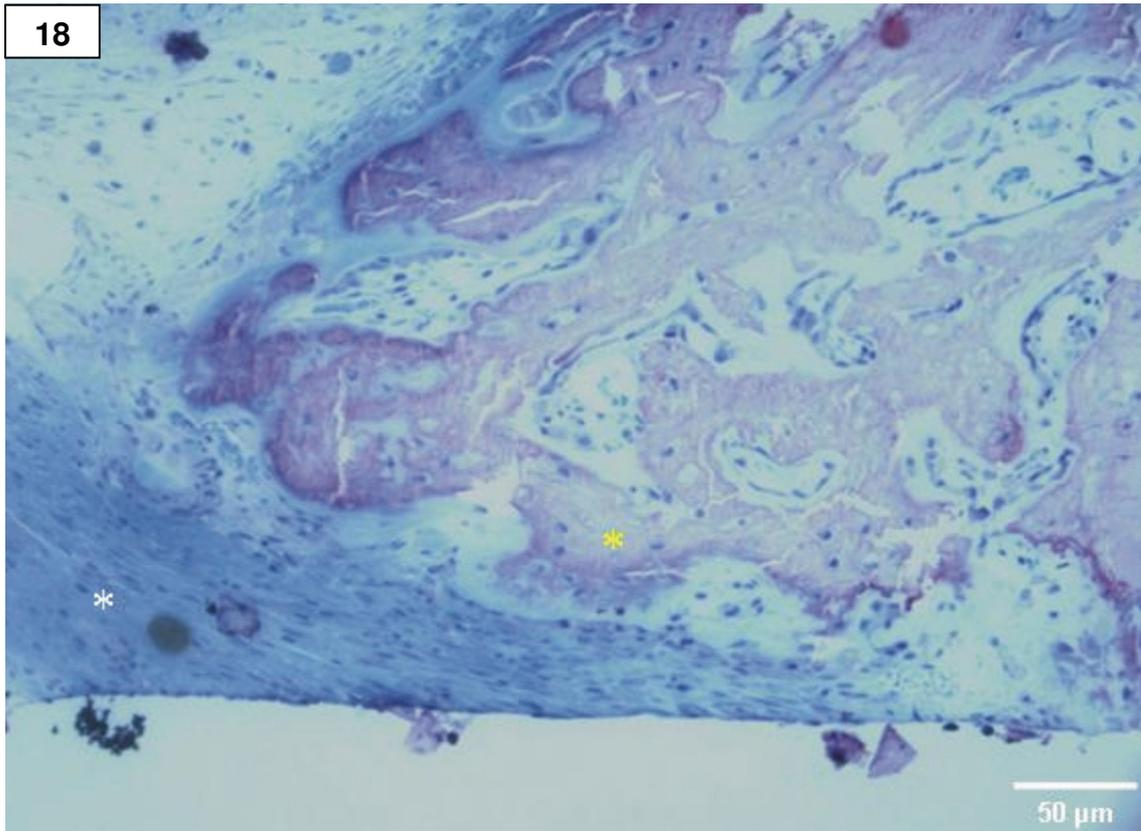


Figura 17. Fibras de colágeno (asterisco branco) e vasos sangüíneos (asterisco preto) na região central do defeito (GI 15 dias – Picrossírius).



Figuras 18 e 19. Fibroblastos (seta branca) e tecido conjuntivo fibroso (asterisco branco) próximos à borda óssea (asterisco amarelo). Pode-se observar a produção de matriz osteóide (asterisco vermelho) pelos osteoblastos (seta vermelha) e os osteócitos (seta preta) (GI 15 dias – Azul de toluidina e fucsina básica).

5.2 GI – PONTO BIOLÓGICO DE 45 DIAS

Neste ponto biológico, foram identificadas poucas células inflamatórias, e a vascularização mostrou-se evidente nas bordas ósseas (Figuras 20 e 21). Os fibroblastos mostraram-se arranjados de forma paralela entre si, acompanhados por tecido conjuntivo fibroso mais denso em relação ao período anterior. Na área central do defeito, este tecido apresentou-se delgado (Figura 22). A neoformação óssea manteve-se restrita às margens ósseas do defeito (Figuras 20 e 21).

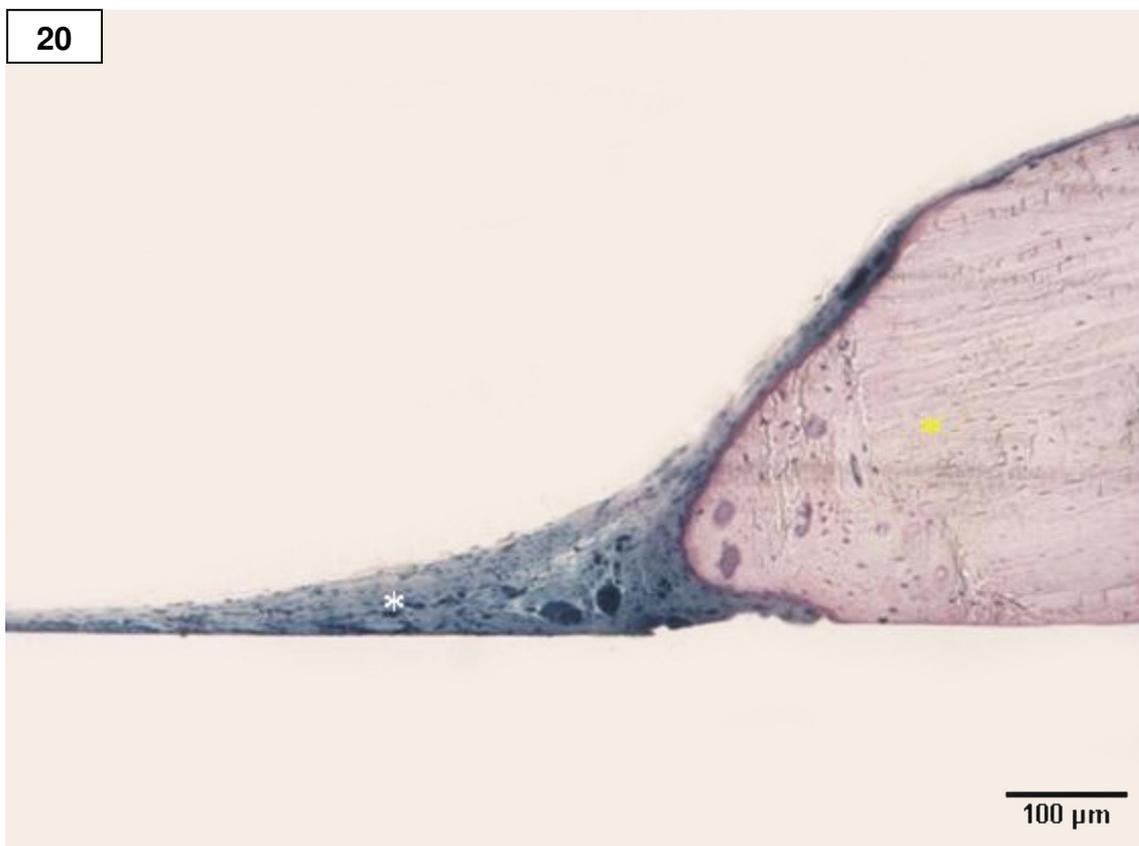


Figura 20. Tecido conjuntivo fibroso na região do defeito ósseo (asterisco branco) e borda óssea (asterisco amarelo) (Azul de toluidina e fucsina básica – GI 45 dias). A região de osso neoformado é facilmente observada na extremidade da borda óssea, pela desorganização do arranjo fibrilar, quando comparado ao do osso original.

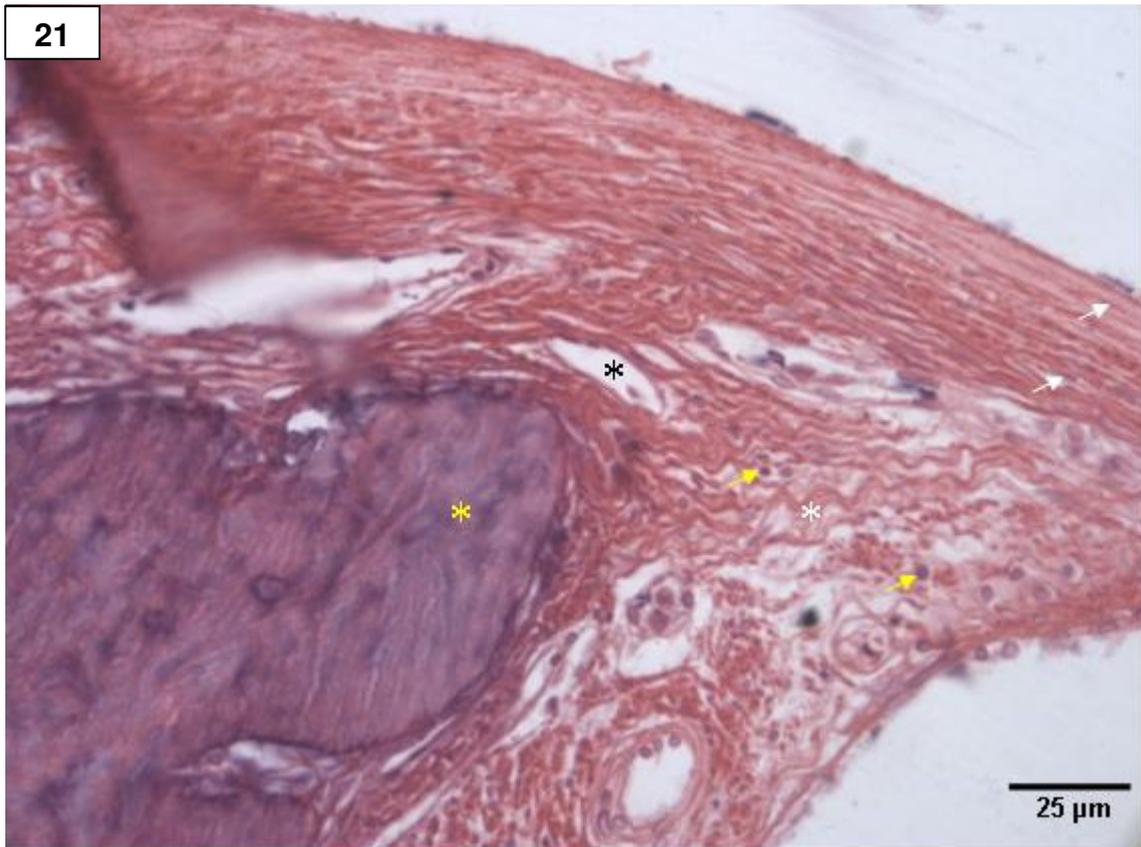


Figura 21. Presença de vasos sangüíneos (asterisco preto), fibroblastos (seta branca) e tecido conjuntivo fibroso (asterisco branco), e poucas células inflamatórias (seta amarela) próximo à borda óssea, indicada por asterisco amarelo (G1 45 dias – HE).

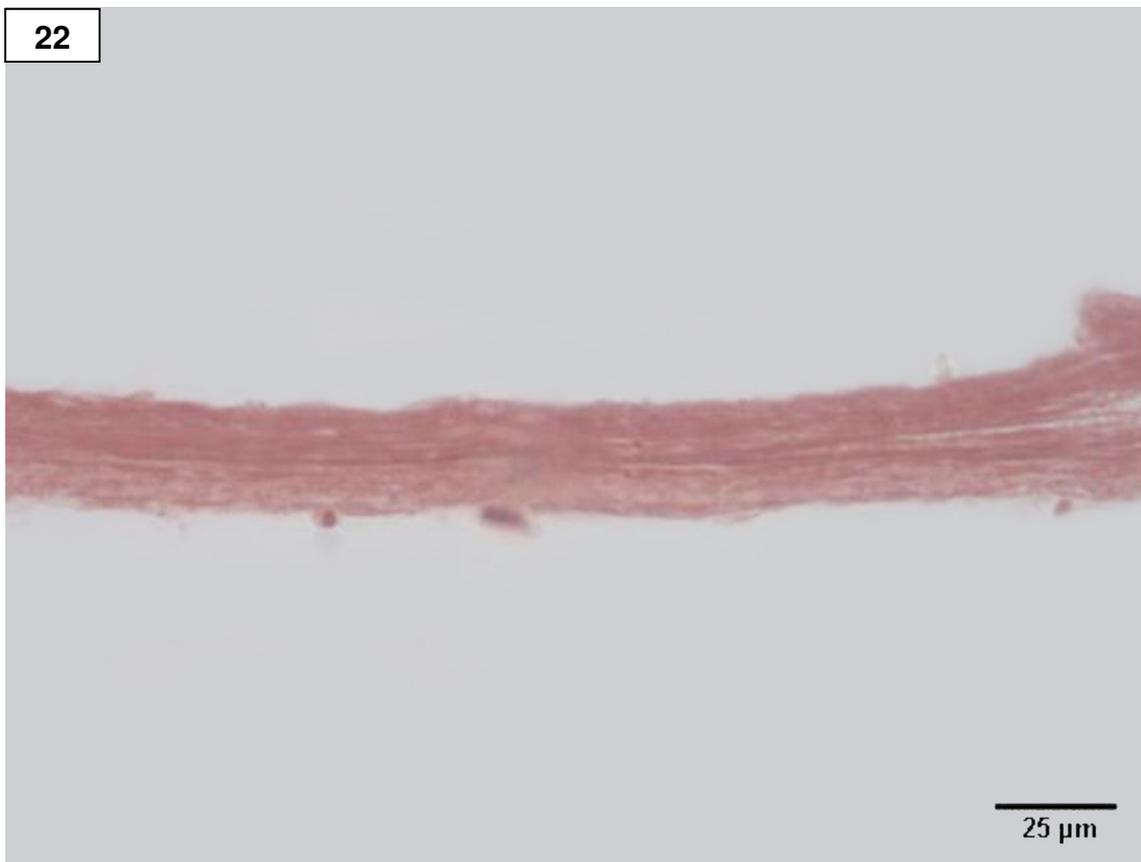


Figura 22. Tecido conjuntivo fibroso formado na região central do defeito (G1 45 dias – HE).

5.3 GI – PONTO BIOLÓGICO DE 90 DIAS

A proliferação vascular neste período mostrou-se moderada e mais acentuada nas proximidades das bordas ósseas (Figura 23). Os fibroblastos permaneceram organizados paralelamente entre si associados ao tecido conjuntivo fibroso denso, em toda a extensão do defeito (Figura 25), exceto nas margens ósseas, onde foi observada neoformação reparativa (Figuras 23 e 24) de forma semelhante aos pontos biológicos anteriores.



Figura 23. Borda óssea (asterisco amarelo) e região do defeito preenchida por tecido conjuntivo fibroso (asterisco branco) e vaso sanguíneo (asterisco preto) (GI 90 dias – Azul de toluidina e fucsina básica).

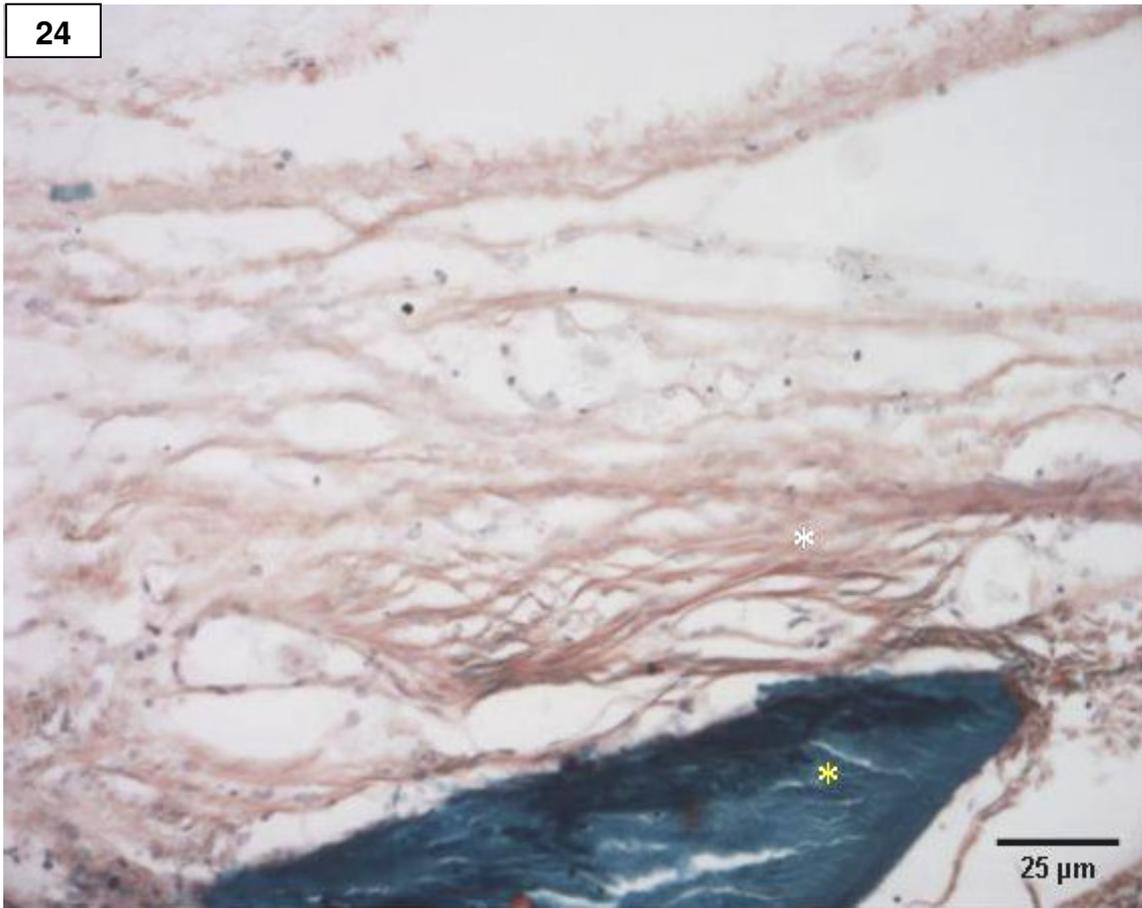


Figura 24. Fibras de colágeno (asterisco branco) e formação de tecido ósseo (asterisco amarelo) em contigüidade à margem óssea (GI 90 dias – Goldner).

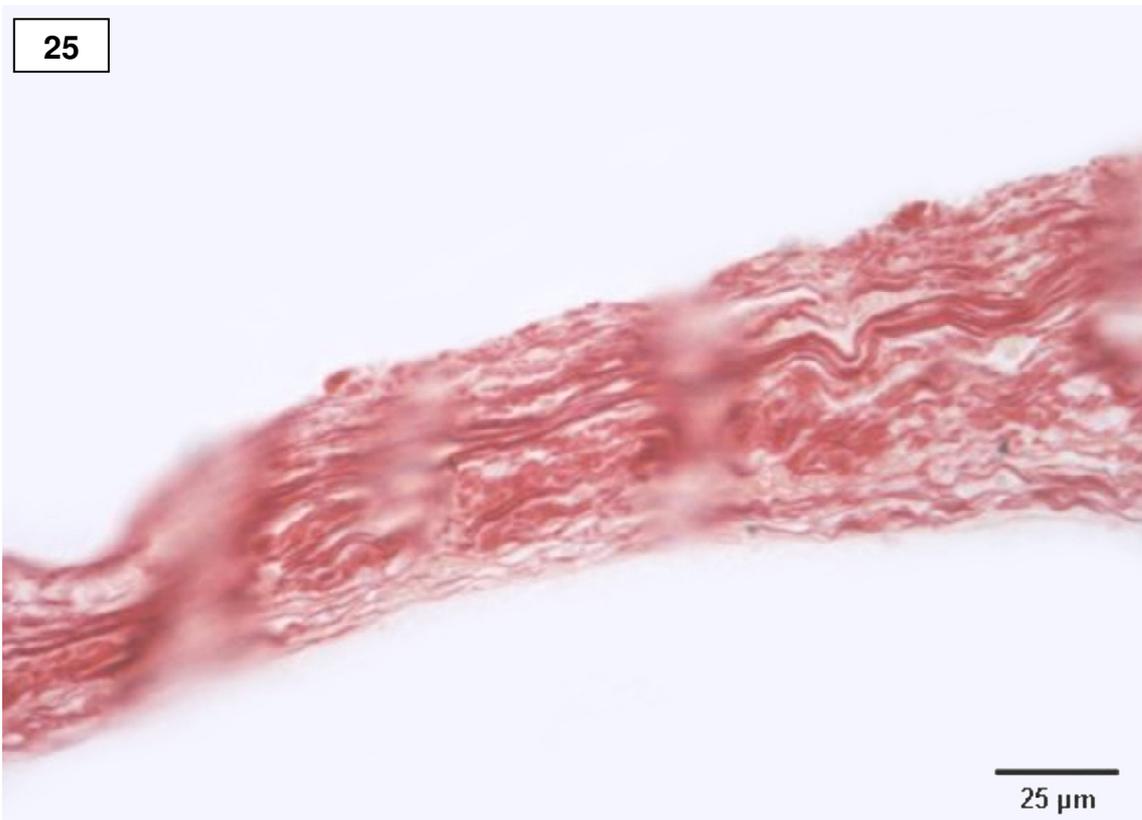


Figura 25. Tecido conjuntivo fibroso situado na região central do defeito (GI 90 dias – Picrossírius).

5.4 GI – PONTO BIOLÓGICO DE 120 DIAS

Aos 120 dias, a proliferação vascular mostrou-se presente, porém discreta. Em toda a extensão do defeito, foram observados fibroblastos arranjados paralelamente entre si (Figura 26) e a fibrose apresentou-se densa, com redução da espessura da área reparadora (Figura 28). A neoformação óssea permaneceu restrita às bordas ósseas do defeito (Figuras 26 e 27).

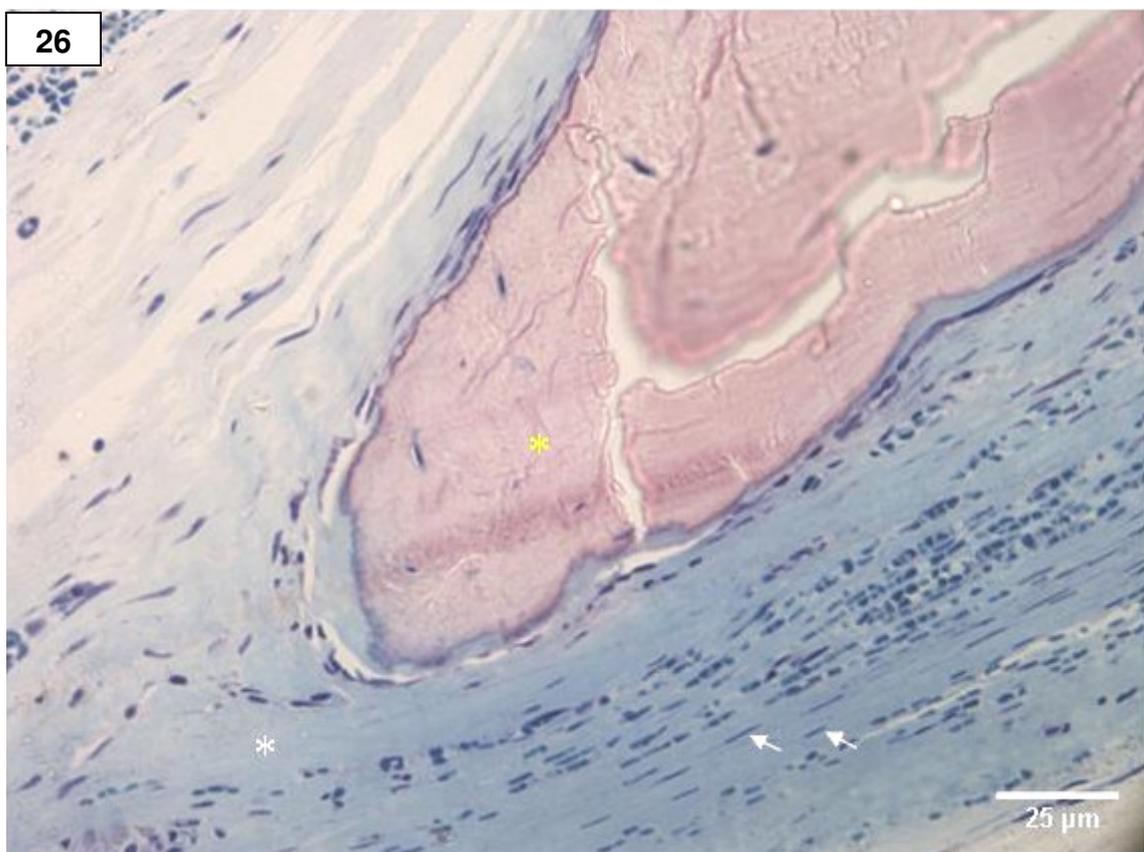


Figura 26. Fibroblastos arranjados paralelamente entre si (seta branca) e formação de tecido conjuntivo fibroso nas proximidades da borda óssea, indicada por asterisco amarelo (GI 120 dias – Azul de toluidina e fucsina básica).

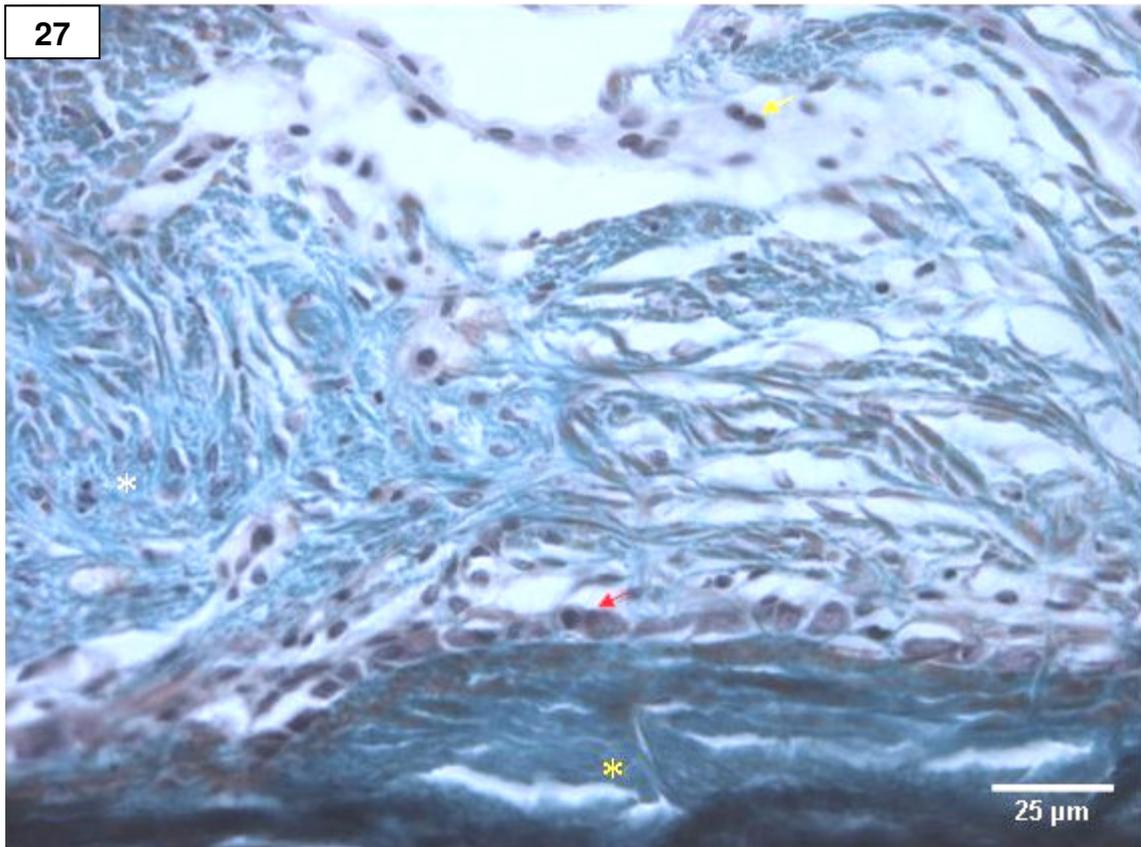


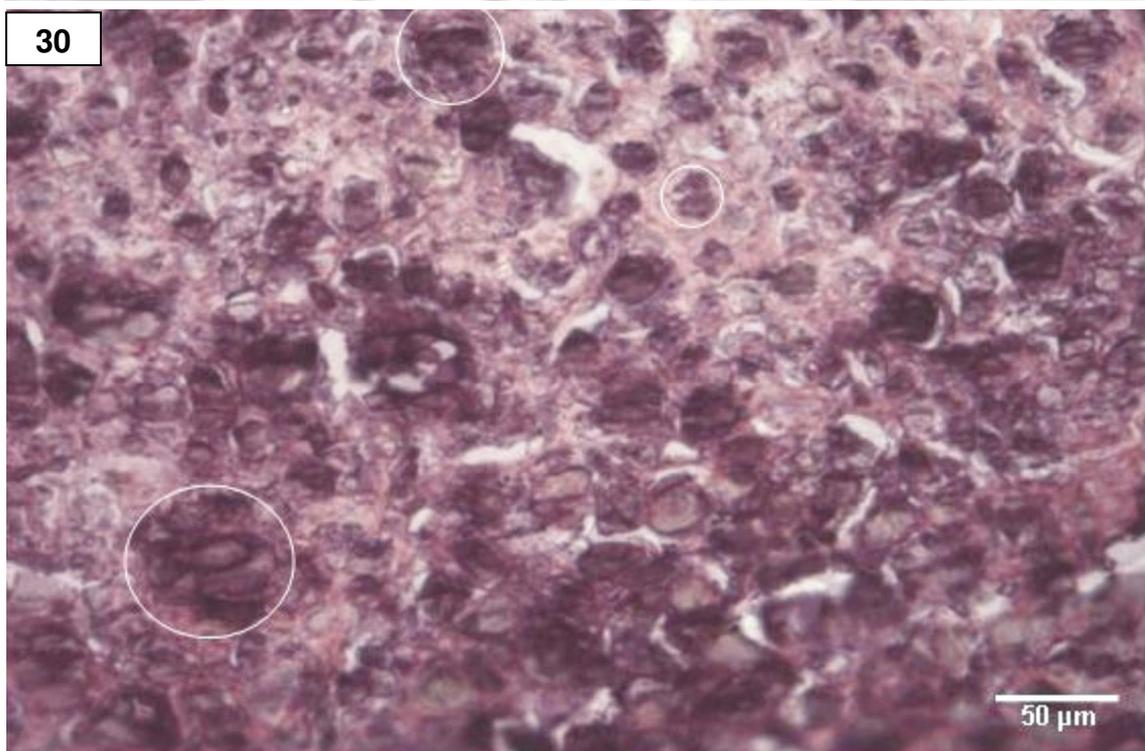
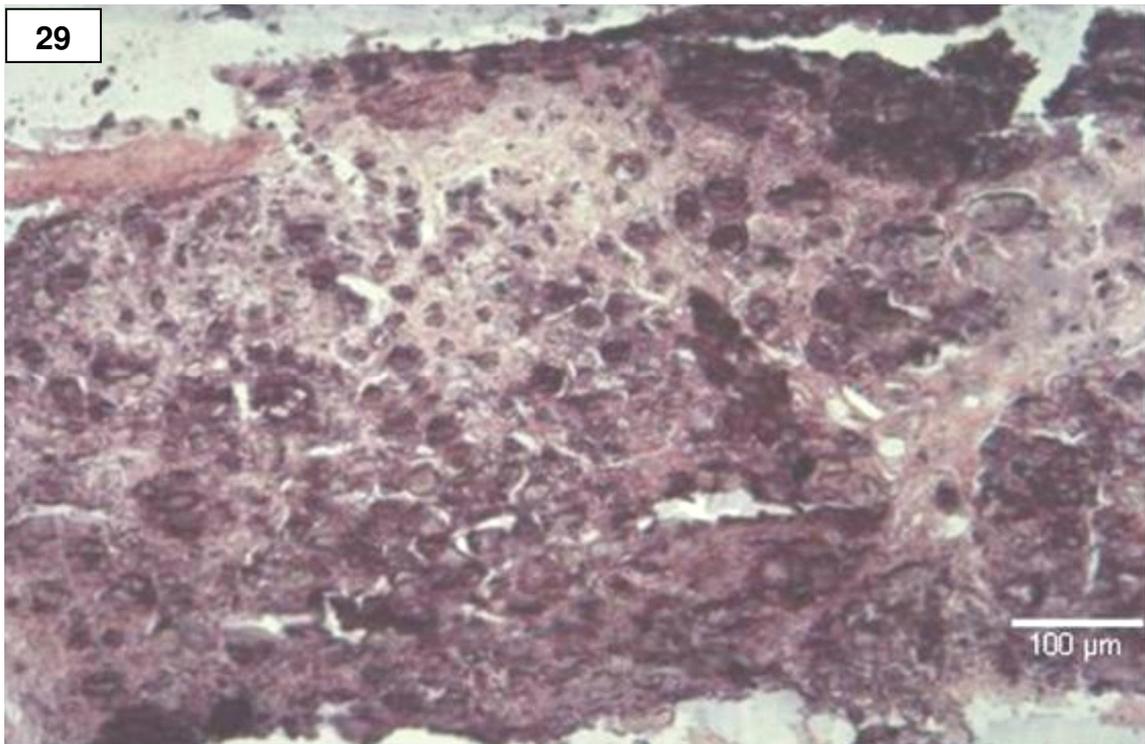
Figura 27. Osteoblastos (seta vermelha) na borda óssea (asterisco amarelo) e presença de tecido conjuntivo fibroso (asterisco branco) e células inflamatórias, indicadas por seta amarela (GI 120 dias – Goldner).



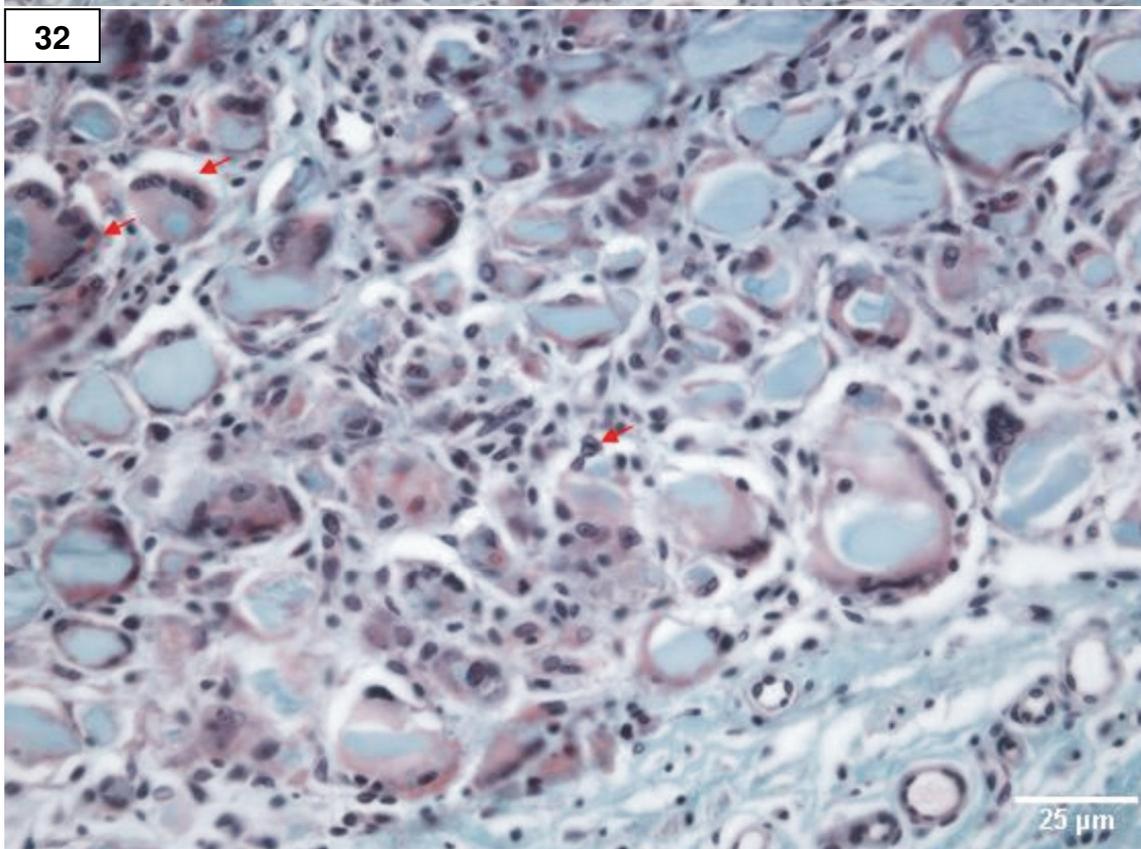
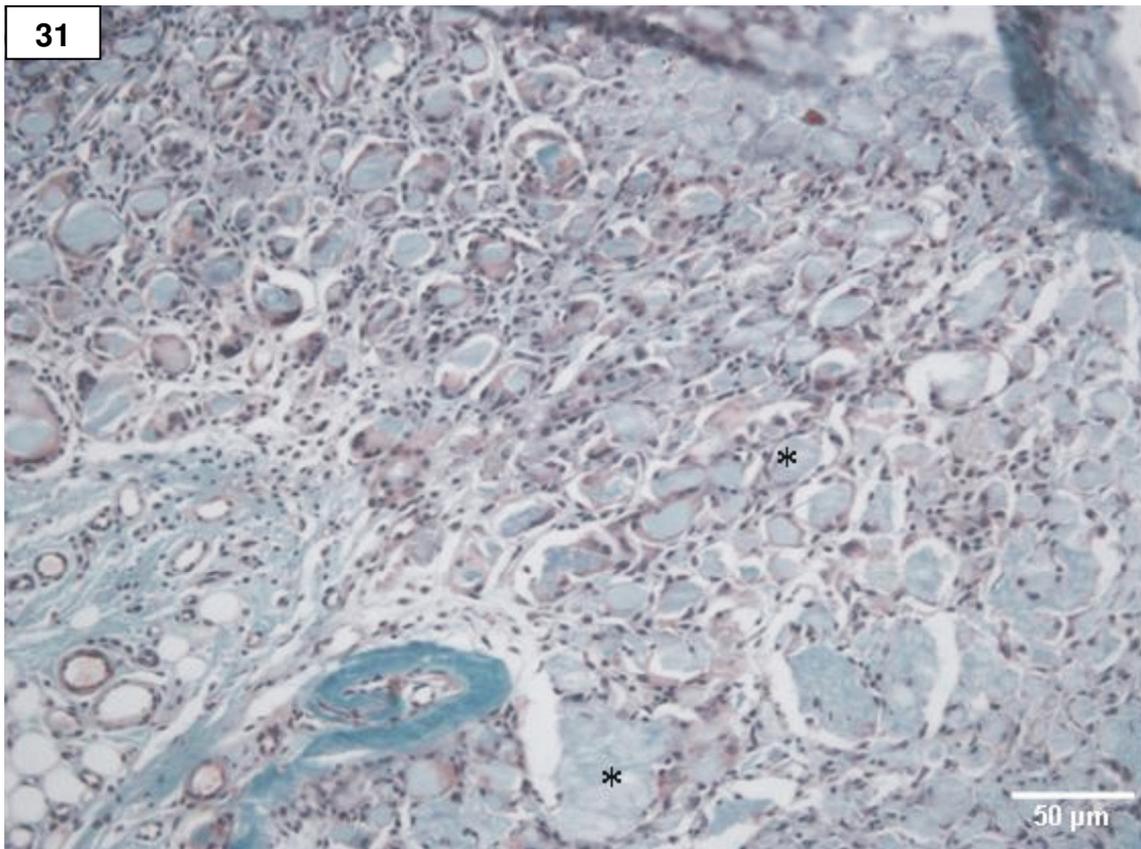
Figura 28. Tecido conjuntivo fibroso denso na região de confecção do defeito ósseo (GI 120 dias – HE).

5.5 GII (DEFEITOS PREENCHIDOS COM ESFERAS DE HA) – PONTO BIOLÓGICO DE 15 DIAS

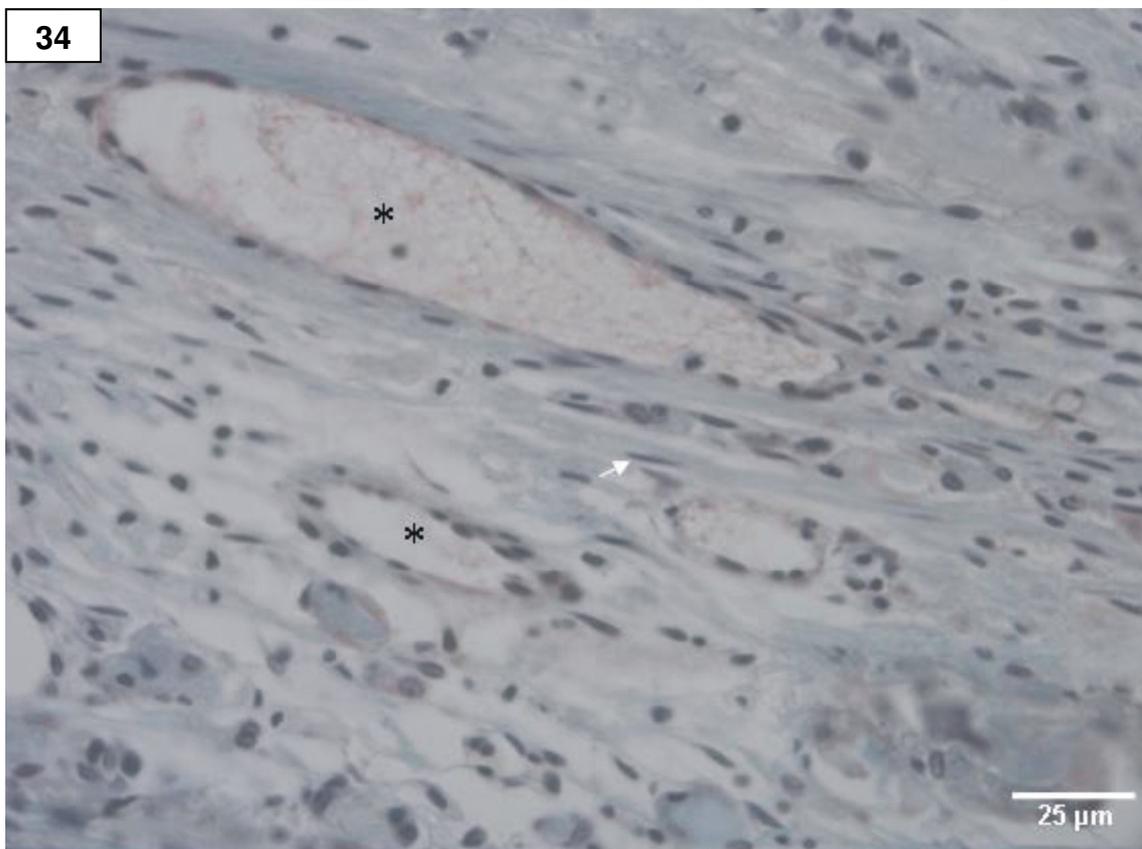
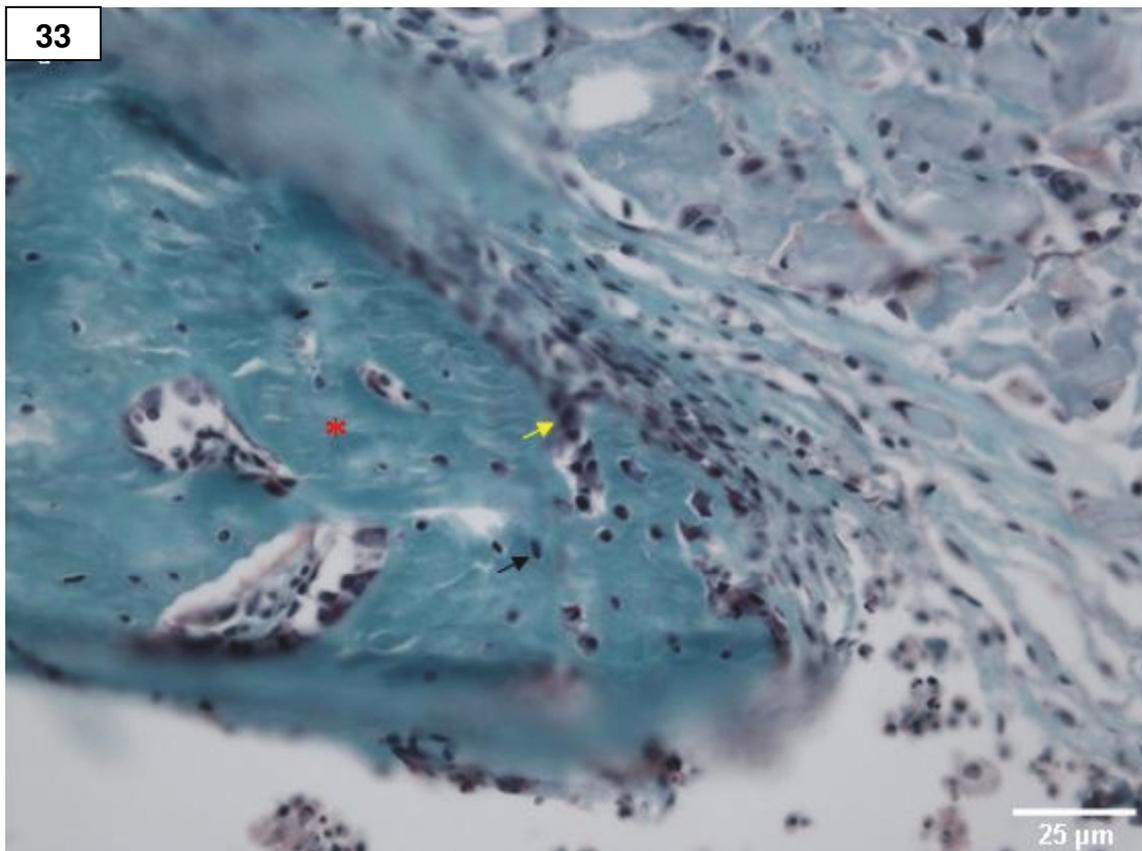
Neste ponto biológico, o defeito ósseo mostrou-se preenchido pelo biomaterial, na maioria das vezes, em monocamada e, eventualmente, em múltiplas camadas. Ocasionalmente, o defeito apresentou-se vazio, devido ao deslocamento das microesferas. Este padrão de preenchimento persistiu por todos os pontos biológicos estudados. Algumas microesferas encontraram-se fragmentadas (Figuras 29 e 30), principalmente na região periférica à superfície, e esta fragmentação mostrou-se mais acentuada nas esferas próximas à borda óssea. Em toda a extensão do defeito e em associação às esferas fragmentadas, notou-se inflamação crônica granulomatosa (Figuras 31 e 32). A proliferação vascular (Figura 34) foi observada em toda a extensão do defeito, especialmente na superfície supra-dural, principalmente próximos às bordas ósseas, com formação de tecido de granulação. Também, foi observada proliferação de fibroblastos, com síntese de tecido conjuntivo fibroso (Figura 34). As fibras de colágeno arranjaram-se como finos septos (Figuras 35 e 36), circundando as microesferas, os quais pareciam migrar em direção centrípeta. Em associação às bordas ósseas, notou-se neoformação tecidual óssea discreta (Figura 33). Em apenas uma das cinco amostras analisadas, notou-se presença de tecido ósseo na região central do defeito (não mostrado). Isto foi interpretado como possível contaminação durante o procedimento cirúrgico.



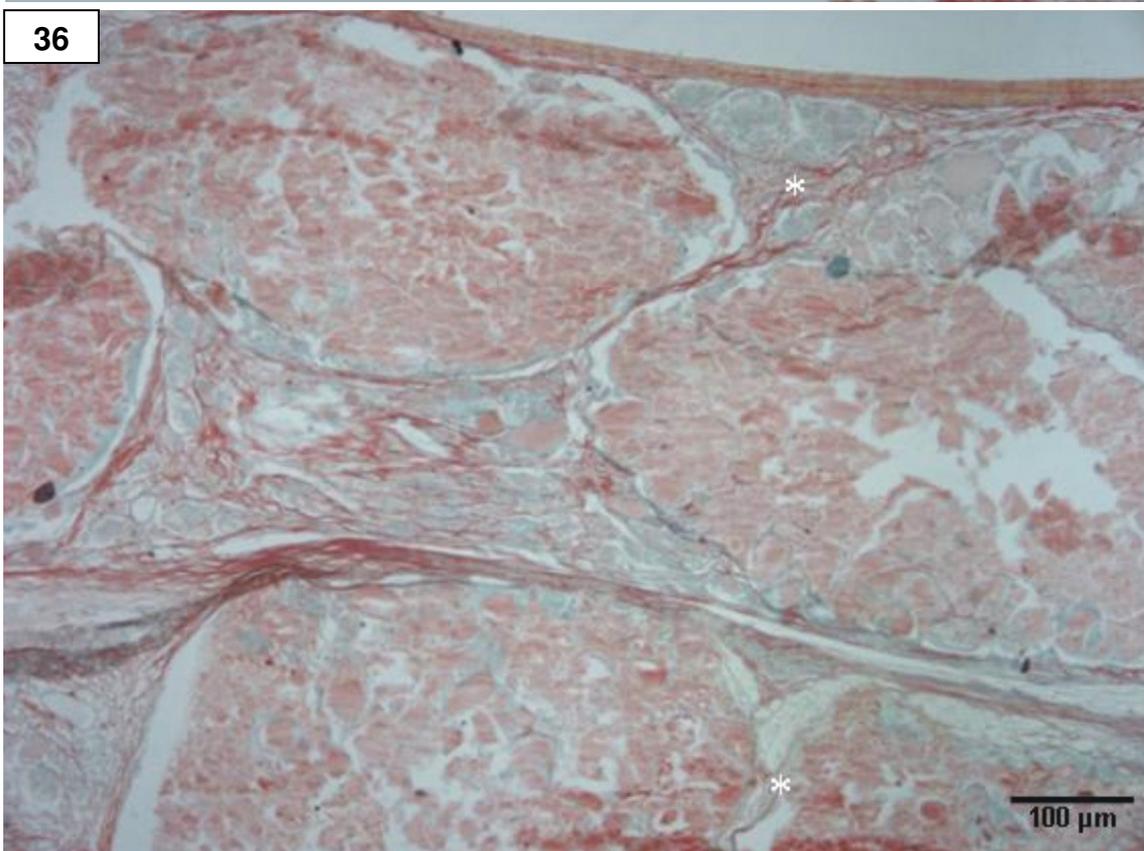
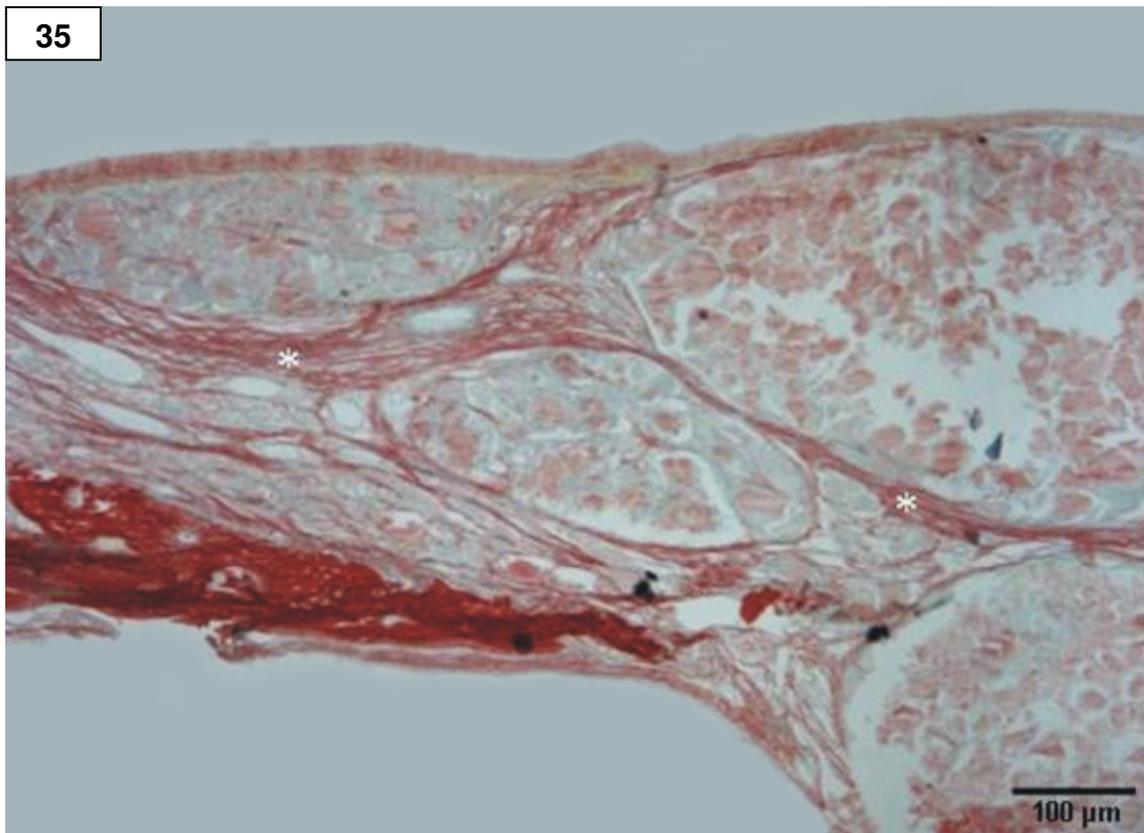
Figuras 29 e 30. Fragmentação do biomaterial de forma não homogênea na região próxima à borda óssea. Notar a diferença de tamanho das partículas do biomaterial. A figura 30 apresenta círculo que delimita algumas partículas com diferentes tamanhos (GII 15 dias – HE).



Figuras 31 e 32. Observar fragmentação do biomaterial (asteriscos) e presença de células inflamatórias (seta) entre os fragmentos do biomaterial, sendo que algumas estão aderidas a estes. No lado superior esquerdo, na figura 32, células gigantes estão indicadas por seta. Em paralelo ao processo inflamatório, observou-se formação de tecido ósseo (Figura 31) (GII 15 dias – Goldner).



Figuras 33 e 34. Notar a formação de tecido ósseo reparativo (asterisco vermelho) nas proximidades da borda óssea com osteoblastos (seta amarela) e osteócitos (seta preta) na figura 33. Observar, também, a presença de vasos sanguíneos (asterisco preto), células inflamatórias e fibroblastos (seta branca) na figura 34 nas adjacências da margem óssea (GII 15 dias – Goldner).



Figuras 35 e 36. Septos de tecido conjuntivo fibroso circundando o biomaterial, indicados por asteriscos (GII 15 dias - Picrossírius).

5.6 GII – PONTO BIOLÓGICO DE 45 DIAS

Aos 45 dias, a reação inflamatória crônica granulomatosa foi evidenciada em toda a extensão do defeito e mais abundante, com presença de células gigantes multinucleadas e escassos linfócitos (Figuras 40 e 41). Notou-se também proliferação vascular, de permeio às microesferas (Figura 37 e 42). Em toda a extensão do defeito, observou-se grande número de fibroblastos (Figura 41), os quais sintetizaram tecido conjuntivo fibroso (Figuras 40 e 43), que se apresentou mais denso e mais abundante próximo às margens ósseas (Figura 44). Circunjacente às microesferas, bem como entre os fragmentos destas, foram identificados septos fibrosos (Figuras 43 e 44). Próximo às bordas ósseas, a neoformação óssea manteve-se similar ao ponto biológico anterior (Figura 41). Ainda, as esferas apresentaram uma maior fragmentação de forma heterogênea quanto ao seu tamanho (Figuras 38, 39 e 42).

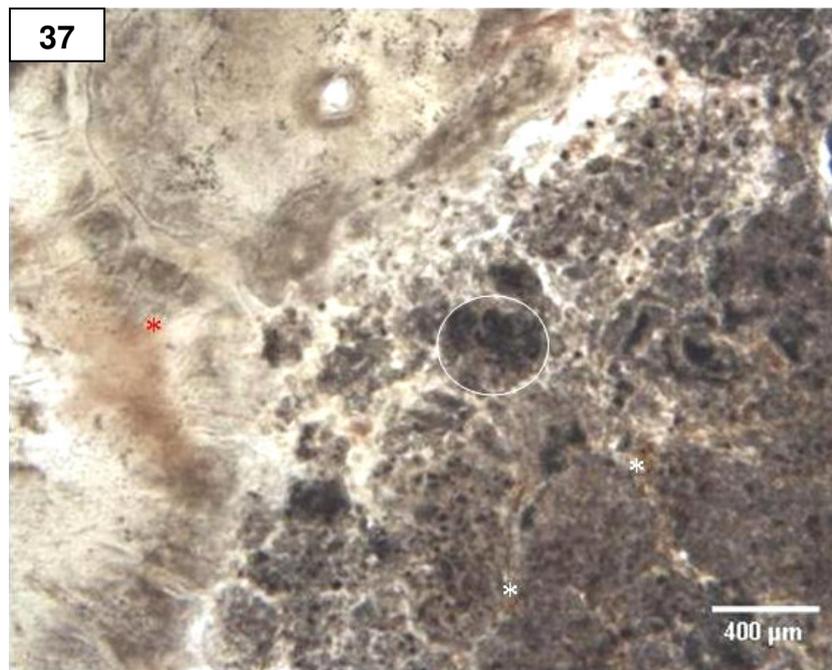
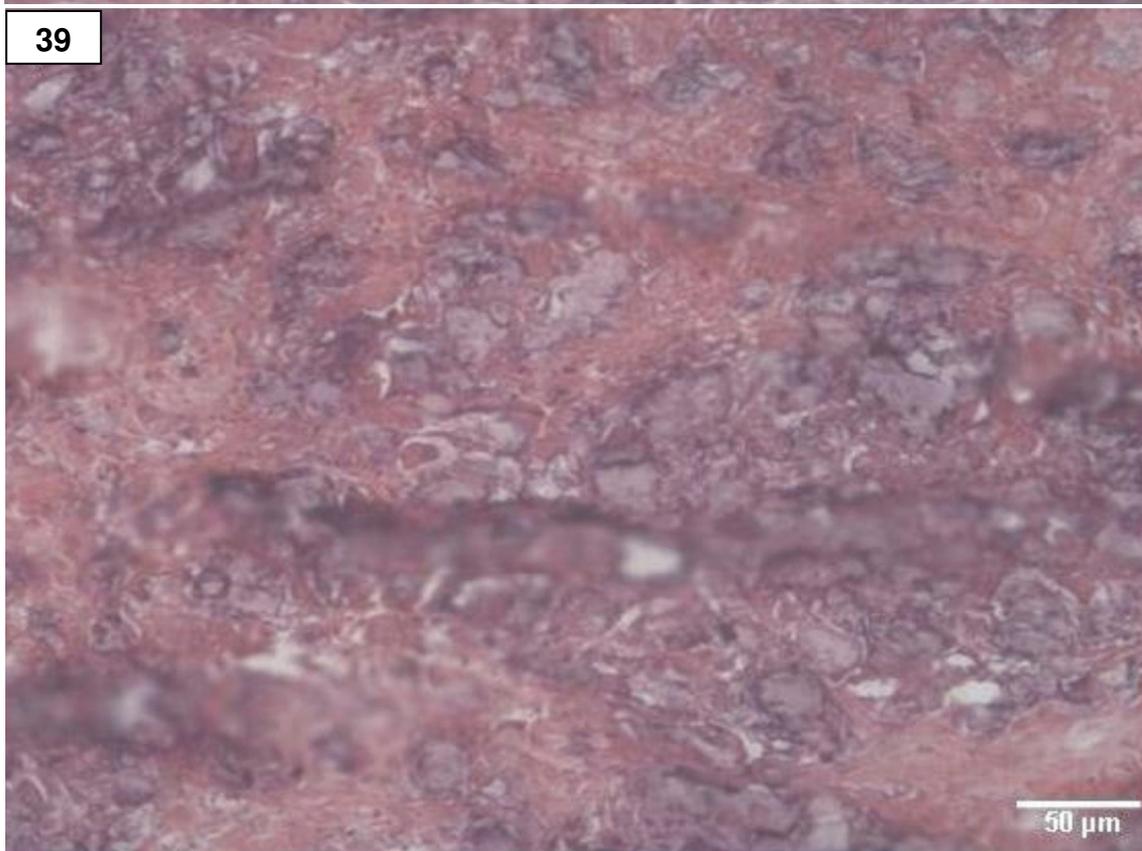
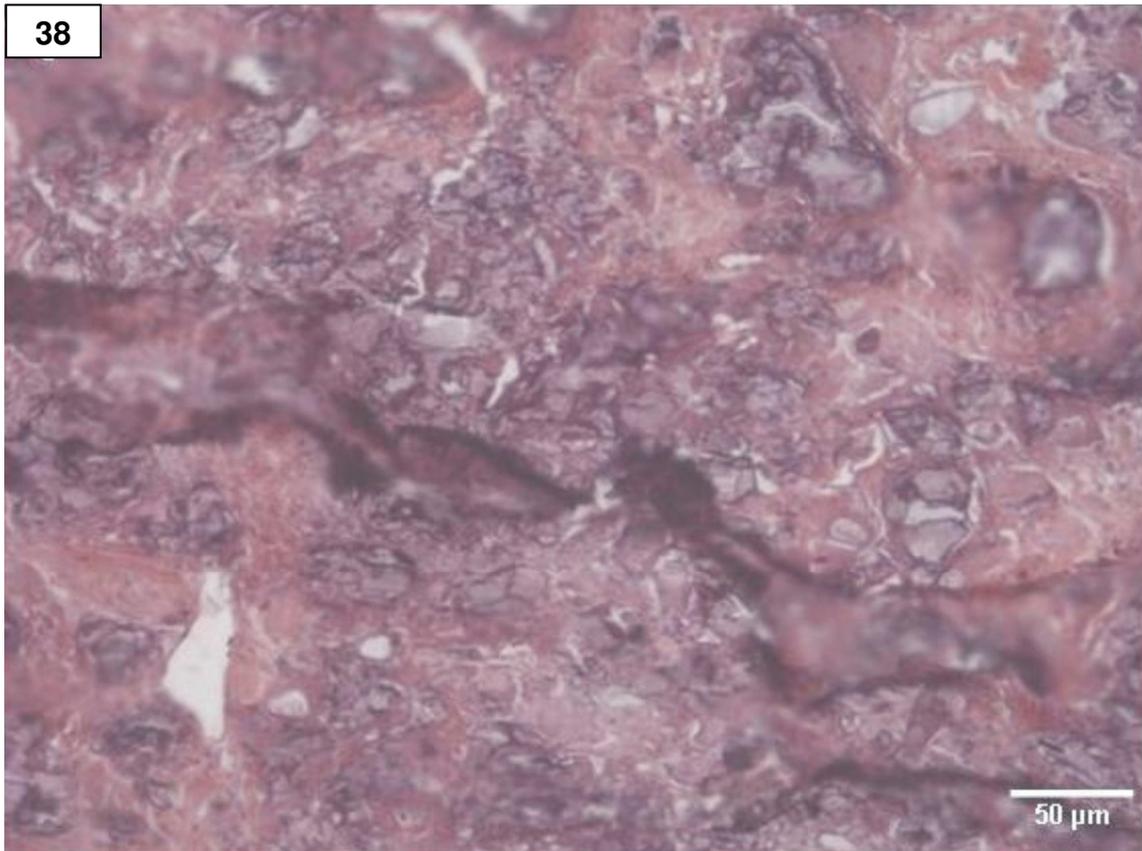


Figura 37. Visão dorsal do tecido ósseo, observado à esquerda (asterisco vermelho) do defeito, preenchido pelo biomaterial à direita. Uma partícula menos fragmentada está circulada em branco. Notar a presença de vasos sangüíneos, indicados por asterisco branco (GII 45 dias – sem coloração).



Figuras 38 e 39. Fragmentação das microesferas próxima à borda óssea na figura 39 e na região central do defeito de acordo com a figura 38. Observar, em ambas as figuras, a diferença no tamanho das partículas (GII 45 dias – HE).

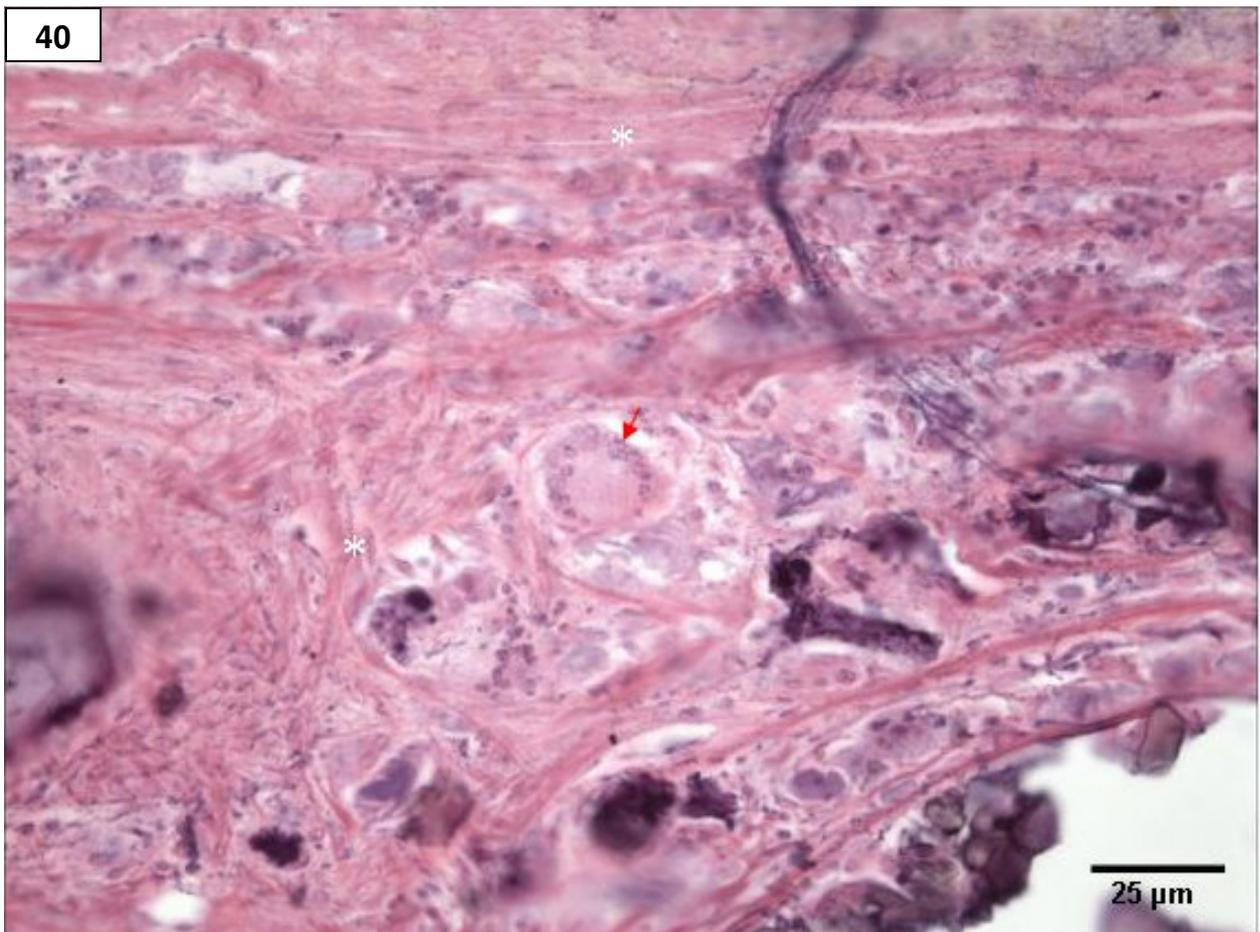
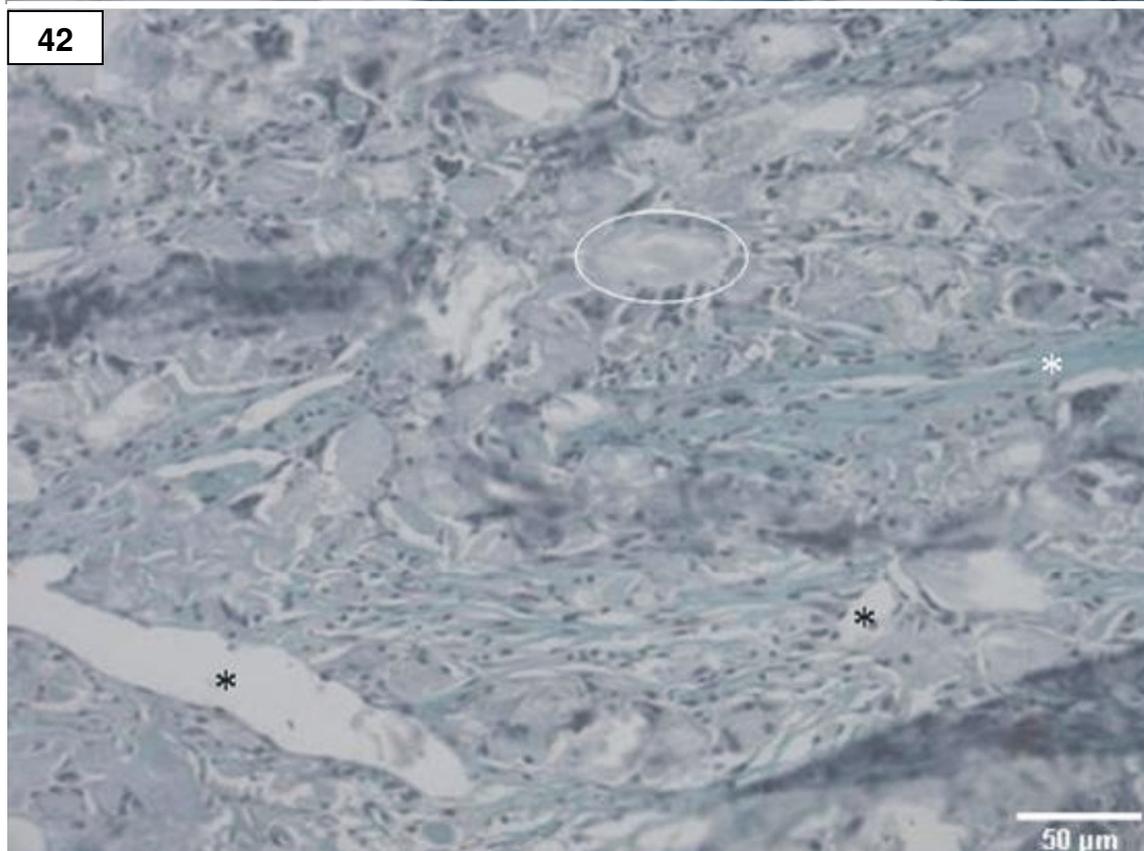
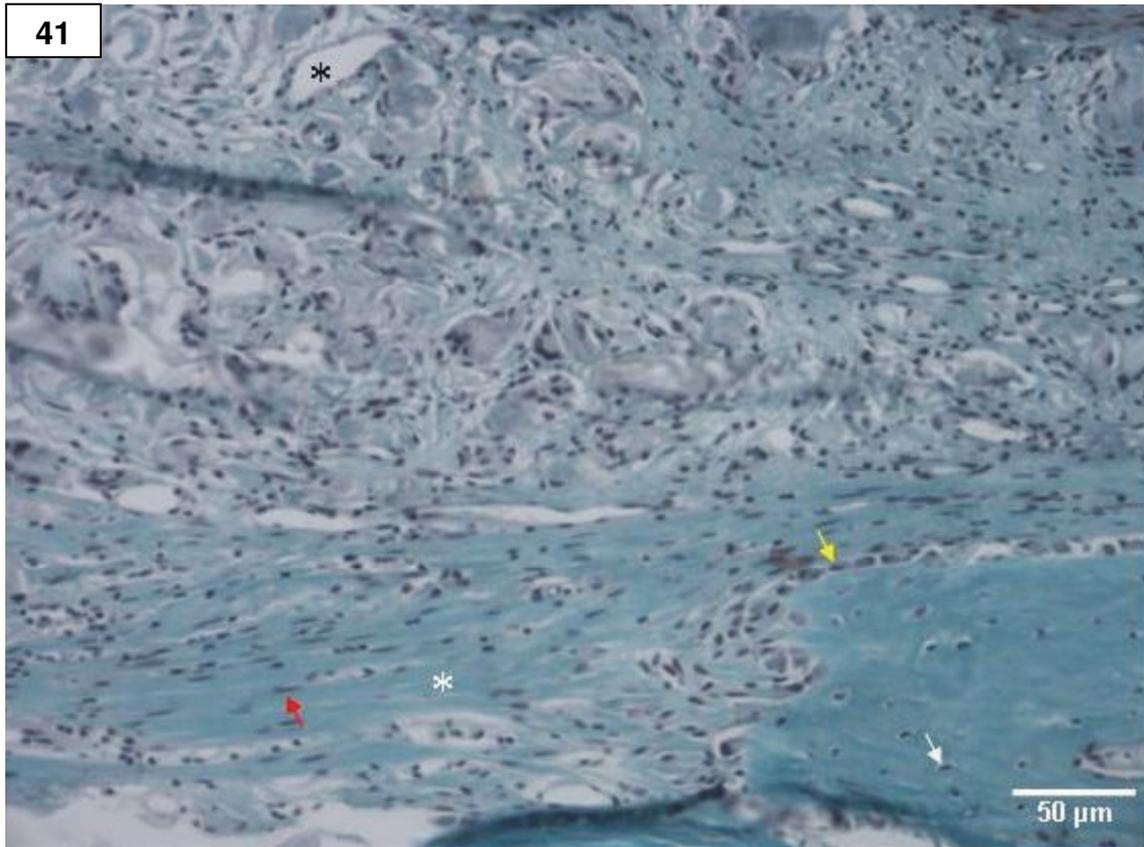
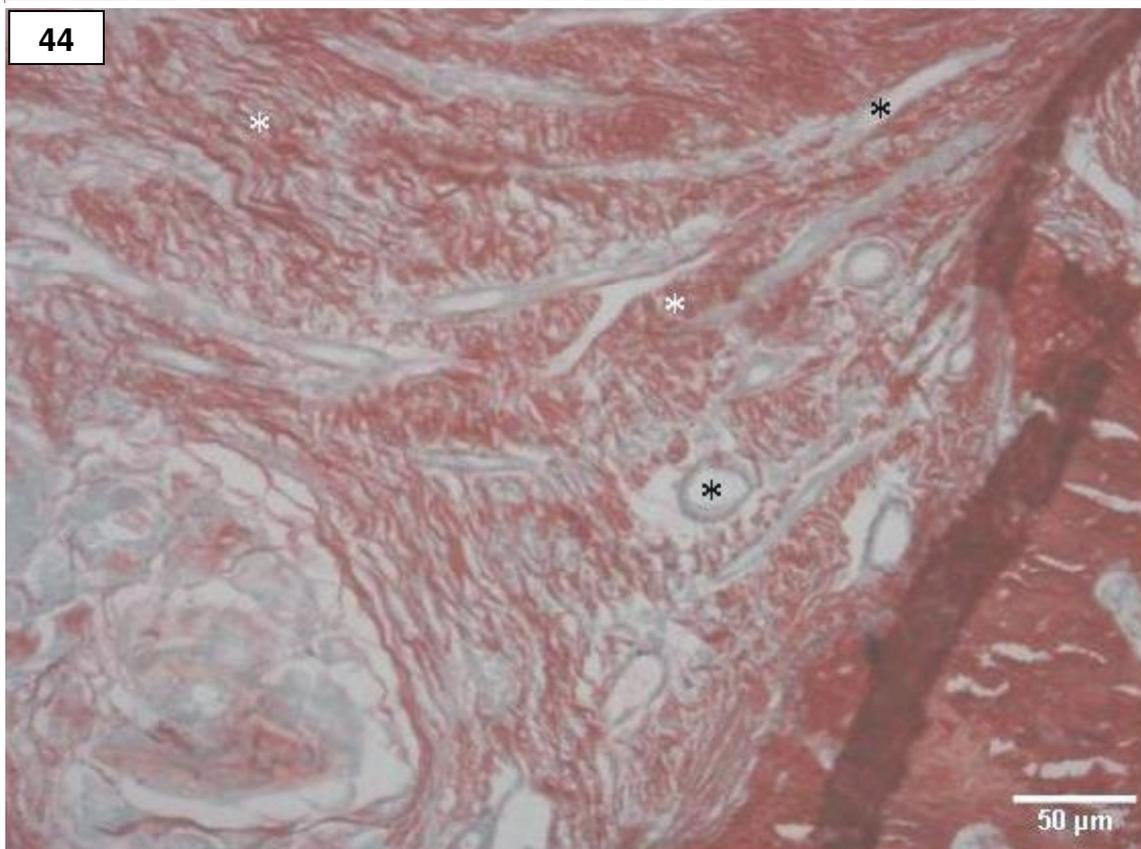
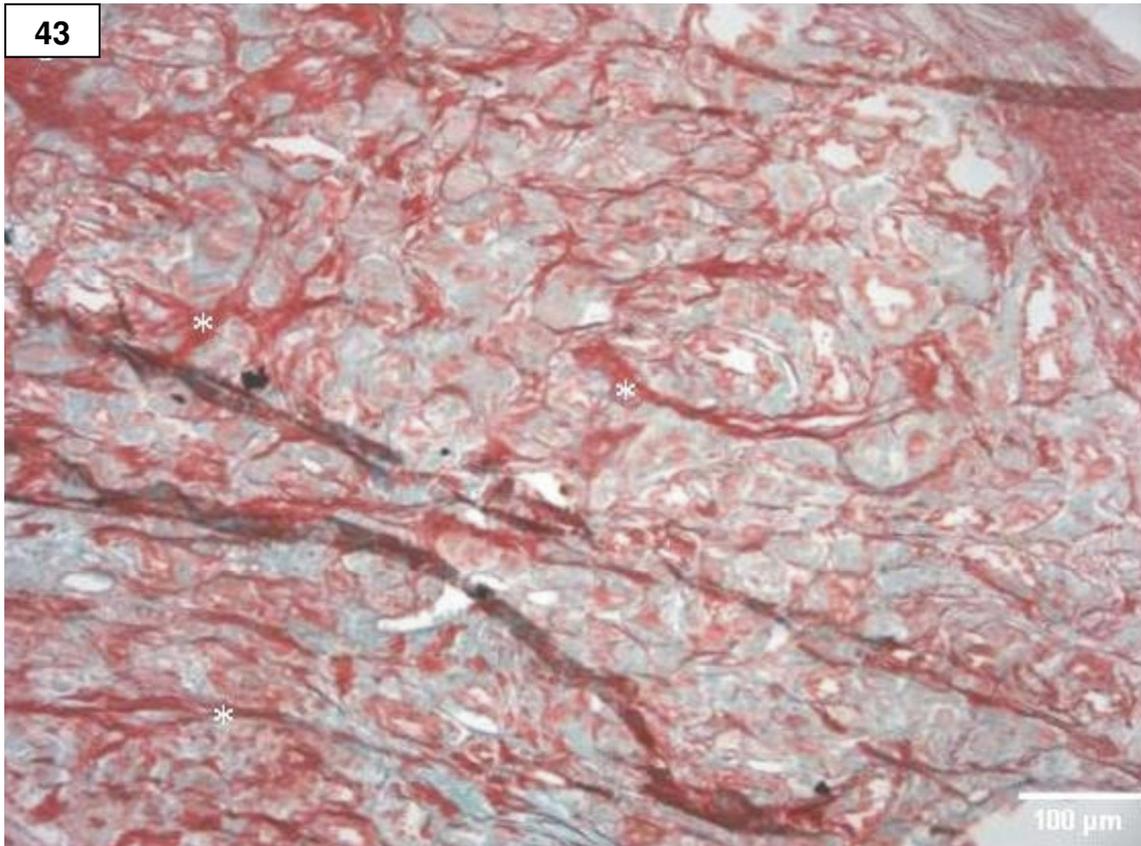


Figura 40. Notar a formação de tecido conjuntivo fibroso (asterisco) nesta região do defeito ósseo e observar, também, célula gigante no centro desta figura, apontada por seta (GII 45 dias – HE).



Figuras 41 e 42. Tecido ósseo neoformado em contigüidade à borda óssea, com presença de osteoblastos (seta amarela) e osteócitos (seta branca), fibroblastos (seta preta) e fibras colágenas (asterisco branco) nas proximidades da borda óssea e entre as partículas fragmentadas (elipse). Observam-se também vasos sangüíneos (asterisco preto) e inflamação crônica (GII 45 dias – Goldner).



Figuras 43 e 44. Septos de fibras de colágeno circundando as partículas do biomaterial (asterisco branco), observados na figura 43. A figura 44 evidencia as fibras de colágeno mais densas (asterisco branco) e vasos sanguíneos (asterisco preto) na proximidade da borda óssea (GII 45 dias – Picrossírius).

5.7 GII – PONTO BIOLÓGICO DE 90 DIAS

Aos 90 dias, as microesferas apresentaram-se com alta fragmentação (Figuras 46 e 47), e a reação inflamatória crônica granulomatosa foi evidenciada em toda a extensão do defeito com presença de células gigantes (Figuras 48 e 49). A proliferação vascular (Figura 48) mostrou-se em toda a extensão do defeito. O tecido conjuntivo fibroso, rico em fibroblastos, encontrado em toda a extensão do defeito, de permeio às partículas, mostrou-se mais denso com fibras de colágeno espessas (Figuras 45-47). Foi notada, ainda, formação de tecido ósseo circundando algumas partículas que se mantiveram mais íntegras, principalmente aquelas situadas nas proximidades da borda óssea (Figuras 50 e 51), e ocasionalmente próximo à região central (Figura 52).

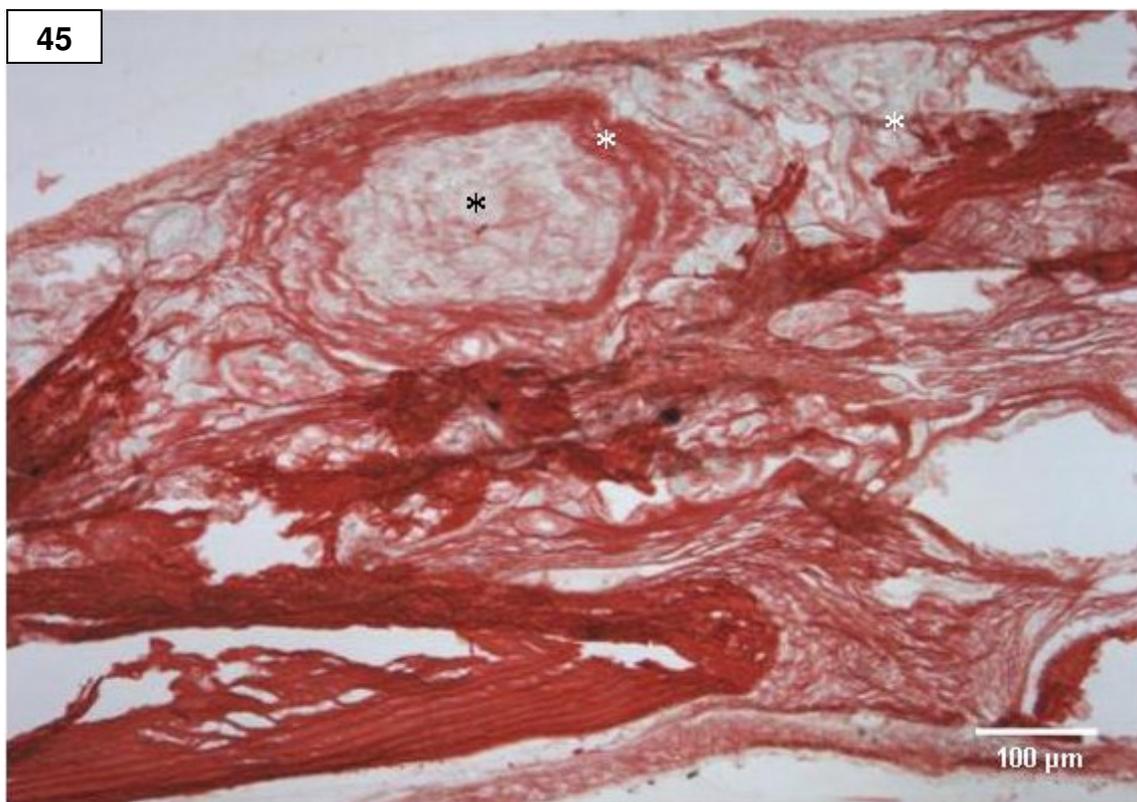
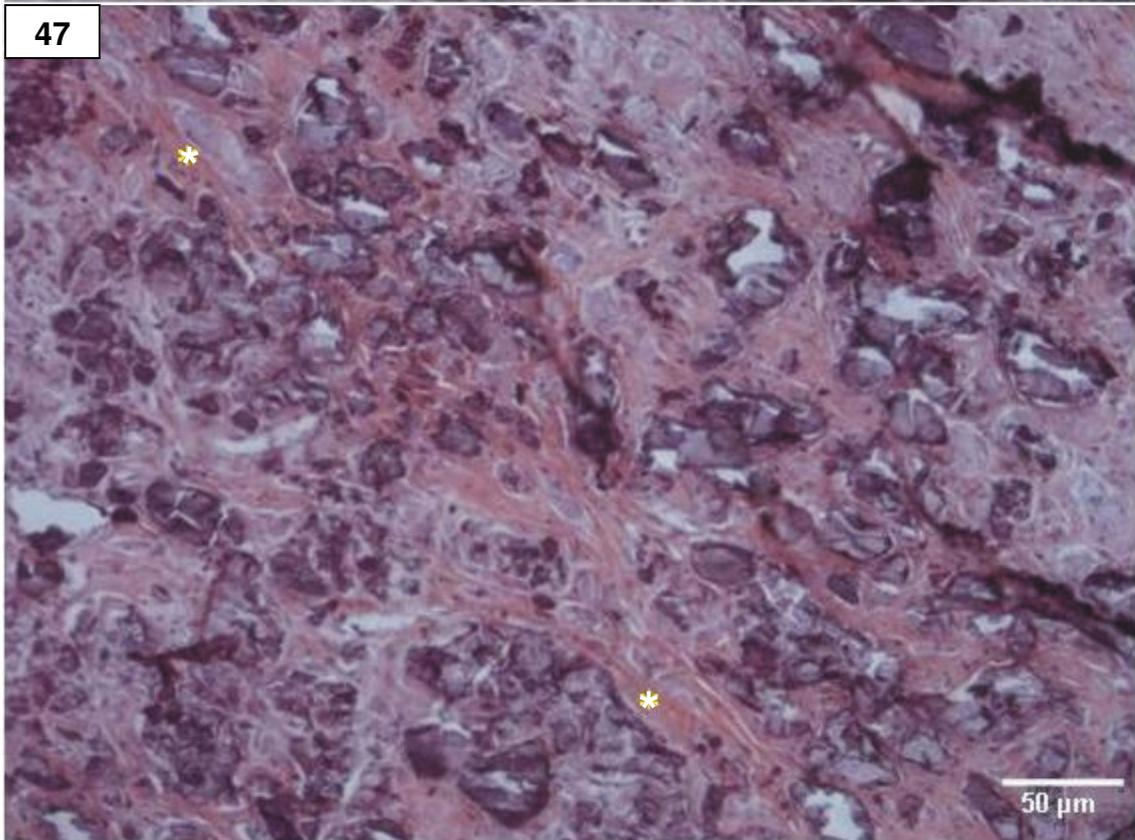
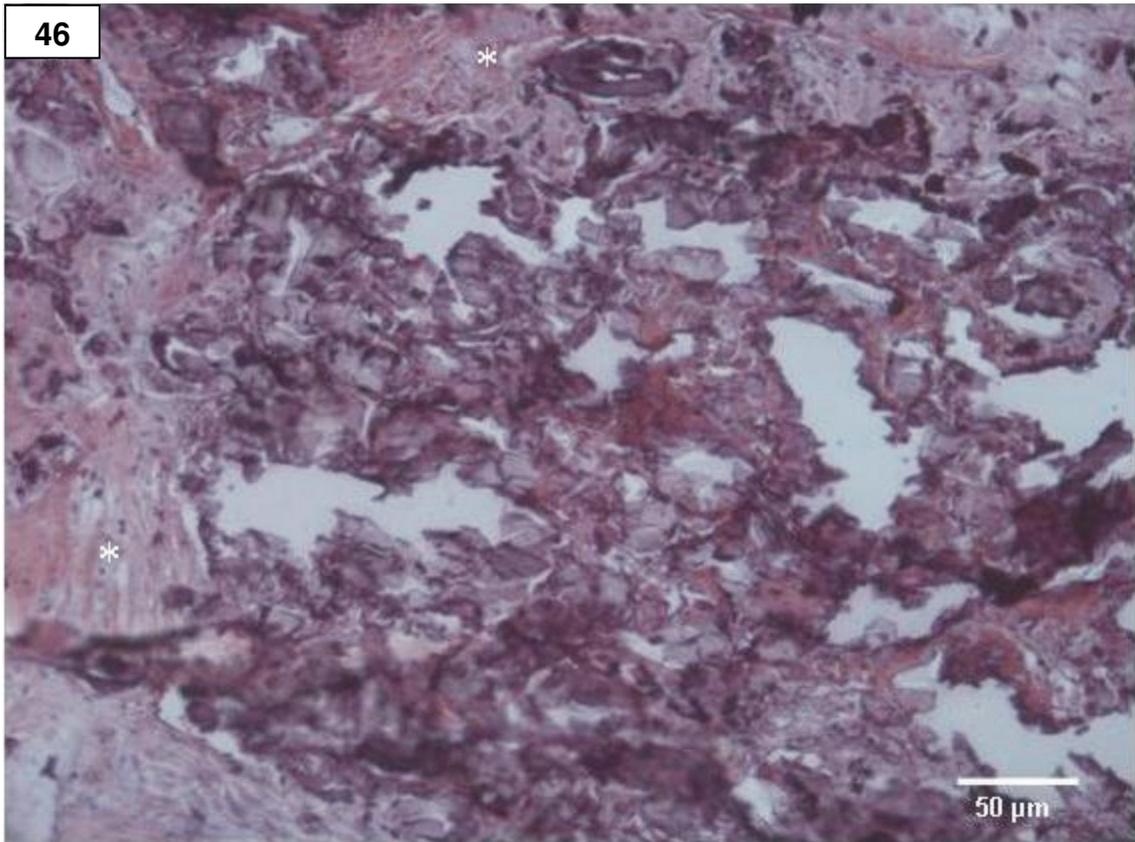
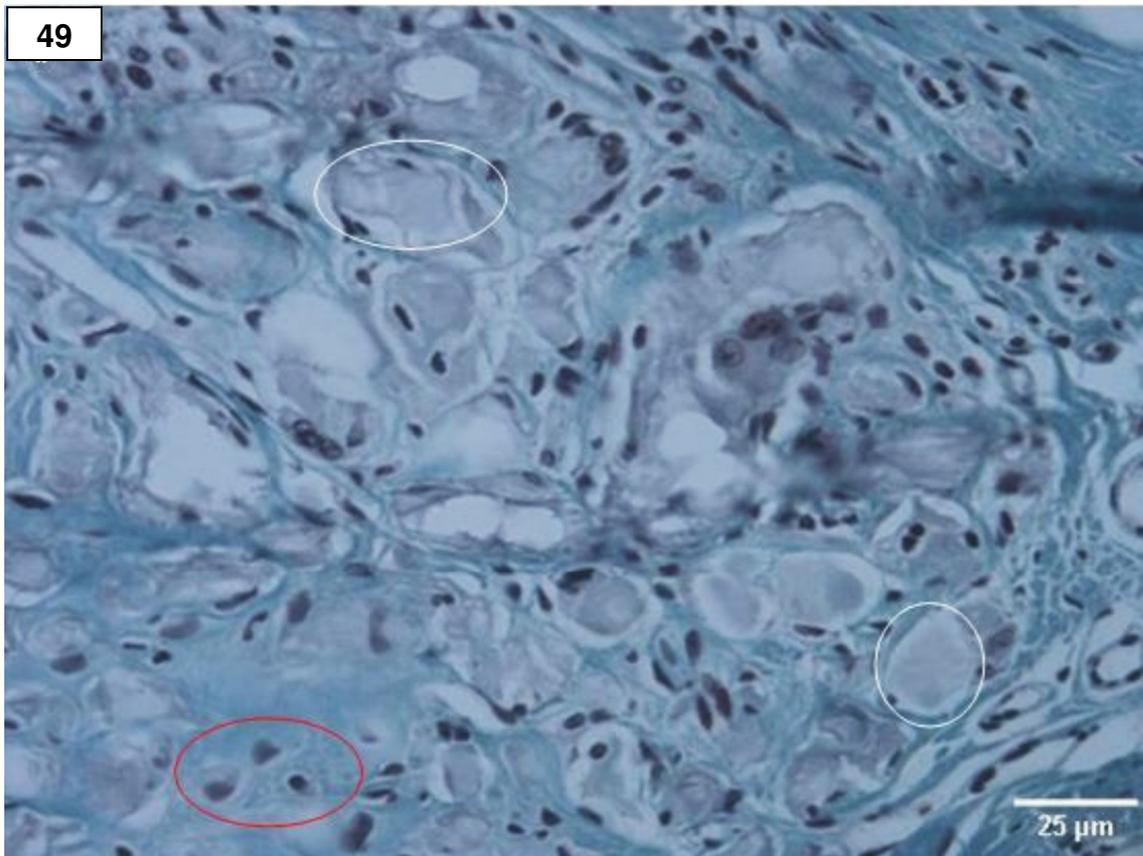
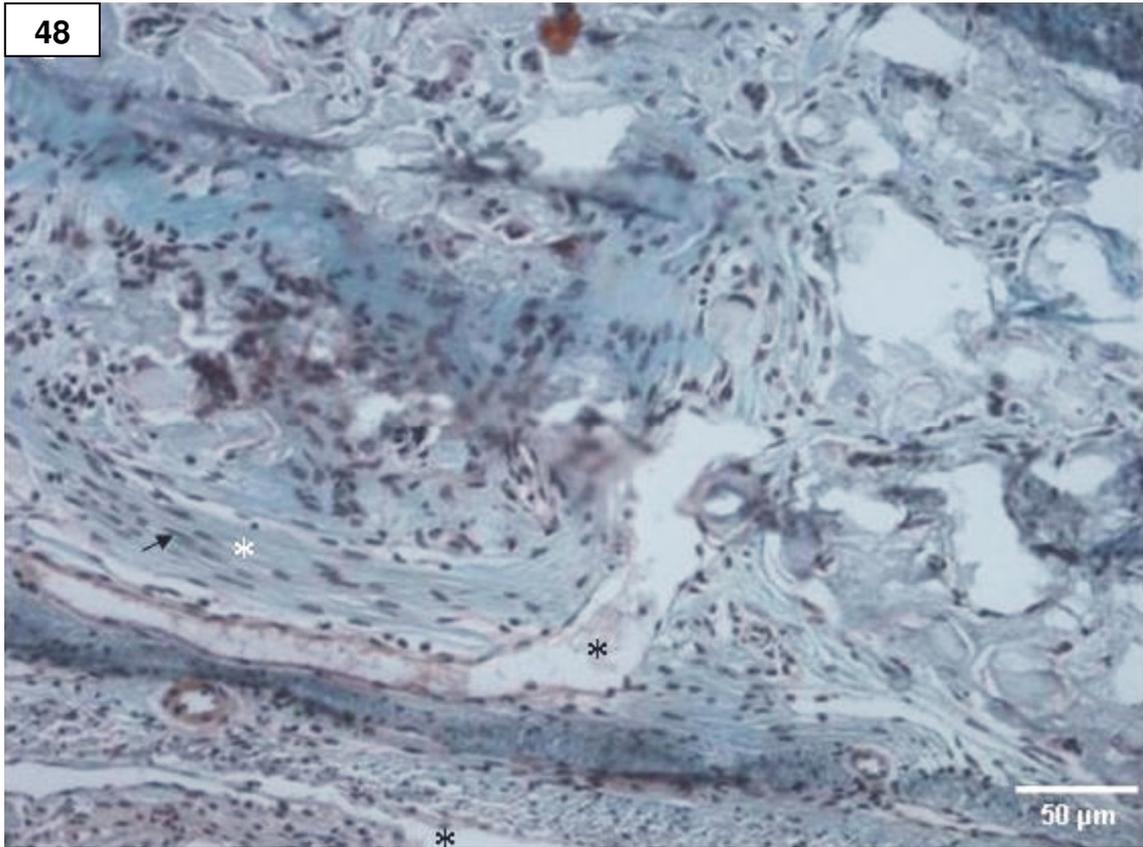


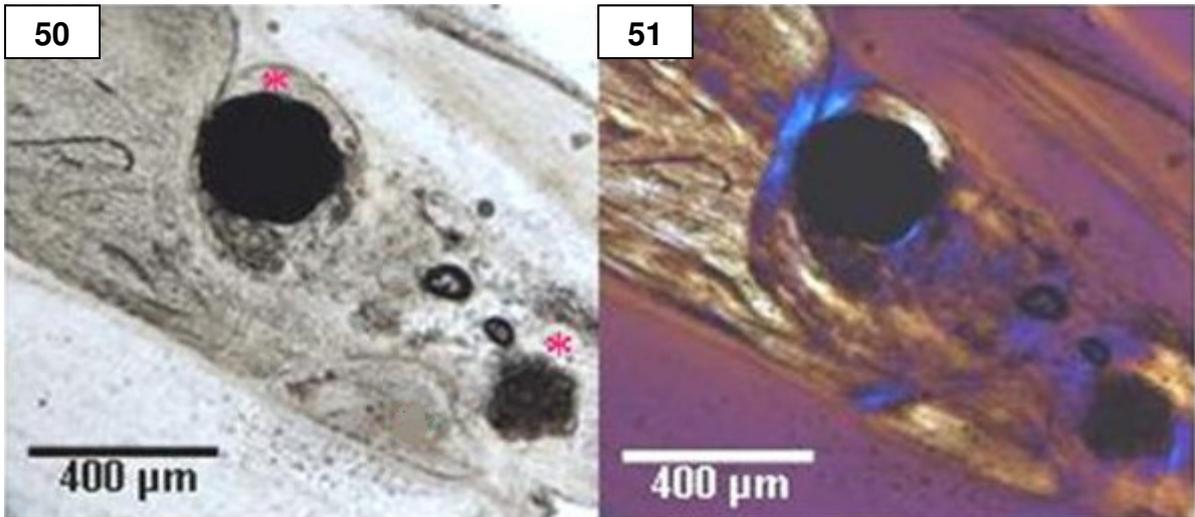
Figura 45. Tecido conjuntivo fibroso (asterisco branco) circundando as partículas do biomaterial (asterisco preto) nas proximidades da borda óssea (GII 90 dias – Picrossírius).



Figuras 46 e 47. Fragmentação do biomaterial e formação, entre as partículas, de tecido conjuntivo fibroso mais denso (asterisco branco) (GII 90 dias – HE).



Figuras 48 e 49. Região central do defeito mostra biomaterial com partículas bastante fragmentadas (elipse branca), fibroblastos (seta preta), fibras de colágeno (asterisco branco), vasos sangüíneos (asterisco preto) com células inflamatórias mononucleares (elipse vermelha) (GII 90 dias – Goldner).



Figuras 50 e 51. Neoformação óssea (indicada por asterisco vermelho) justaposta às partículas do biomaterial na figura 50, próxima à borda óssea. A figura 51 corresponde ao mesmo campo visual da figura anterior, obtida por microscopia de polarização. As regiões em amarelo e azul correspondem ao tecido ósseo (GII 90 dias – sem coloração).

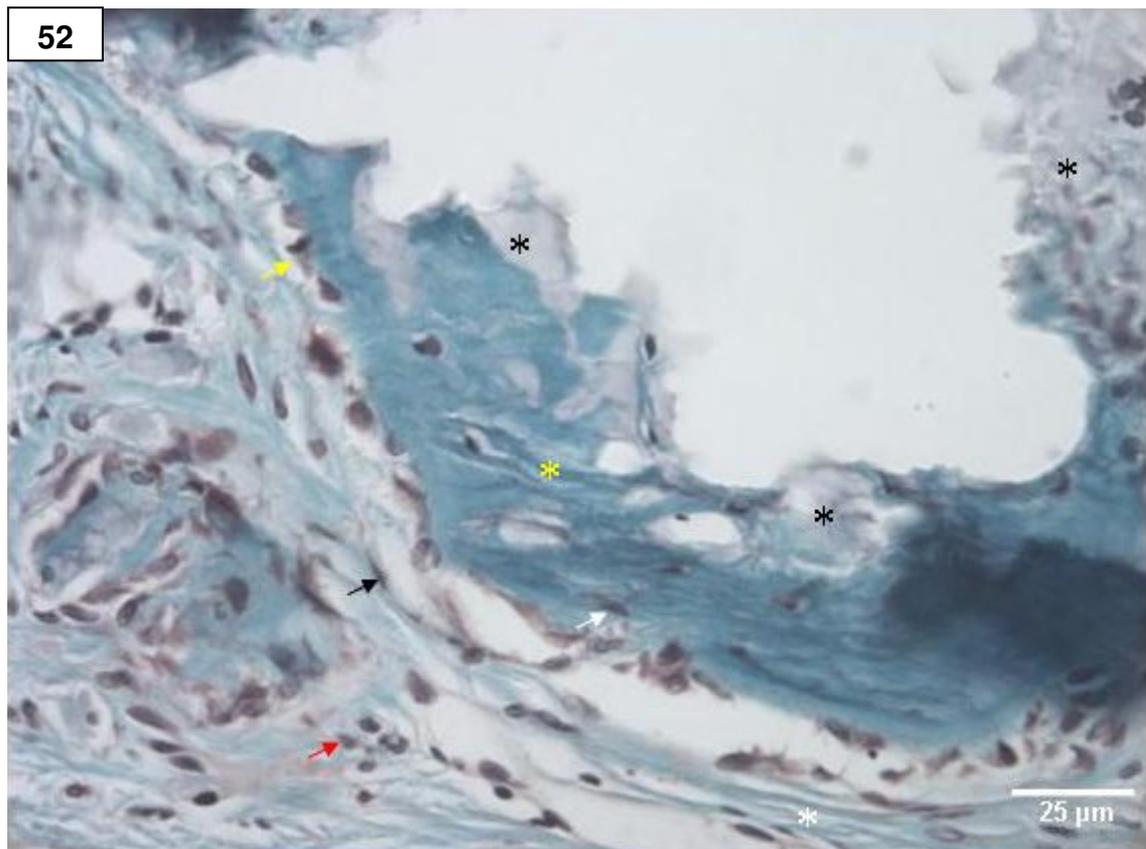
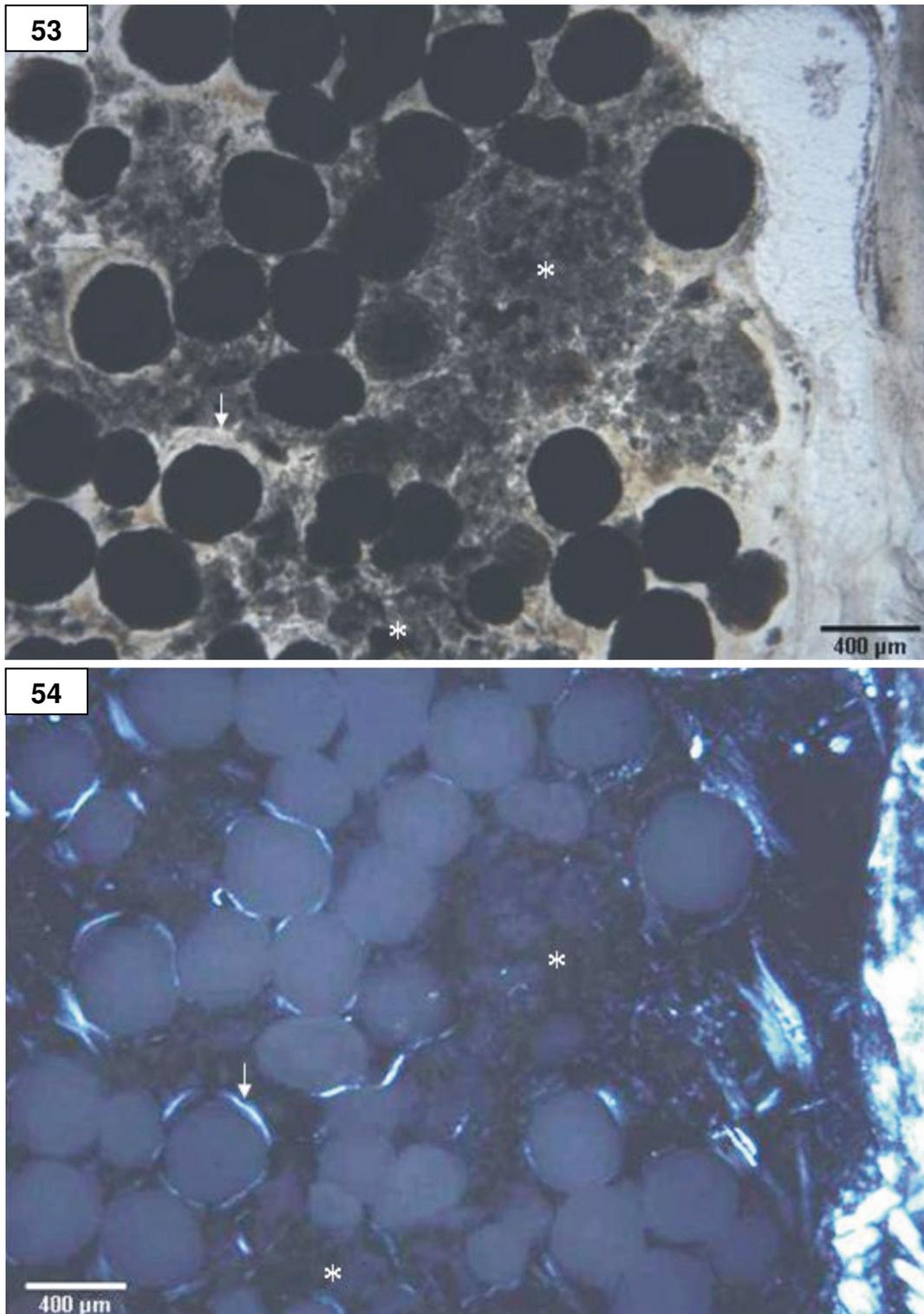


Figura 52. Tecido ósseo (asterisco amarelo), formado na região central do defeito circundando o biomaterial (asterisco preto) com osteoblastos (seta amarela) e osteócitos (seta branca). Notar também tecido conjuntivo fibroso (asterisco branco), fibroblastos (seta preta), e células inflamatórias (seta vermelha) (GII 90 dias – Goldner).

5.8 GII – PONTO BIOLÓGICO DE 120 DIAS

Aos 120 dias de pós-operatório, algumas microesferas mostraram-se íntegras enquanto outras se apresentaram mais fragmentadas (Figuras 53, 54, 62 e 63) e, em associação a estas partículas, notou-se resposta inflamatória crônica granulomatosa (Figuras 64-66). Em toda a extensão do defeito, foi identificada proliferação vascular (Figuras 59, 61, 65-68 e 71), inclusive entre as partículas do biomaterial, e foi observado tecido conjuntivo fibroso mais denso (Figuras 62, 63 e 72). O biomaterial mostrou-se envolvido por septos de tecido conjuntivo fibroso (Figura 72) e, em algumas esferas, principalmente naquelas menos fragmentadas, sobretudo nas proximidades das bordas ósseas, houve formação de tecido ósseo, que circundou o biomaterial (Figuras 53-60, 62 e 67). Uma visão detalhada mostrou que, nas regiões das esferas onde houve mineralização, os fragmentos das partículas estavam completamente circundados pelo osso neoformado. Entretanto, pode-se observar regiões de tecido conjuntivo fibroso denso (Figuras 62, 63, 67-72) muito próximas às regiões de osso neoformado.



Figuras 53 e 54. Visão dorsal da região do defeito ósseo. Notar, na figura 53, que a maioria das esferas (áreas escuras circulares) neste campo se encontra íntegra. Porém, em algumas regiões observa-se intensa fragmentação do material (áreas escuras mais difusas – asterisco). Em torno de diversas esferas íntegras, observa-se um contorno com aparência típica de formação óssea (seta), o que não é observado com a mesma intensidade nas áreas onde houve fragmentação. A figura 54 corresponde ao mesmo campo visual da figura anterior, obtida por microscopia de polarização. As regiões iluminadas apresentam alta birrefringência, o que é sabidamente causado pelo tecido ósseo. A região iluminada à direita corresponde ao osso já existente fora do defeito (GII 120 dias – sem coloração).

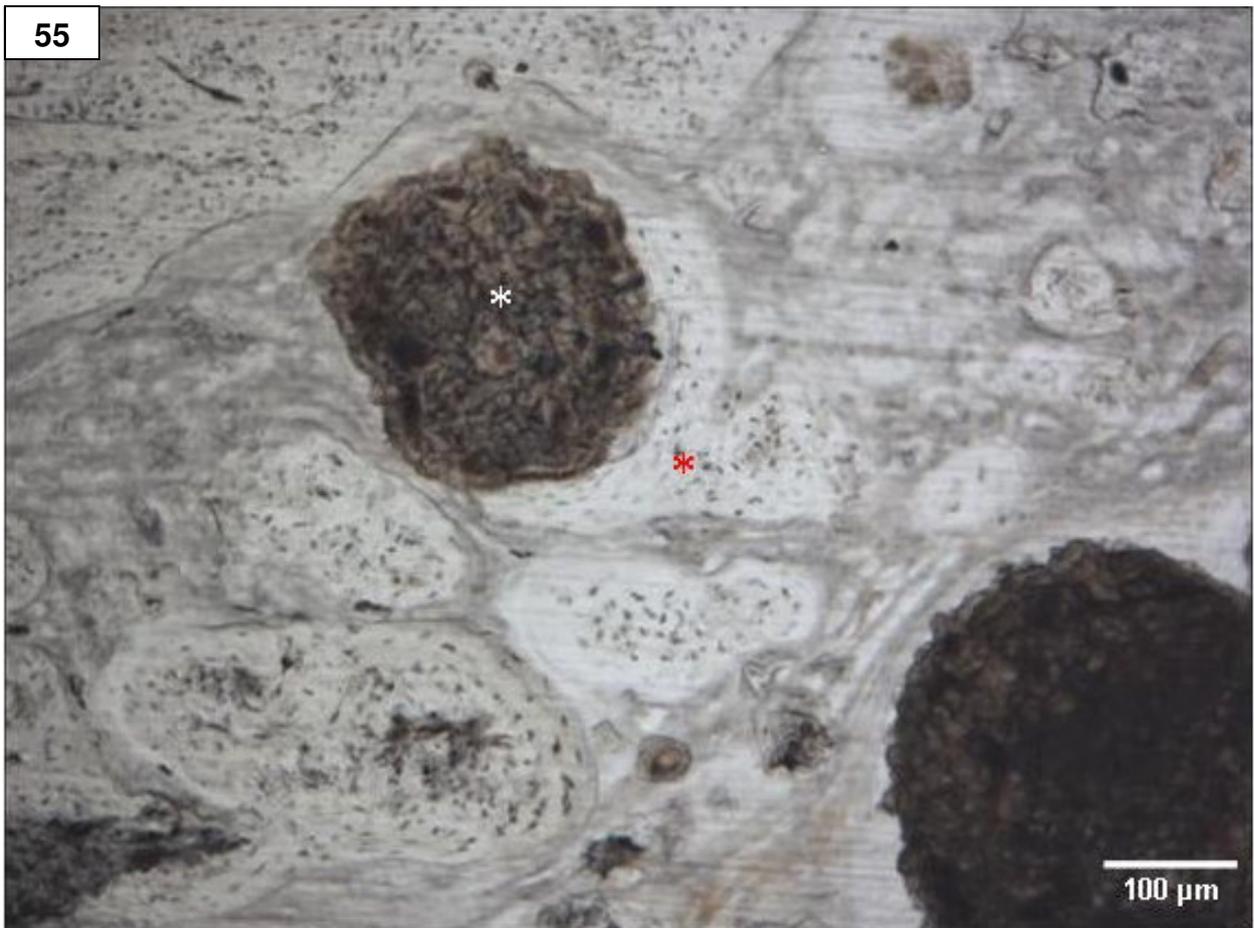
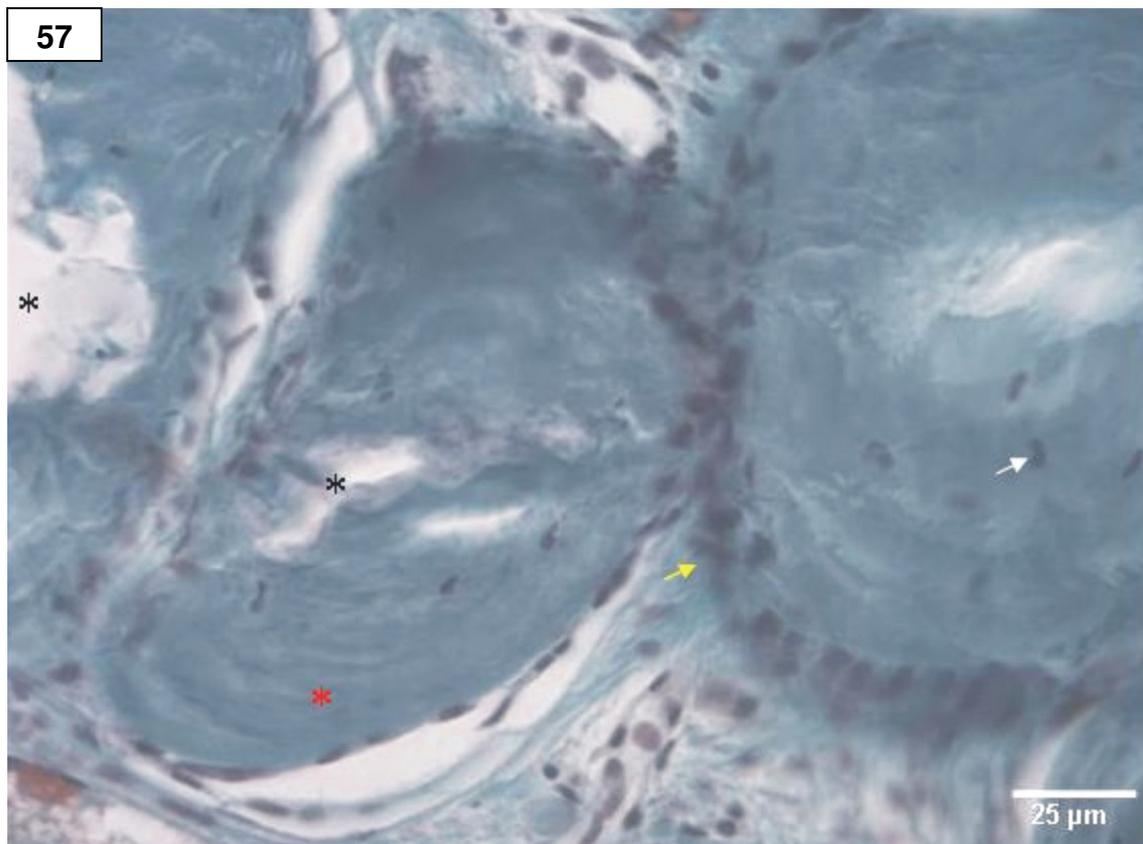
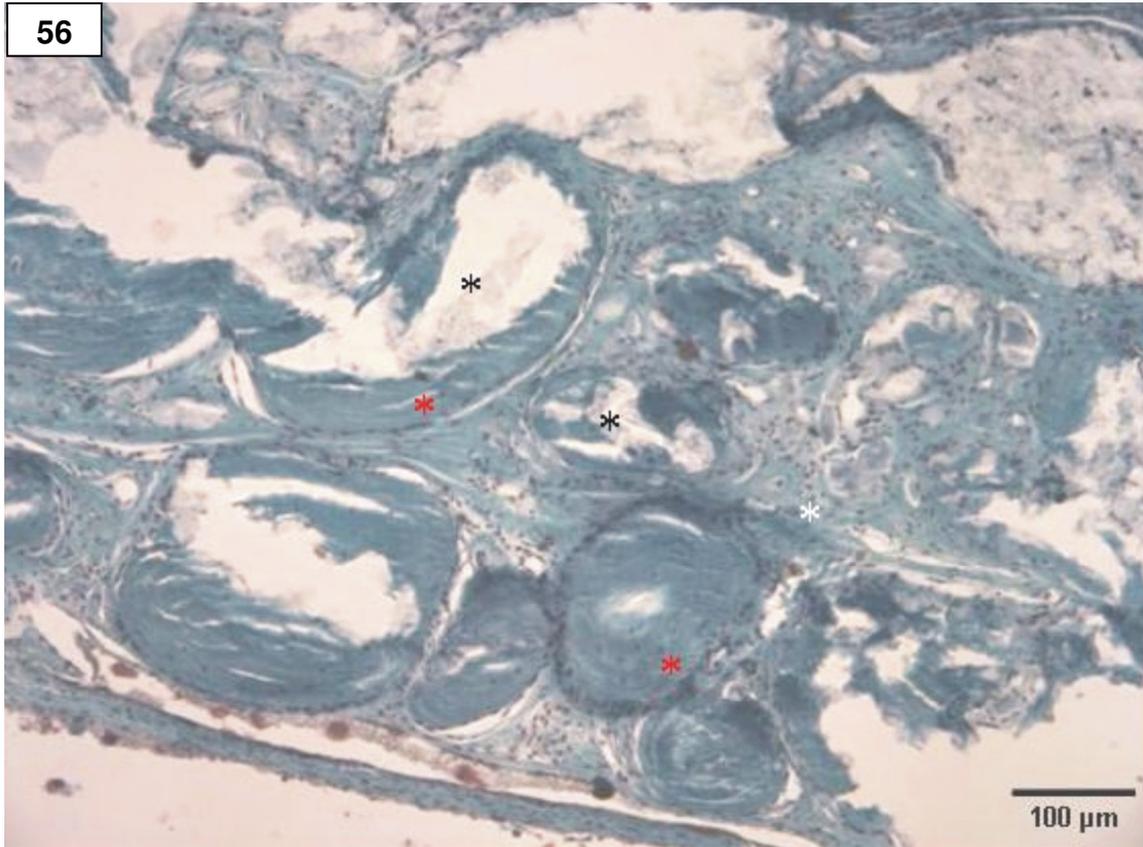
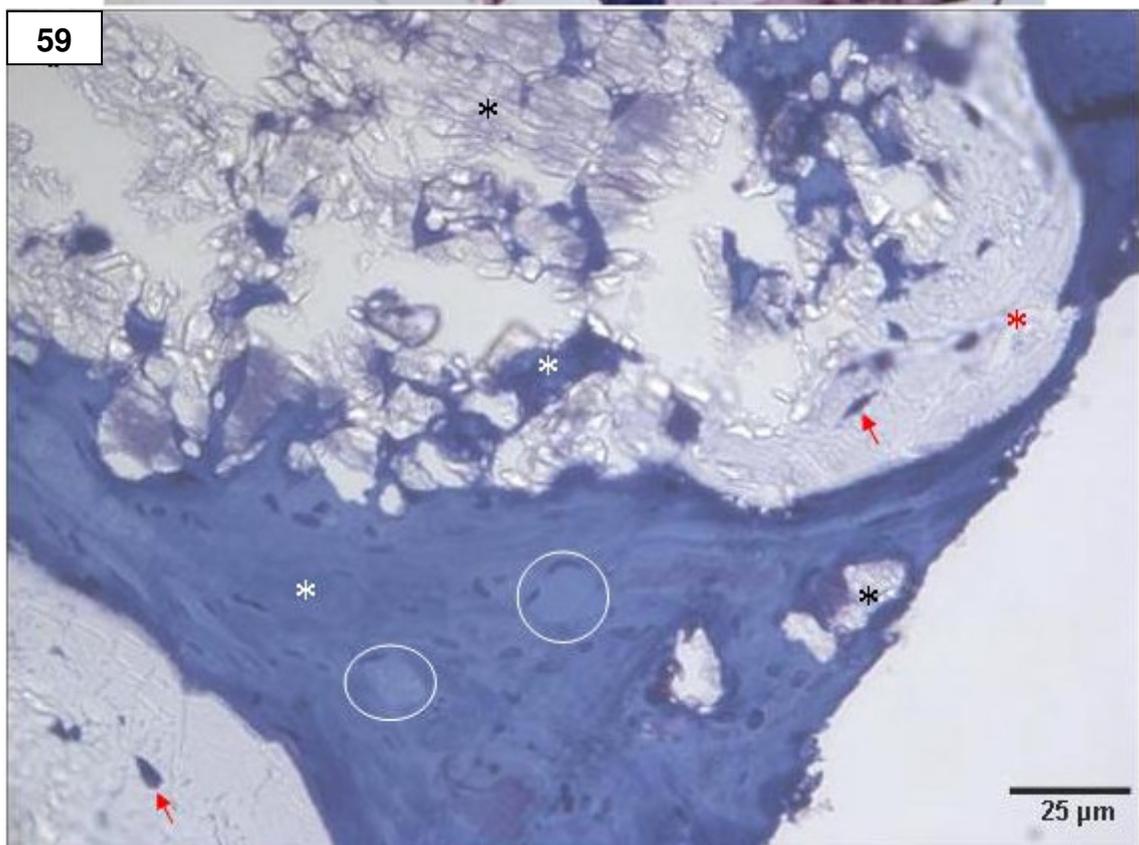
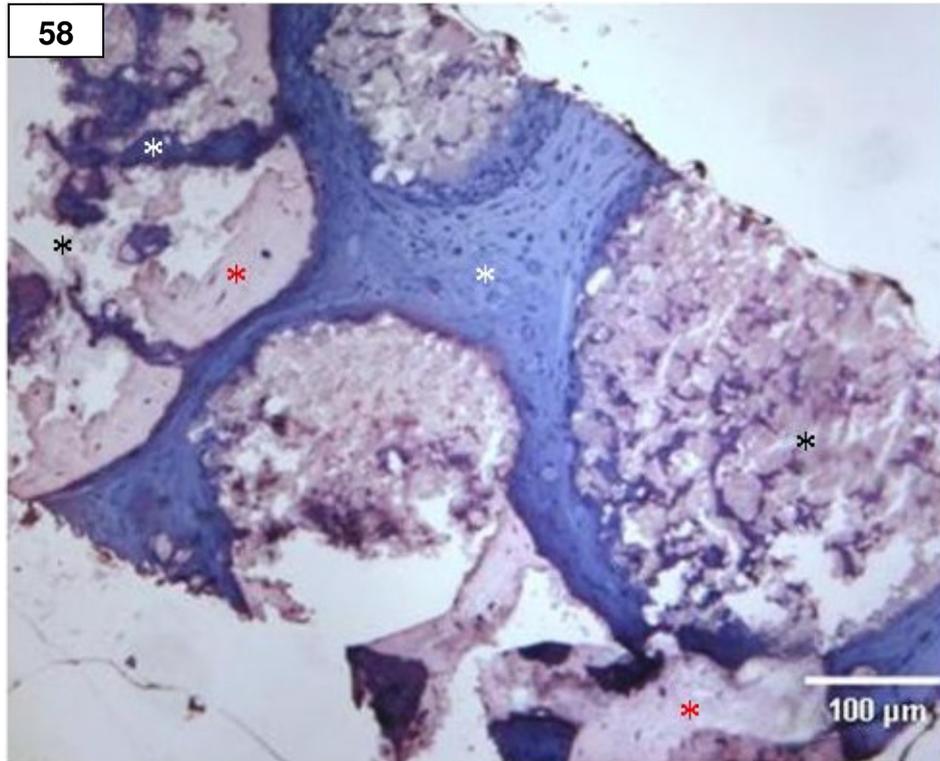


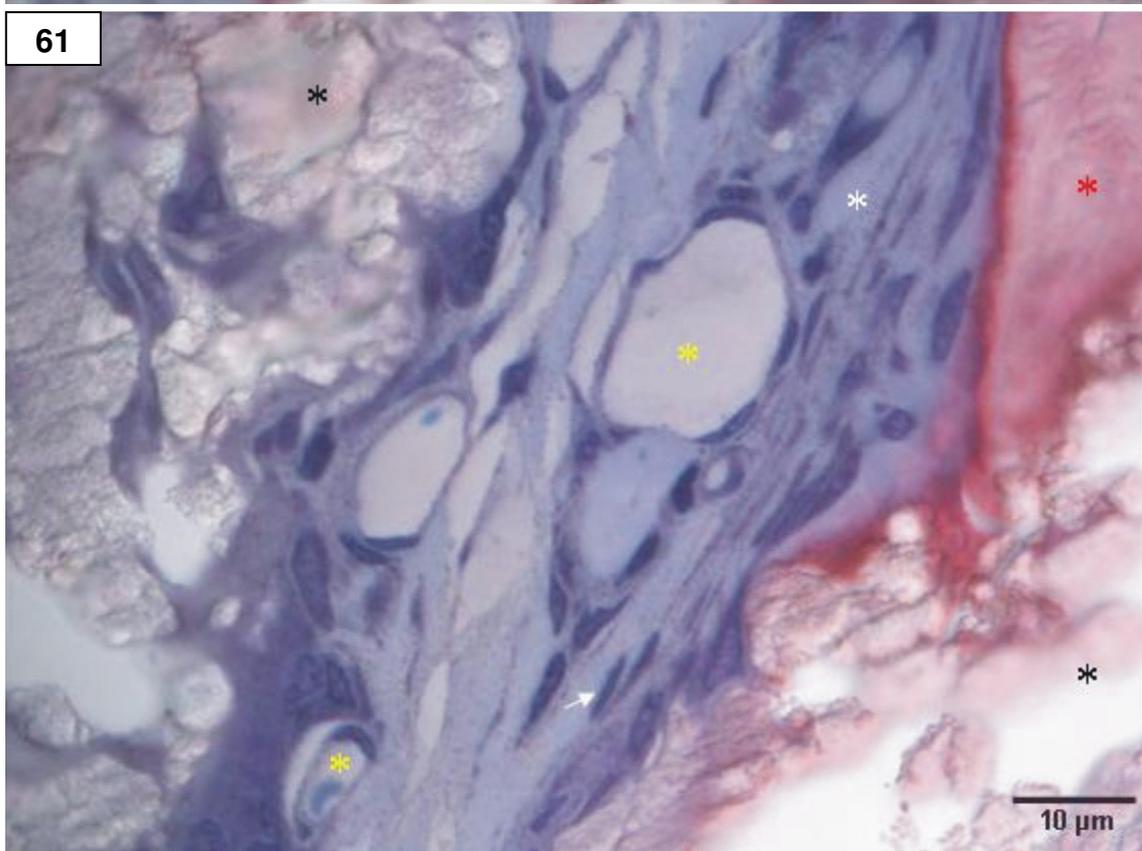
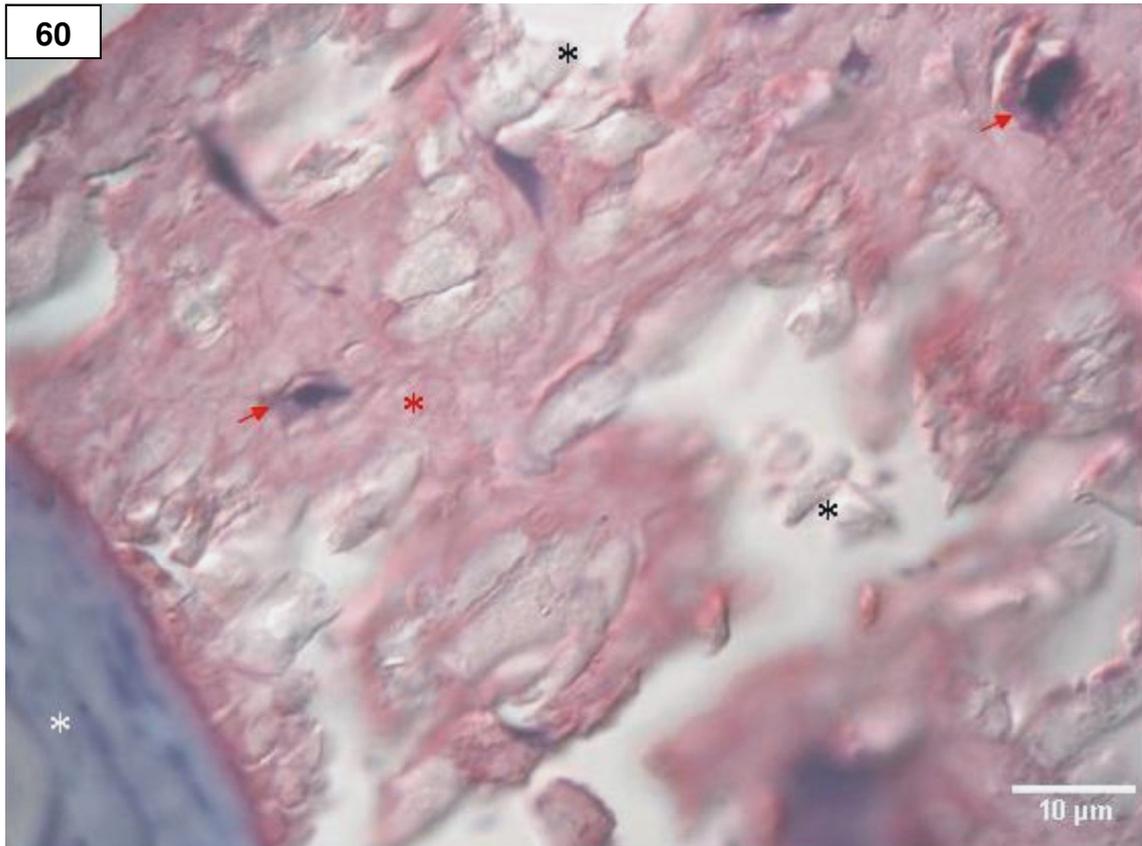
Figura 55. Detalhe de uma região em que a microesfera (asterisco branco) está envolvida parcialmente por tecido ósseo (asterisco vermelho), próximo à borda óssea (GII 120 dias – sem coloração).



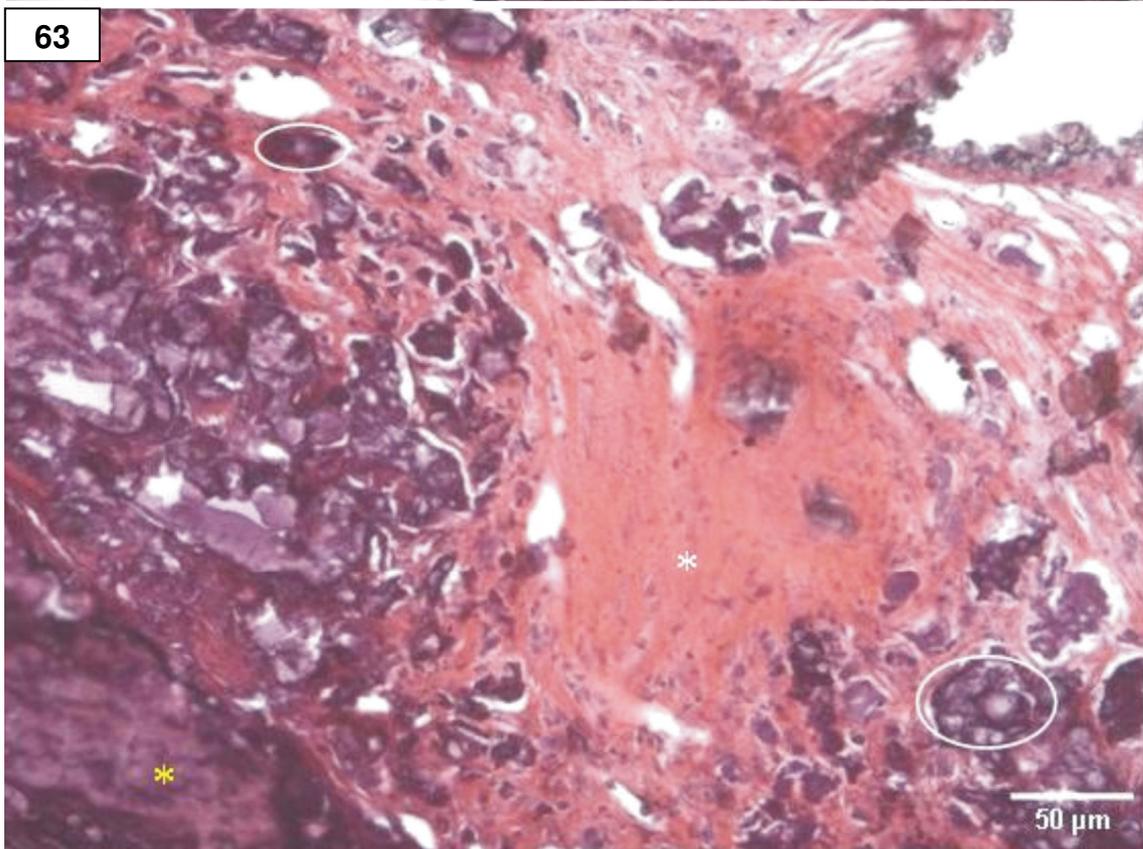
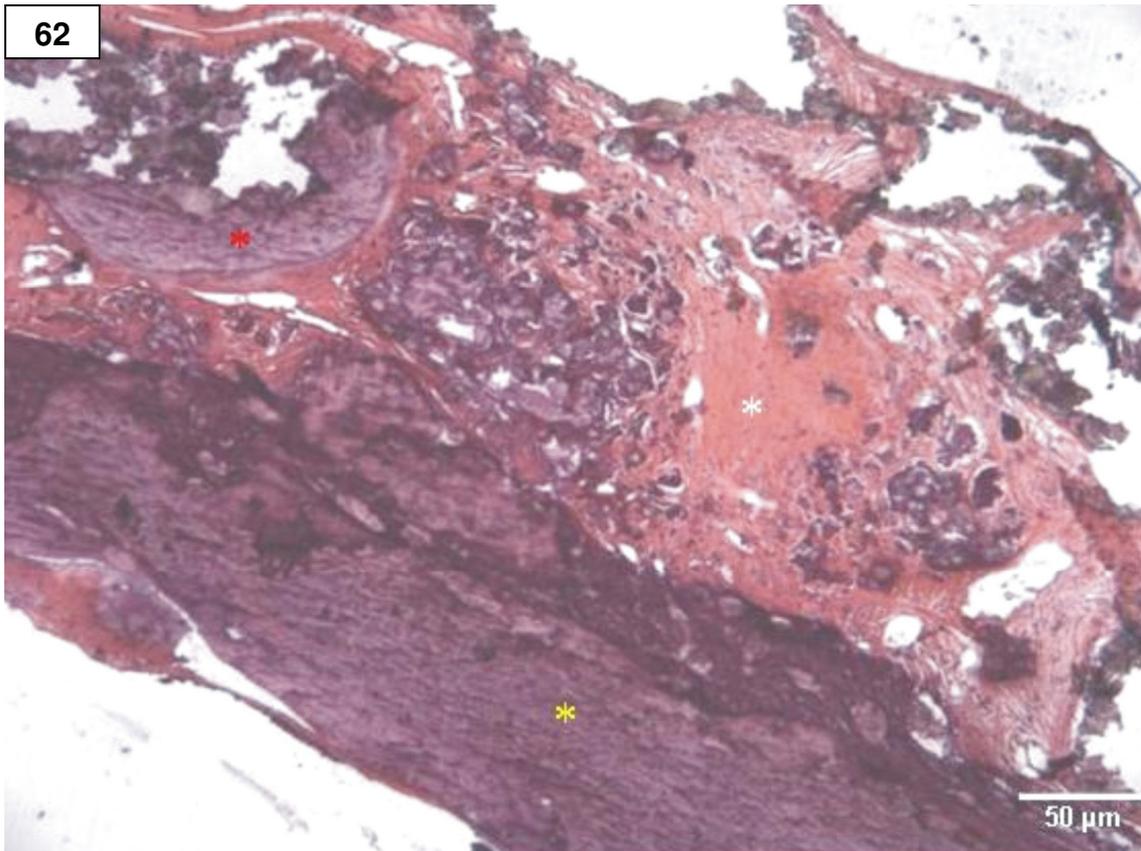
Figuras 56 e 57. Nestas figuras, observam-se esferas fragmentadas (asterisco preto) circundadas principalmente por tecido ósseo (asterisco vermelho), e também por tecido conjuntivo fibroso (asterisco branco). A figura 57 mostra uma visão mais aproximada da figura 56 com formação de tecido ósseo, com osteoblastos (seta amarela) e osteócitos (seta branca), circundando as partículas (GII 120 dias – Goldner).



Figuras 58 e 59. A figura 58 mostra o biomaterial (asterisco preto) circundado por tecido ósseo (asterisco vermelho) e por tecido conjuntivo fibroso, indicado por asterisco branco (GII 120 dias – Azul de toluidina e fucsina básica). A figura 59 mostra uma secção do mesmo bloco, com visão mais aproximada da figura 58. Observar os vasos sanguíneos presentes no tecido conjuntivo fibroso (elipse branca) e os osteócitos no interior do tecido ósseo, indicados por setas vermelhas na figura 59 (GII 120 dias – Azul de Richardson).



Figuras 60 e 61. Estas figuras exibem o tecido ósseo neoformado (asterisco vermelho) com osteócitos (seta vermelha) ao redor do biomaterial (asteriscos preto). Já a figura 61, mostra o tecido conjuntivo fibroso (asterisco branco) com fibroblastos (seta branca) e vasos sangüíneos (asterisco amarelo), formado de permeio às partículas do biomaterial (GII 120 dias – Azul de toluidina e fucsina básica com contraste interferencial).



Figuras 62 e 63. A figura 62 mostra a fragmentação das partículas e tecido conjuntivo fibroso (asterisco branco) próximas à borda óssea (asterisco amarelo) e formação de tecido ósseo ao redor de partículas, indicado por asterisco vermelho. A figura 63 exibe uma visão mais aproximada do tecido conjuntivo fibroso denso, formado entre as partículas fragmentadas, algumas delineadas por elipse (GII 120 dias – HE).

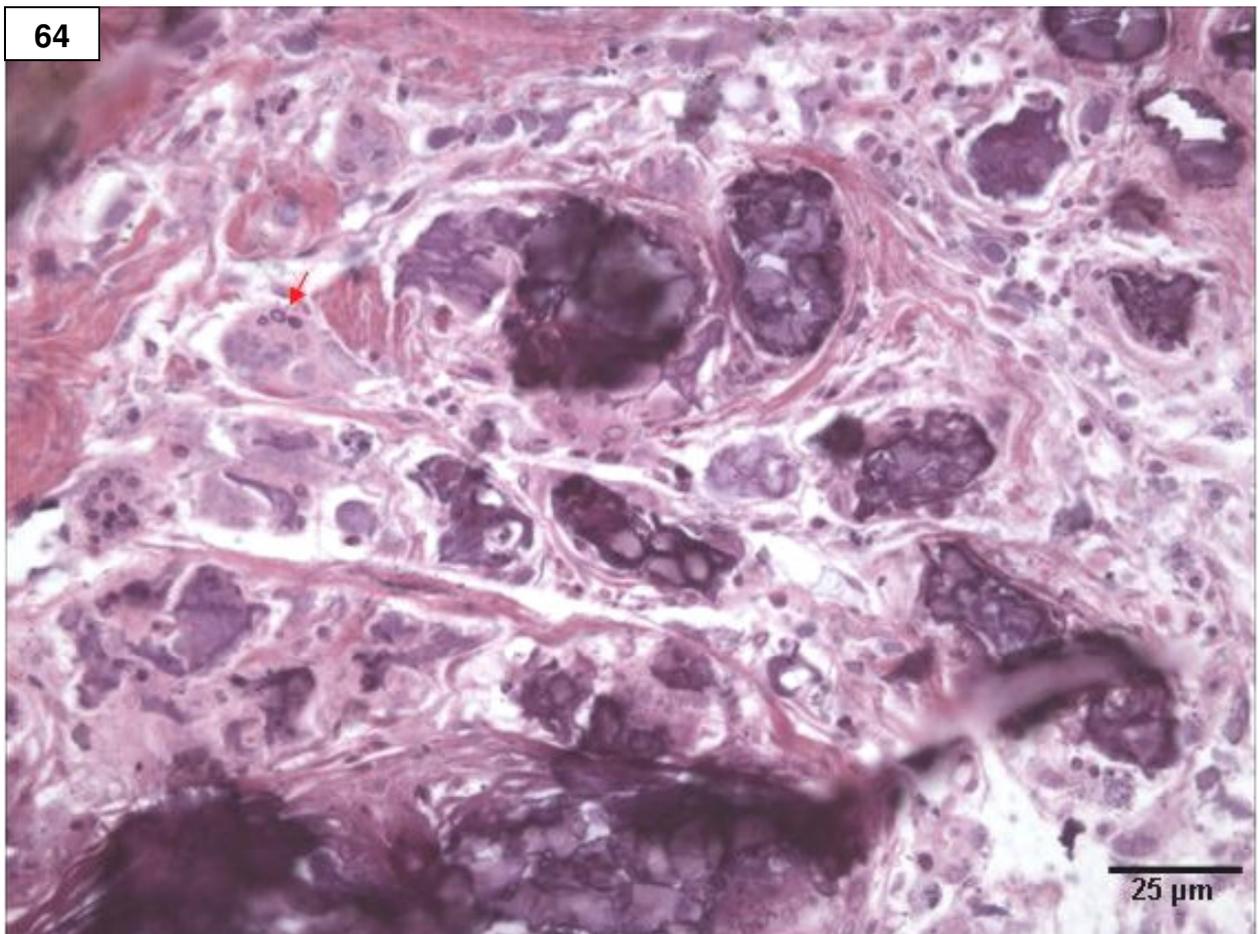
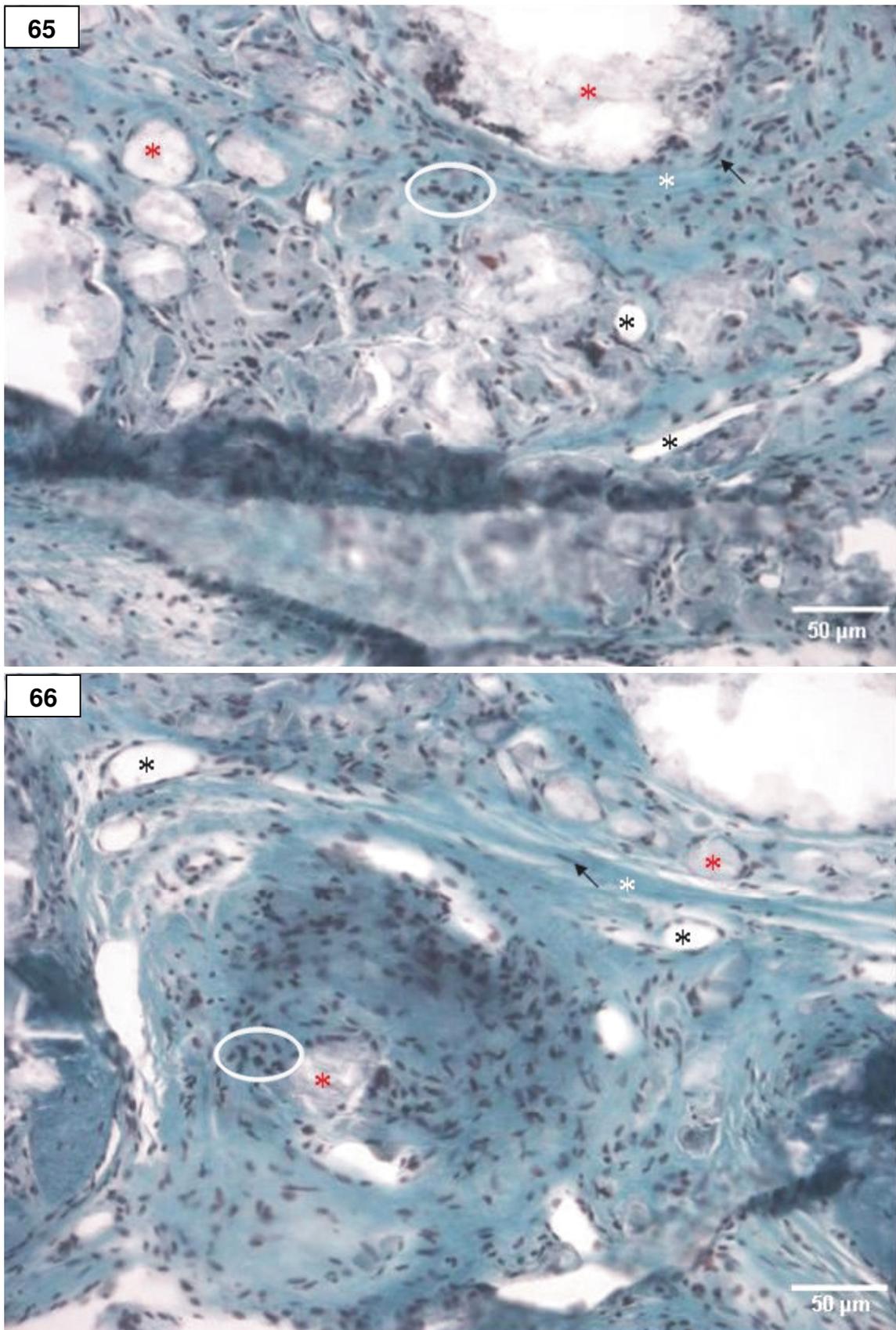
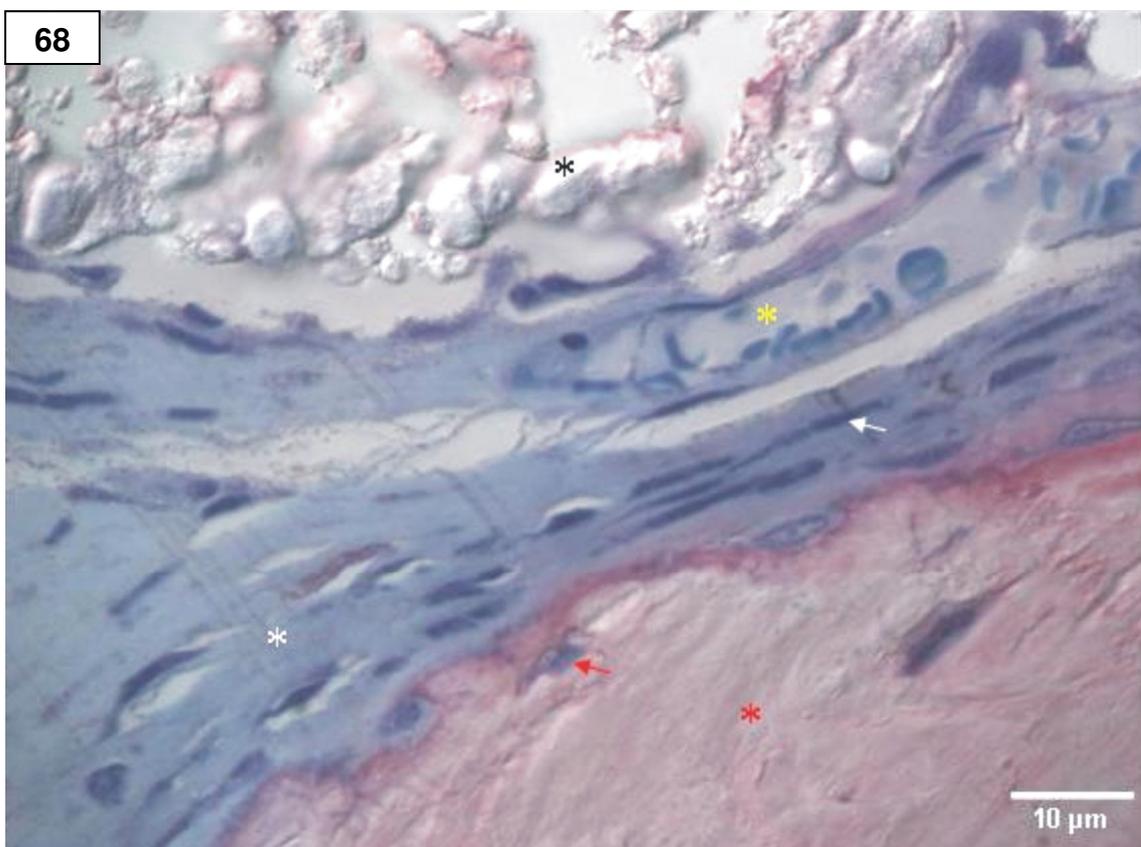
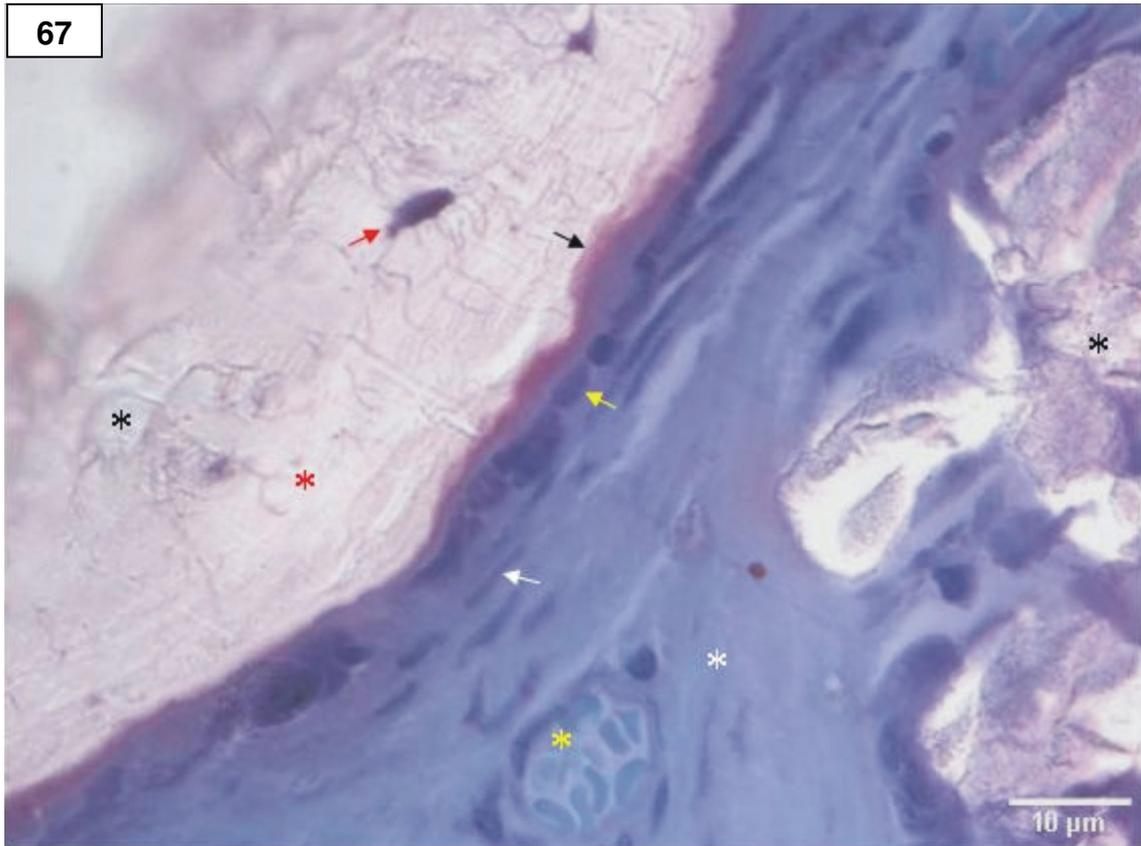


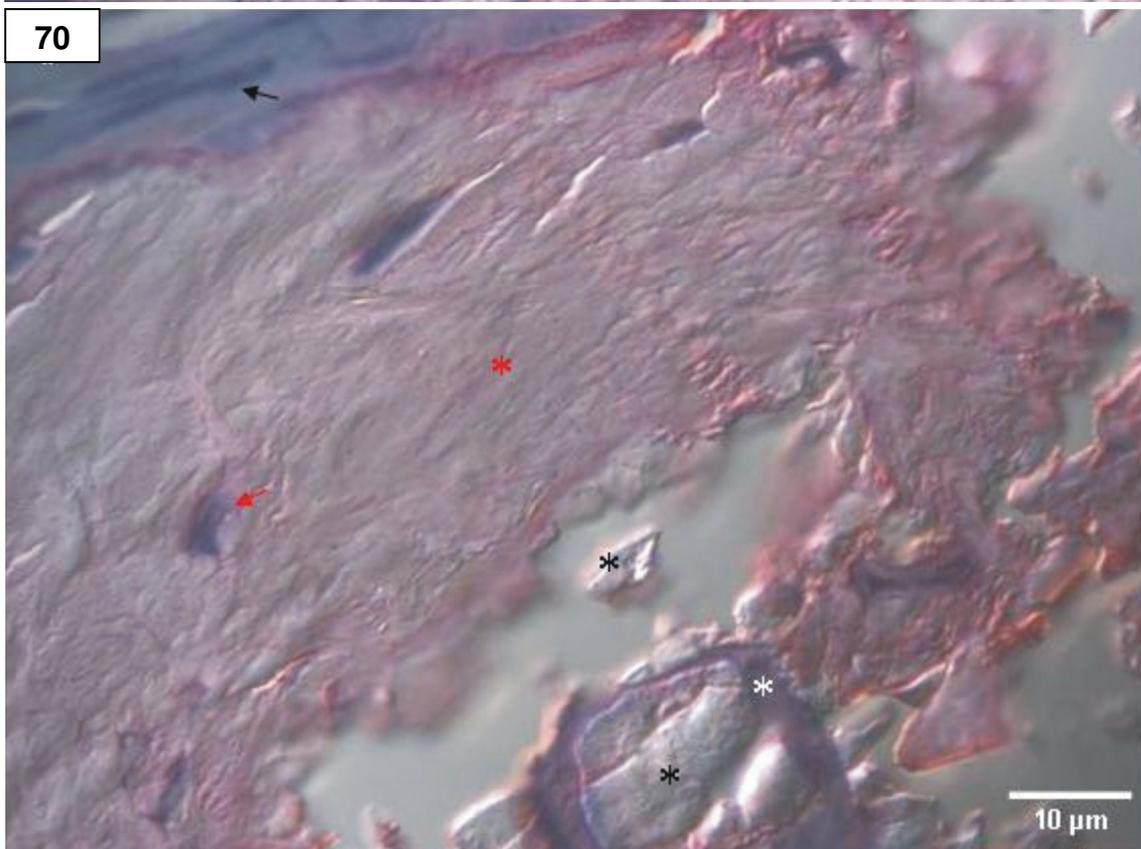
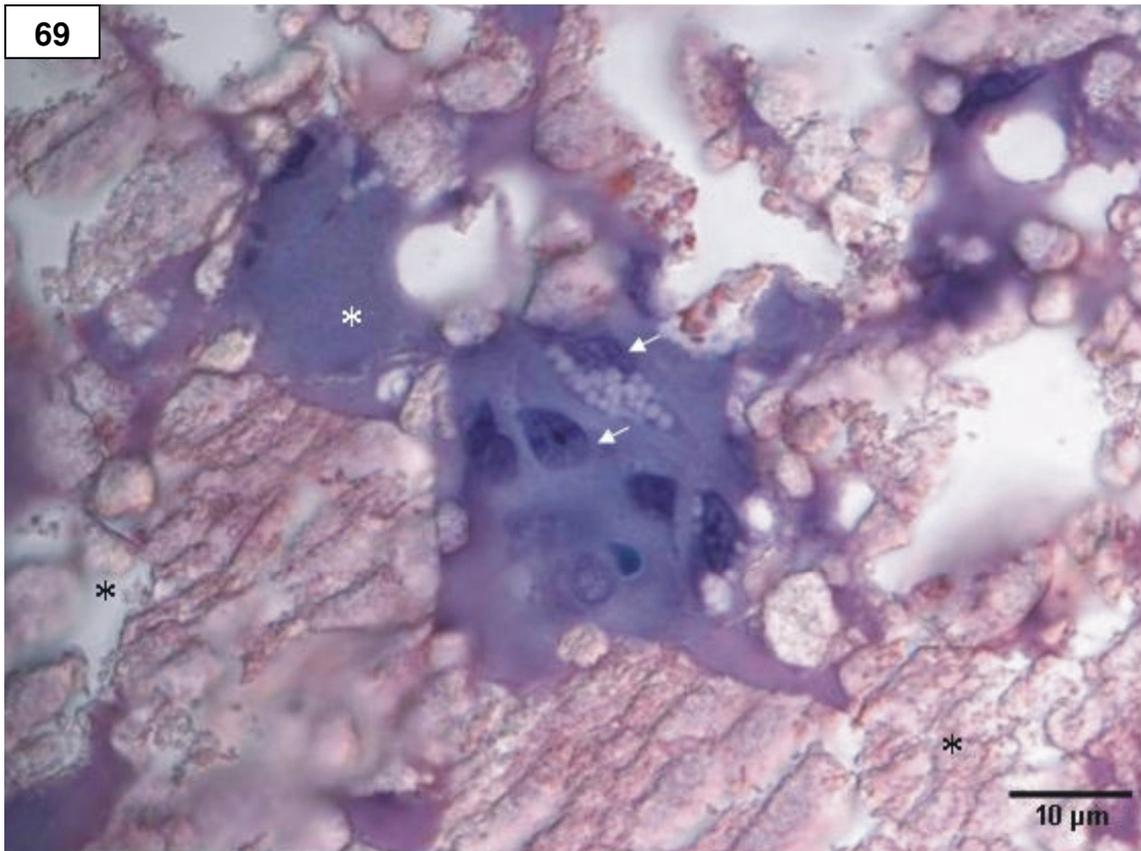
Figura 64. Partículas fragmentadas do biomaterial com células inflamatórias próximas às partículas. Uma célula gigante aderida ao biomaterial está indicada por seta (GII 120 dias – HE).



Figuras 65 e 66. Inflamação crônica ao redor de partículas (asterisco vermelho) na região central do defeito ósseo (células inflamatórias circundadas por elipse), com presença de vasos sangüíneos (asterisco preto), fibroblastos (seta) e tecido conjuntivo fibroso ressaltado por asterisco branco (GII 120 dias – Goldner).



Figuras 67 e 68. Notar o tecido ósseo (asterisco vermelho) sendo formado justaposto ao tecido conjuntivo fibroso. Observar osteoblastos (seta amarela), matriz osteóide (seta preta) e osteócitos (seta vermelha). O tecido conjuntivo fibroso formado ao redor das partículas com fibroblastos e vasos sanguíneos são observados nas duas figuras (GII 120 dias – Azul de toluidina e fucsina básica com contraste interferencial).



Figuras 69 e 70. Tecido conjuntivo fibroso (asterisco branco) em permeio ao biomaterial (asterisco preto) com presença de células inflamatórias (setas brancas na figura 69). A Figura 70 mostra o biomaterial circundado por tecido ósseo (asterisco vermelho), com osteócito (seta vermelha) e por tecido conjuntivo fibroso, um fibroblasto está apontado com seta preta (GII 120 dias – Azul de toluidina e fucsina básica com contraste interferencial).

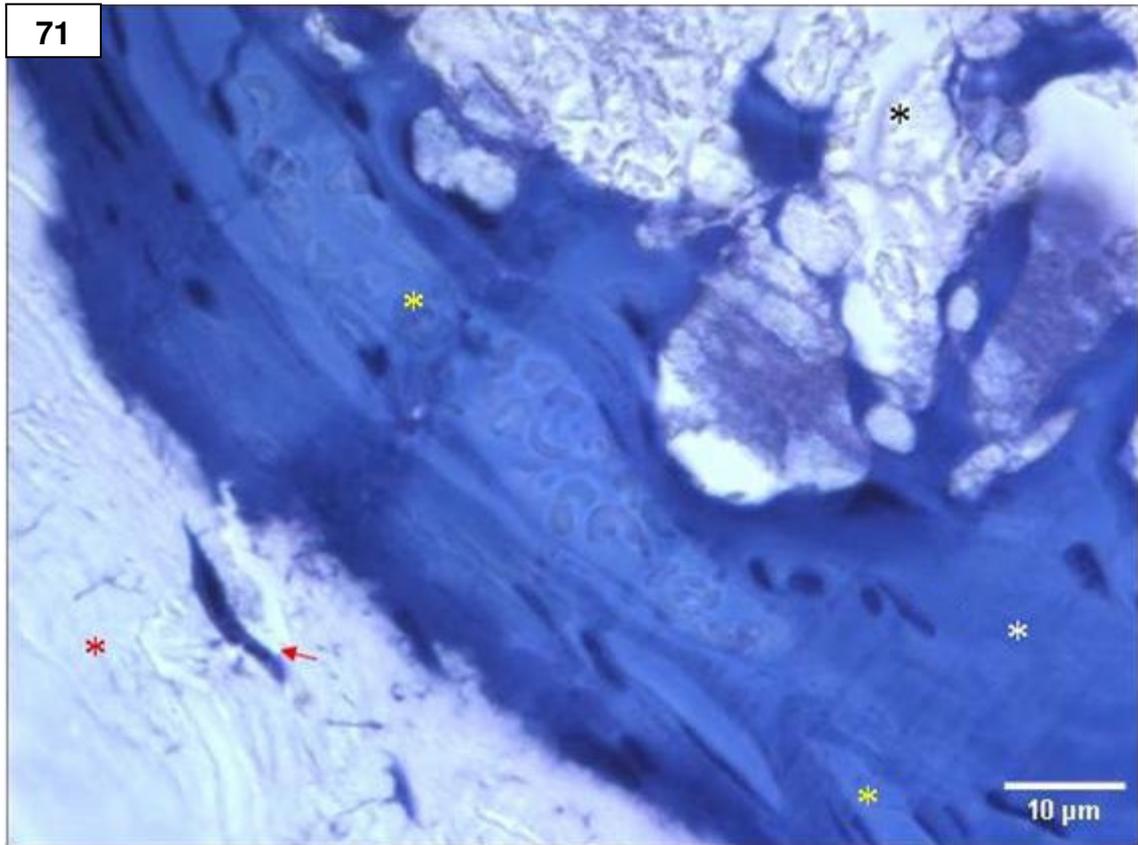


Figura 71. Tecido conjuntivo fibroso (asterisco branco) com vasos sangüíneos (asterisco amarelo), circundando as partículas (asterisco preto), próximos ao tecido ósseo (asterisco vermelho), onde se observa, indicado por seta vermelha, osteócito (GII 120 dias –Azul de Richardson).

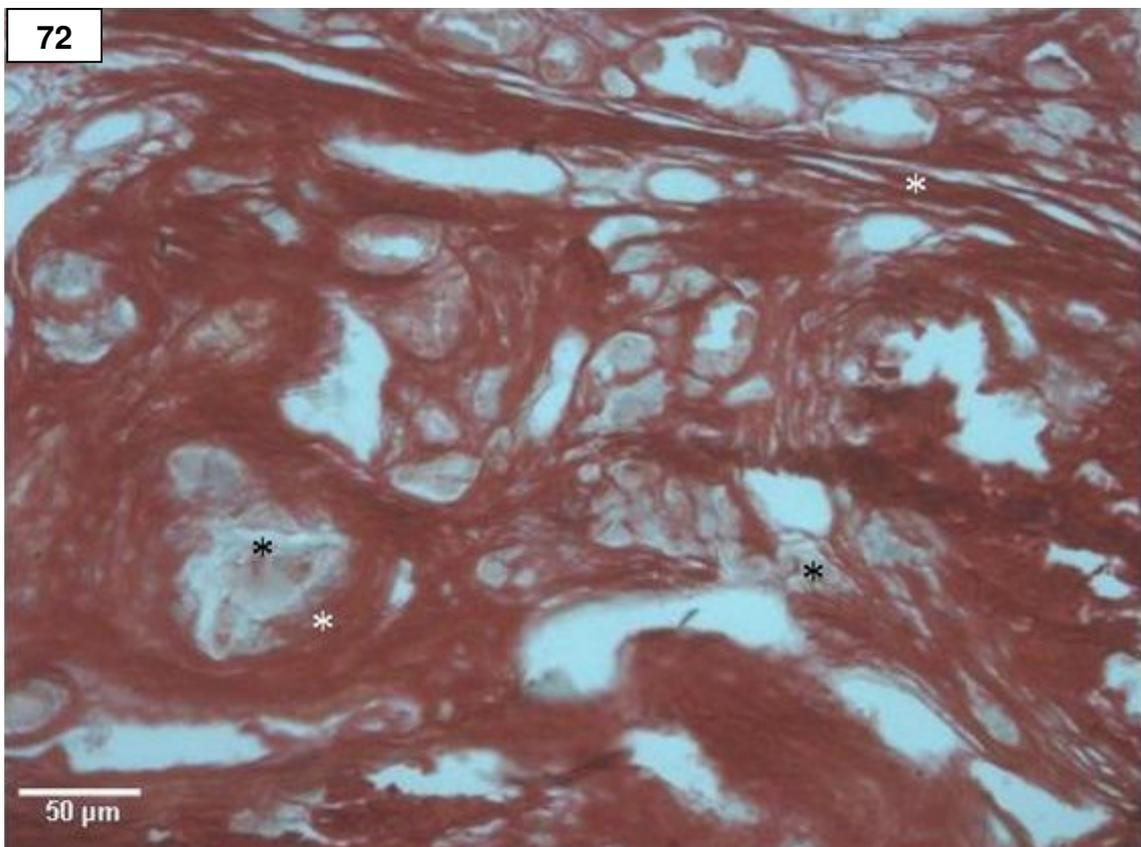


Figura 72. Tecido conjuntivo fibroso (asterisco branco) de permeio ao biomaterial, ressaltado por asterisco preto (GII 120 dias – Picrossírius).

6. DISCUSSÃO

A bioengenharia tecidual óssea tem investigado biomateriais ou técnicas regenerativas, auxiliares na regeneração de defeitos ósseos extensos, onde o potencial regenerativo natural apresenta-se limitado, como alternativa aos enxertos ósseos autógenos usualmente utilizados, pois estes enxertos apresentam desvantagens e limitações em defeitos ósseos de grandes dimensões (UEMURA *et al.*, 2003).

Dentre os biomateriais cerâmicos à base de fosfato de cálcio, a HA é a mais estudada, em testes *in vitro* e *in vivo*, e a mais utilizada nas situações clínicas desfavoráveis ao reparo ósseo (KAWACHI *et al.*, 2000). Esta biocerâmica é biocompatível, osteocondutora e, como arcabouço, adsorve proteínas de adesão e fatores de crescimento que favorecem os eventos celulares característicos da neoformação óssea e, ainda, pode ser disponibilizada em diversos formatos, como bloco, cimento, partículas (KAWACHI *et al.*, 2000; RIMINUCCI e BIANCO, 2003) e, ultimamente, microesferas (RIBEIRO, BARRIAS, BARBOSA, 2006).

Previamente à aplicação clínica destes novos biomateriais ou técnicas regenerativas, faz-se necessário, portanto, realizar estudos experimentais *in vivo* que possibilitem testar suas interações celulares, biocompatibilidade, bem como seu potencial osteogênico. Nestes estudos, os pesquisadores têm empregado diferentes modelos animais, como cabra (ANDERSON *et al.*, 1999), cão (UEDA *et al.*, 2007), coelho (GOSAIN *et al.*, 2003), porco (SCHLEGEL *et al.*, 2006), ovelha (VIATEAU *et al.*, 2007) ou rato (BARRETO, 2006; CARDOSO *et al.*, 2006; MIGUEL *et al.*, 2006).

Para a escolha do modelo animal, deve-se considerar o custo, manejo e facilidade de obtenção, assim como os sítios anatômicos onde os defeitos ósseos serão confeccionados, que devem situar-se em região estável que inclua,

preferencialmente, tecido ósseo cortical e esponjoso com risco de fratura reduzido (FRAME, 1980; SCHMITZ e HOLLINGER, 1986). De acordo com estes critérios, a calvária de rato adulto, que foi o modelo empregado no nosso trabalho, é um sítio apropriado para a confecção de defeitos ósseos (FRAME, 1980). Neste sítio anatômico, o tipo de ossificação apresentado é a intramembranosa, em que as células mesenquimais transformam-se em células osteoprogenitoras, para posterior deposição de matriz osteóide (STREET *et al.*, 2002; HING, 2004). Não obstante estes modelos animais apresentarem similaridades com o organismo humano, é importante ressaltar que os resultados encontrados nestes estudos devem ser analisados com ponderação antes da aplicação clínica de biomateriais.

No contexto da bioengenharia tecidual óssea, defeitos com dimensões críticas ao reparo são apropriados para avaliar a capacidade osteogênica de novos biomateriais ou técnicas regenerativas (SCHMITZ e HOLLINGER, 1986). Contudo, o tamanho exato destes na literatura, é bastante variável, haja vista que Mulliken e Glowaki (1980) utilizaram defeitos com 4 mm, Bosch, Melsen, Vargervik (1995), Verna *et al.* (2002) e Braz *et al.* (2003) confeccionaram defeitos com 5 mm, Brunel *et al.* (1996) e Pryor, Susin, Wikesjö (2006) utilizaram defeitos ósseos de 6 mm, enquanto que Takagi e Urist (1982), Schmitz e Hollinger (1986), Chesmel *et al.* (1998), Marins *et al.* (2004), Cardoso *et al.* (2006), Miguel *et al.* (2006) e Intini *et al.* (2007) estudaram defeitos com 8 mm. Diante do exposto, optou-se por utilizar, no presente estudo, defeitos ósseos com 8 mm, visto que estes mostraram ser apropriados para avaliar a capacidade osteogênica de biomateriais destinados à regeneração óssea, pois, embora haja neoformação óssea restrita às bordas, a área central remanescente não favorece este mecanismo, quando não há a implantação de biomateriais (MIGUEL *et al.*, 2006).

Durante a confecção destes defeitos e implantação de um biomaterial, ocorre rompimento vascular, seguido de extravasamento sangüíneo, interação sangue-material, formação de coágulo, inflamação aguda, inflamação crônica, formação de tecido de granulação, reação de corpo estranho e desenvolvimento de cápsula fibrótica (ANDERSON, RODRIGUES, CHANG, 2007). A presença de citocinas, agentes quimioatrativos, fatores de crescimento e outras moléculas bioativas propicia um local adequado para a ativação e inibição da atividade de macrófagos, e promovem também a ativação e proliferação de outras populações celulares envolvidas na inflamação e na reparação tecidual (ANDERSON, 2000; ROSA, 2001; CARANO e FILVAROFF, 2003; ANDERSON, RODRIGUES, CHANG, 2007).

A intensidade e duração do reparo estão condicionas ao tamanho, formato e propriedades físico-químicas dos materiais (ANDERSON, 2000; ANSELME, 2000). No nosso estudo, não foi observada reação inflamatória aguda, pois o ponto biológico inicial de observação dos espécimes foi de 15 dias, e sabe-se que a duração da inflamação aguda estende-se pelo período máximo de sete dias (ANDERSON, RODRIGUES, CHANG, 2007). Notou-se inflamação crônica em ambos os grupos. No grupo controle (GI – sem implantação de biomaterial), este achado foi observado, apenas, no ponto biológico de 15 dias, entretanto, no grupo experimental (GII – com implantação das microesferas), esta inflamação mostrou-se do tipo crônica granulomatosa em toda a extensão do defeito, caracterizada pela presença de células gigantes, formadas pela fusão de macrófagos derivados de monócitos que podem se aderir à superfície do biomaterial. De acordo com o trabalho de Anderson, Rodrigues e Chang (2007) a fusão destas células pode ser induzida por interleucina-4 e interleucina-13. A inflamação crônica granulomatosa também foi observada em estudo realizado Barreto (2006). Todavia, neste estudo,

que testou microesferas de HA nos pontos biológicos de 15, 45 e 90 dias, em modelo experimental similar, a inflamação crônica granulomatosa mostrou-se mais moderada em comparação ao nosso trabalho. De acordo com Anderson, Rodrigues e Chang (2007), a inflamação crônica ocasionada após a implantação de um material biocompatível dura aproximadamente 15 dias.

Concomitantemente a estes achados, notou-se proliferação vascular em toda a extensão do defeito, tanto no GI quanto no GII, em todos os períodos estudados, mais acentuada no GII. Este mecanismo é de fundamental importância para o reparo dos defeitos ósseos, uma vez que fornece nutrientes, oxigênio e fatores de crescimento necessários à diferenciação e maturação de células mesenquimais indiferenciadas, bem como células da linhagem osteoblástica, em osteoblastos (MURPHY *et al.*, 2004). Todavia, é válido ressaltar que a neoformação vascular pode ser escassa, o que dificulta a regeneração óssea e culmina com a formação de tecido conjuntivo fibroso, principalmente na região central do defeito (CARANO e FILVAROFF, 2003). Formação de tecido conjuntivo fibroso foi evidenciada no nosso grupo controle, durante todos os pontos biológicos, o que corrobora com a literatura (TAKAGI e URIST, 1982; SCHMITZ e HOLLINGER, 1986; BARRETO, 2006; CARDOSO *et al.*, 2006).

Contudo, mesmo havendo angiogênese em toda a área do defeito, pôde-se também observar fibras de colágeno no grupo experimental (GII), tanto de permeio às microesferas fragmentadas, quanto as circundando, em concordância com os resultados de Barreto (2006) e Cardoso *et al.* (2006). Vários fatores podem ter causado a formação deste tecido fibroso, tais como, a fragmentação excessiva do material, gerando partículas passíveis de ingestão pelas células, macroporosidade não apropriada para formação de osso, excesso de área de contato entre células e

os fragmentos do material, e o fato do material não ser bioabsorvível no período experimental (MASTROGIACOMO *et al.*, 2005; HERDE *et al.*, 2007). Ademais, macrófagos aderentes ao biomaterial podem secretar proteínas que estimulam a formação de fibrose (ANDERSON, RODRIGUES, CHANG, 2007). Nas regiões onde o biomaterial estudado mostrou-se bastante fragmentado, houve maior formação de tecido conjuntivo fibroso ao redor e em permeio às suas partículas e, nos pontos biológicos mais tardios, este tecido mostrou-se mais adensado.

O processo de calcinação da HA leva a uma maior cristalinidade do material, agregação e crescimento das nanopartículas com formação dos contornos de grão, e maior resistência à compressão e biodegradação. As microesferas não foram degradadas nos pontos biológicos estudados; isto se deve em parte, ao processo de calcinação (ROSA, SHAREEF, NOORT, 2000; RIBEIRO, BARRIAS, BARBOSA, 2004; TADIC *et al.*, 2004; LACERDA, LAMEIRAS, SILVA, 2006). Observamos que a sinterização das nanopartículas cristalinas do biomaterial, decorrente da calcinação do mesmo, não se deu de forma homogênea, fato que já havia sido observado em trabalho anterior de nosso grupo (SALEM, 2006). Isto favoreceu a fragmentação do biomaterial no interior do tecido, após os diversos tempos estudados, pois inúmeros cristais ou grupos de grãos permaneceram individualizados no interior das microesferas, o que favoreceu sua desagregação.

Ainda, é importante lembrar que a capacidade regenerativa dos biomateriais está condicionada às suas características físico-químicas, topografia, rugosidade e energia de superfície (ANSELME, 2000; MASTROGIACOMO *et al.*, 2005), bem como à manutenção da forma no sítio de implantação (BOYDE *et al.*, 1999), pois sua movimentação suscita processo inflamatório crônico (ANDERSON, 2000). Em nosso estudo, foi observado o deslocamento das microesferas implantadas,

possivelmente devido ao posicionamento da cabeça dos animais ao dormirem, bem como em decorrência do prurido, associado à cicatrização do retalho cutâneo, fatores que, provavelmente, contribuíram para a persistência da inflamação e formação do tecido conjuntivo fibroso. Este deslocamento poderia ter sido evitado se fosse utilizado, juntamente com o arcabouço, membranas, confeccionadas a partir de substâncias naturais ou sintéticas, ou o próprio perióstio do animal. Todavia, em nosso trabalho, tais artifícios não foram empregados para não favorecer a regeneração óssea guiada, técnica que facilita a neoformação óssea, por impedir a migração de células do tecido conjuntivo suprajacente.

Outra característica essencial à regeneração dos defeitos ósseos, especialmente por meio do mecanismo osteocondutor, é a presença de poros com diâmetro apropriado, o que corresponderia, em nosso caso, ao espaço entre as esferas (RIBEIRO, BARRIAS, BARBOSA, 2006). Uma das formas de otimizar este mecanismo seria a produção de esferas com diâmetro regular, de tal forma que sua compactação permitisse a formação de poros com dimensões desejadas, com o objetivo de promover a migração, inserção e proliferação celulares, necessários à neoformação óssea. As microesferas testadas no nosso trabalho, embora tenham sido confeccionadas com metodologia semelhante àquela empregada no trabalho supracitado, não apresentaram diâmetro regular (entre 400 e 600 μm), além do fato de terem deslocado para fora do defeito (pelas razões citadas acima), o que pode ter limitado o potencial regenerativo do biomaterial. Entretanto, quando as microesferas de HA de tamanho regular produzidas por Ribeiro, Barrias, Barbosa (2004) foram testadas em defeitos ósseos críticos em calvária de rato (BARRETO, 2006), mostraram, ao longo do período experimental, resultados semelhantes aos encontrados no nosso estudo, evidenciando mais uma vez a complexidade do tema

especialmente no que toca à determinação de procedimentos para a otimização da eficiência dos biomateriais ara enxerto.

É válido ressaltar que, em regiões onde houve menor fragmentação do material, provavelmente devido à maior compactação previamente ao processo de calcinação, o que levou a uma sinterização mais efetiva, houve maior formação de tecido ósseo ao redor destas partículas, principalmente nas regiões próximas às margens ósseas, no GII, o que evidenciou o potencial osteocondutor do biomaterial utilizado no nosso estudo. Aos 120 dias, este tecido ósseo era mais organizado e localizado em justaposição às partículas, provavelmente em decorrência da bioatividade, característica das cerâmicas à base de fosfato de cálcio (LEGEROS, 2002; ADAMOPOULOS e PAPADOPOULOS, 2007). Diante destes resultados, nosso estudo corrobora com a afirmativa de Mastrogiacomo *et al.* (2005), os quais asseguraram que os biomateriais cerâmicos são eficientes em defeitos ósseos não críticos ao reparo.

Diante do exposto, concluímos que houve formação de tecido ósseo ao redor das partículas, principalmente nas regiões em que as microesferas apresentaram-se menos fragmentadas, onde, provavelmente, o processo de sinterização mostrou-se mais efetivo e esta mineralização mostrou-se principalmente nas proximidades das bordas ósseas; o biomaterial estudado ocasionou resposta inflamatória crônica granulomatosa em todos os pontos biológicos estudados com formação de tecido conjuntivo fibroso em grande parte da extensão do defeito, particularmente nas regiões em que o biomaterial apresentou-se mais fragmentado e disperso.

Para estudos posteriores, sugerimos que este biomaterial possua tamanho regular e que seja realizada a aglutinação das nanopartículas e tratamento térmico de tal forma a proporcionar homogeneidade estrutural. Com o objetivo de evitar o

deslocamento destas microesferas, propomos, ainda, a utilização de membranas sobre o biomaterial implantado ou a adição de agentes aglutinantes, juntamente com o biomaterial, para favorecer a sua estabilidade no sítio implantado.

7. CONCLUSÕES

- Houve formação de tecido ósseo, sobretudo em torno das microesferas mais íntegras, principalmente aquelas localizadas próximas às bordas ósseas, o que demonstrou a capacidade osteocondutora do biomaterial;
- As microesferas mostraram-se, em sua maioria, bastante fragmentadas, de forma heterogênea, o que provavelmente limitou a formação de tecido ósseo, tendo sido observada formação de tecido conjuntivo fibroso em grande parte da extensão do defeito, nos diversos tempos experimentais estudados;
- Observou-se resposta inflamatória crônica em todos os pontos biológicos estudados;
- Através deste trabalho, verificamos a importância da utilização de membranas como o periósteo, ou outros elementos estruturais, para evitar que as microesferas migrem para fora da região do defeito, visando obter condições semelhantes de densidade de partículas para fins de comparação dos diversos tempos experimentais entre si, e destes com o controle.
- Através deste estudo, verificamos também a importância da utilização de microesferas com diâmetros bem definidos, para que, em consequência de sua compactação na cavidade do defeito, se possam definir poros, e avaliar o papel do biomaterial e sua implantação, no processo de neoformação óssea.

REFERÊNCIAS

- ADAMOPOULOS, O.; PAPADOPOULOS, T. Nanostructured bioceramics for maxillofacial applications. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 18, n. 8, p. 1587-1597, 2007.
- ANDERSON, H. C. Matrix vesicles and calcification. **Current rheumatology reports**, v. 5, n. 3, p. 222-226, 2003.
- ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. **Seminars in immunology**, 2007.
- ANDERSON, J. M. The cellular cascades of wound healing. In: DAVIES, J. E. (Edit.). **Bone engineering**. 1. ed. Toronto, Canada: Squared incorporated, 2000, p. 81-93.
- ANDERSON, M. L.; DHERT, W. J.; DE BRUIJN, J. D.; DALMEIJER, R. A., LEENDERS, H.; VAN BLITTERSWIJK, C. A. Critical size defect in the goat's os ilium. A model to evaluate bone grafts and substitutes. **Clinical orthopaedics and related research**, n. 364, p. 231-239, 1999.
- ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v. 21, n. 7, p. 667-681, 2000.
- BALCERZAK, M; HAMADE, E.; ZHANG, L.; PIKULA, S.; AZZAR, G.; RADISSON, J.; BANDOROWICZ-PIKULA, J.; BUCHET, R. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. **Acta biochimica polonica**, v. 50, n. 4, p. 1019-1038, 2003.
- BARRETO, E. C. **Avaliação in vivo do reparo de defeito ósseo com biomaterial do tipo microesferas cerâmicas**. 2006. 103 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia Clínica) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- BARRIAS, C. C.; RIBEIRO, C. C.; RODRIGUES, D.; MIRANDA, M. C. S. Effect of calcium phosphate addition to alginate microspheres: modulation of enzyme release kinetics and improvement of cell adhesion. **Key engineering materials**, v. 284-286, p. 689-692, 2005.

- BET, M. R.; GOISSIS, G.; VARGAS, S.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Cell adhesion and cytotoxicity studies over polyanionic collagen surfaces with variable negative charge and wettability. **Biomaterials**, v. 24, n. 1, p. 131-137, 2003.
- BEZERRA, M. C.; CARVALHO, J. F.; PROKOPOWITSCH, A. S.; PEREIRA, R. M. RANK, RANKL and osteoprotegerin in arthritic bone loss. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 38, n. 2, p. 161-170, 2005.
- BOSCH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Guided bone regeneration in calvarial bone defect using polytetrafluoroethylene membranes. **The cleft palate-craniofacial journal**, v. 32, n. 4, p. 311-317, 1995.
- _____. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. **Journal of craniofacial surgery**, v. 9, n. 4, p. 310-316, 1998.
- BOYDE, A.; CORSI, A.; QUARTO, R.; CANCEDDA, R.; BIANCO, P. Osteoconduction in large macroporous hydroxyapatite ceramic implants: evidence for a complementary integration and disintegration mechanism. **Bone**, v. 24, n. 6, p. 579-589, 1999.
- BRAZ, F.; RAHAL, S. C.; ROCHA, N. S.; TAGA, E.; BIASI, F. Emprego de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita no reparo de defeito induzido em crânio de ratos. **Acta cirúrgica brasileira**, v. 18, n. 1, p. 19-24, 2003.
- BRUNEL, G.; PIANTONI, P.; ELHARAR, F.; BENQUE, E.; MARIN, P.; ZAHEDI, S. Regeneration of rat calvarial defects using a bioabsorbable membrane technique: influence of collagen cross-linking. **Journal of periodontology**, v. 67, n. 12, p. 1342-1348, 1996.
- CARANO, A. D.; FILVAROFF, E. H. Angiogenesis and bone repair. **Drug discovery today**, v. 8, n. 21, p. 980-984, 2003.
- CARDOSO, A. K.; BARBOSA, A. A. Jr.; MIGUEL, F. B.; MARCANTONIO, E. Jr, FARINA, M.; SOARES, G. D.; ROSA, F. P. Histomorphometric analysis of tissue responses to bioactive glass implants in critical defects in rat calvaria. **Cells, tissues, organs**, v. 184, n. 3-4, p. 128-137, 2006.

- CHEMEL, K. D.; BRANGER, J.; WERTHEIM, H.; SCARBOROUGH, N. Healing response to various forms of human demineralized bone matrix in athymic rat cranial defects. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 56, n. 7, p. 857-863, 1998.
- COWAN, C. M.; SHI, Y. Y.; AALAMI, O. O.; CHOU, Y. F.; MARI, C.; THOMAS, R., QUARTO, N.; CONTAG, C. H.; WU, B.; LONGAKER, M. T. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. **Nature biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 560-567, 2004.
- DEE, K. C.; NAUMAN, E. A.; LIEVESAY, G. A.; RICE, J. Research report: learning styles of biomedical engineering students. **Annals of biomedical engineering**, v. 30, n. 8, p. 1100-1106, 2002.
- DELACURE, M. Physiology of bone healing and bone grafts. **Otolaryngologic clinics of North America**, v. 27, n. 5, p. 859-874, 1994.
- DUCHEYNE, P.; QIU, Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. **Biomaterials**, v. 20, n. 23-24, p. 2287-2303, 1999.
- ERLEBACHER, A.; FILVAROFF, E. H.; YE, J. Q.; DERYNCK, R. Osteoblastic responses to TGF- β during bone remodeling. **Molecular biology of the cell**, v. 9, n. 7; p. 1903-1918, 1998.
- FABBRI, M.; CELOTTI, G. C.; RAVAGLIOLI, A. Hydroxyapatite-based porous aggregates: physico-chemical nature, structure, texture and architecture. **Biomaterials**, v. 16, n. 3, p. 225-228, 1995.
- FERREIRA, G. R.; CESTARI, T. M.; GRANJEIRO, J. M.; TAGA, R. Lack of repair of rat skull critical size defect treated with bovine morphometric protein bound to microgranular bioabsorbable hydroxyapatite. **Brazilian dental journal**, v. 15, n. 3, p. 175-180, 2004.
- FRAME, J. W. A convenient animal model for testing bone substitute materials. **Journal of oral surgery**, v. 38, n. 3, p. 176-180, 1980.
- FULMER, M. T.; ISON, I. C.; HANKERMAYER, C. R.; CONSTANTZ, B. R.; ROSS, J. Measurements of the solubilities and dissolution rates of several hydroxyapatites. **Biomaterials**, v. 23, n. 3, p. 751-755, 2002.

- GOSAIN, A. K.; RIORDAN, P. A.; SONG, L.; AMARANTE, M. T.; KALANTARIAN, B.; NAGY, P. G.; WILSON, C. R.; TOTH, J. M.; MCINTYRE, B. L. A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part I. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 109, n. 2, p. 619-630, 2002.
- _____. A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part II. Bioengineering implants to optimize bone replacement in reconstruction of cranial defects. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 114, n. 5, p. 1155-1163, 2004.
- GOSAIN, A. K.; SANTORO, T. D.; SONG, L. S.; CAPEL, C. C.; SUDHAKAR, P. V.; MATLOUB, H. S. Osteogenesis in calvarial defects: contribution of the dura, the pericranium, and the surrounding bone in adult versus infant animals. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 112, n. 2, p.515-527, 2003.
- GURGEL, M. F. C. **Preparação e caracterização de mantas de colágeno aniônico: hidroxiapatita para a reconstrução de tecido ósseo**. 2000. 63 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- HEANEY, R. P. How does bone support calcium homeostasis? **Bone**, v. 33, n. 3, p. 264-268, 2003.
- HENCH, L. L. Bioceramics: from concept to clinic. **Journal of the american ceramic society**, v. 74, n. 7, p. 1487-1510, 1991.
- HERDE, K.; HARTMANN, S.; BREHM, R.; KILIAN, O.; HEISS, C.; HILD, A.; ALT, V.; BERGMANN, M.; SCHNETTLER, R.; WENISCH, S. Connexin 43 expression of foreign body giant cells after implantation of nanoparticulate hydroxyapatite. **Biomaterials**, v. 28, n. 33, p. 4912-4921, 2007.
- HING, K. A. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? **Philosophical transactions of the royal society of London series A**, v. 362, n. 1825, p. 2821-2850, 2004.
- HUTMACHER, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. **Biomaterials**, v. 21, n. 24, p. 2529-2543, 2000.

- INTINI, G.; ANDREANA, S.; INTINI, F. E.; BUHITE, R. J.; BOBEK, L. A. Calcium sulfate and platelet-rich in plasma make a novel osteoinductive biomaterial for bone regeneration. **Journal of translational medicine**, v. 5, n. 13, p. 1-13, 2007.
- KATCHBURIAN, E; ARANA, V. **Histologia e embriologia oral**. 1. ed. São Paulo: Ed. Médica Panamericana, 1999, p. 23-37.
- KAY, M. I.; YOUNG, R. A.; POSNER, A. S. Crystal structure of hydroxyapatite. **Nature**, v. 12, n. 204, p. 1050-1052, 1964.
- KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; REIS, R.; ALVES, O. L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química nova**, v. 23, n. 1, p. 518-522, 2000.
- KIM, S.-S.; PARK, M. S.; JEON, O.; CHOI, C. H.; KIM, B.-S. Poly (lactide-co-glycolide)/ hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 8, p. 1399-1409, 2006.
- KNESER, U.; STANGENBERG, L.; OHNOLZ, J.; BUETTNER, O.; STERN-STRÄETER, J.; MÖBEST, D.; HORCH, R. E.; STARK, G. B.; SCHAEFER, D. J. Evaluation of processed bovine cancellous bone matrix seeded with syngenic osteoblasts in a critical size calvarial defect rat model. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 10, n. 3, p. 695-707, 2006.
- LACERDA, K. A.; LAMEIRAS, F. S.; SILVA, V. V. Síntese e caracterização de matrizes porosas de hidroxiapatita para aplicação como fontes radioativas em braquiterapia. **Revista Escola de Minas**, v. 59, n. 2, p. 217-223, 2006.
- LANGER, R. S.; VACANTI, J. P. Tissue engineering: the challenges ahead. **Scientific american**, v. 280, n. 4, 1999.
- LASKIN, D. M. State of the art alveolar ridge augmentation. **The compendium of continuing education in dentistry**, Suppl. 2, p. 546-548, 1982.
- LEGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clinical orthopaedics and related research**, n. 395, p. 81-98, 2002.

- LIM, S. C.; LEE, M. J.; YEO, H. H. Effects of various implant materials on regeneration of calvarial defects in rats. **Pathology international**, v. 50, n. 8, p. 594-602, 2000.
- LOGEART-AVRAMOGLU, D. ; SCHAEFER, D. J. ; POLYKANDRIOTIS, E. ; HORCH, R. E. Engineering bone: challenges and obstacles. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 9, n. 1, p. 72-84, 2005.
- LU, J. X.; FLAUTRE, B.; ANSELME, K.; HARDOUIN, P.; GALLUR, A.; DESCAMPS, M.; THIERRY, B. Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization *in vitro* and *in vivo*. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 10, n. 2 p. 111-120, 1999.
- MARCANTONIO, E. Jr ; MARCANTONIO, R. A. C. ; CIRELLI, J. A. Regeneração óssea vertical e horizontal. In: RAPP, G.; TUNES, U. (Edit.). **Atualização em periodontia e implantodontia**. 1.ed. São Paulo: Artes Médicas, 1999, p. 297-316.
- MARDEN, L. J.; HOLLINGER, J. O.; CHAUDHARI, A.; TUREK, T. ; SCHAUB, R. G.; RON, E. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 is superior to demineralized bone matrix in repairing craniotomy defects in rat. **Journal of biomedical materials research**, v. 28, n. 10, p. 1127-1138, 1994.
- MARINS, L. V.; CESTARI, T. M.; SOTTOVIA, A. D.;GRANJEIRO, J. M.; TAGA, R. Radiographic and histological study of perennial bone defect repair in rat calvaria after treatment with blocks of porous bovine organic graft material. **Journal of applied oral science**, v.12, n. 1, p. 62-69, 2004.
- MASTROGIACOMO, M.; MURAGLIA, A.; KOMLEV, V.; PEYRIN, F.; RUSTICHELLI, F.; CROVACE, A.; CANCEDDA, R. Tissue engineering of bone: search for a better scaffold. **Orthodontics & craniofacial research**, v. 8, n. 4, p. 277-284, 2005.
- MEGHJI, S. Bone remodelling. **Brazilian dental journal**, v. 172, n. 6, p. 235-242, 1992.
- METSGER, D. S.; RIEGER, M.R.; FOREMAN, D.W. Mechanical properties of sintered hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramic. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 10, n. 1, p. 9-17, 1999.

- MIGUEL, F. B.; CARDOSO, A. K.; BARBOSA, A. A. Jr; MARCANTONIO, E. Jr; GOISSIS, G.; ROSA, F. P. Morphological assessment of the behavior of three-dimensional anionic collagen matrices in bone regeneration in rats. **Journal of biomedical materials research. Part B, applied biomaterials**, v. 78, n. 2, p. 334-339, 2006.
- MISCH, C. E.; DIETSH, F. Bone-grafting materials in implant dentistry. **Implant dentistry**, v. 2, n. 3, p. 158-167, 1993.
- MULLIKEN, J. B.; GLOWACKI, J. Induced osteogenesis for repair and construction in the craniofacial region. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 65, n. 5, p. 553-560, 1980.
- MURPHY, W. L.; SIMMONS, C. A.; KAIGLER, D.; MOONEY, D. J. Bone regeneration via a mineral substrate and induced angiogenesis. **Journal of dental research**, v. 83, n. 3, p. 204-210, 2004.
- PARK, J. **Biomaterials Science and Engineering**, Plenum Press, 1984.
- PATEL, N.; BROOKS, R. A.; CLARKE, M. T.; LEE, P. M.; RUSHTON, N.; GIBSON, I. R.; BEST, S. M.; BONFIELD, W. *In vivo* assessment of hydroxyapatite and silicate-substituted hydroxyapatite granules using an ovine defect model. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 16, n. 5, p. 429-440, 2005.
- PRYOR, M. E.; POLIMENI, G.; KOO, K. T.; HARTMAN, M. J.; GROSS, H.; APRIL, M.; SAFADI, F. F.; WIKESJÖ, U. M. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: histologic and histometric observations. **Journal of clinical periodontology**, v. 32, n. 9, p. 966-972, 2005.
- PRYOR, M. E.; SUSIN, C.; WIKESJÖ, U. M. E. Validity of radiographic evaluations of bone formation in a rat calvaria osteotomy defect model. **Journal of clinical periodontology**, v. 33, n. 6, p. 455-460, 2006.
- RHO, J. Y.; KUHN-SPEARING, L.; ZIOUPOS, P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. **Medical engineering & physics**, v. 20, n. 2, p. 92-102, 1998.
- RIBEIRO, C. C.; BARRIAS, C. C.; BARBOSA, M. A. Calcium phosphate-alginate microspheres as enzyme delivery matrices. **Biomaterials**, v. 25, n. 18, p. 4363-4373, 2004.

- _____. Preparation and characterization of calcium-phosphate porous microspheres with a uniform size for biomedical applications. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 17, n. 5, p. 455-463, 2006.
- RIMINUCCI, M.; BIANCO, P. Building bone tissue: matrices and scaffolds in physiology and biotechnology. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 36, n. 8, p. 1027-1036, 2003.
- RIPAMONTI, U.; CROOKS, J.; RUEGER, D. Induction of bone formation by recombinant human osteogenic protein-1 and sintered porous hydroxyapatite in adult primates. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 107, n. 977, p. 977-988, 2001.
- ROSA, A. L.; SHAREEF, M. Y.; NOORT, R. Efeito das condições de preparação e sinterização sobre a porosidade da hidroxiapatita. **Pesquisa odontológica brasileira**, v. 14, n. 3, p. 273-277, 2000.
- ROSA, F. P. **Resposta tecidual de matrizes de pericárdio bovino, submetidas a diferentes tratamentos químicos, implantadas sobre calvária de ratos**. 2001. 89 f. Tese (Doutorado em Periodontia) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- RUPPRECHT, S.; MERTEN, H.-A.; KESSLER, P.; WILTFANG, J. Hydroxyapatite cement (BoneSource™) for repair of critical sized calvarian defects-an experimental study. **Journal of cranio-maxillofacial surgery**, v. 31, n. 3, p. 149-153, 2003.
- SALEM, R. **Análise de compósitos de hidroxiapatita e alginato com potencial para aplicação futura como biomateriais ortopédicos**. 2006. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- 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.

SANTIN, M.; RHYS-WILLIAMS, W.; O'REILLY, J.; DAVIES, M. C.; SHAKESHEFF, K.; LOVE, W. G.; LLOYD, A. W.; DENYER, S.P. Calcium-binding phospholipids as a coating material for implant osteointegration. **Journal of the royal society interface**, v. 3, n. 7, p. 277-281, 2006.

SARAIVA, G. L.; LAZARETTI-CASTRO, M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 46, n. 1, p. 72-78, 2002.

SCHLEGEL, K. A.; LANG, F. J.; DONATH, K.; KULOW, J. T.; WILTFANG, J. The monocortical critical size bone defect as an alternative experimental model in testing bone substitute materials. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics**, v. 102, n.1, p.7-13, 2006.

SCHMITZ, J. P.; SCHWARTZ, Z.; HOLLINGER, J. O.; BOYAN, B. D. Characterization of rat calvarial nonunion defects. **Acta anatomica**, v. 138, n. 2, p. 185-192, 1990.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clinical orthopaedics and related research**, n. 205, p. 299-308, 1986.

SHIN, H.; JO, S.; MIKOS, A. G. Biomimetic materials for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, n. 28, p. 4353-64, 2003.

SILVA, M. H. P. **Apostila de Biomateriais**. Disponível em: <<http://mesonpi.cat.cbpf.br/e2006/posgraduacao/pdf/p3/ApostilaBiomateriaias.pdf>>. Acesso em: 17 out. 2007.

SODEK, J.; MCKEE, M. D. Molecular and cellular biology of alveolar bone. **Periodontology 2000**, v. 24, p. 99-126, 2000.

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

STREET, J.; BAO, M.; DEGUZMAN, L.; BUNTING, S.; PEALE, F. V. Jr; FERRARA, N.; STEINMETZ, H.; HOFFEL, J.; CLELAND, J. L.; DAUGHERTY, A.; BRUGGEN, N. V.; REDMOND, H. P.; CARANO, R. A. D.; FILVAROFF, E. H. Vascular endothelial growth factor stimulated bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 99, n. 15, p. 9656-9661, 2002.

- SUH, H.; HAN, D. W.; PARK, J. C.; LEE, D. H.; LEE, W. S.; HAN, C. D. A bone replaceable artificial bone substitute: osteoinduction by combining with bone inducing agent. **Artificial organs**, v. 25, n. 5, p. 459-66, 2001.
- SUNNY, M. C.; RAMESH, P.; VARMA, H. K. Microstructured microspheres of hydroxyapatite bioceramic. **Journal of materials Science. Materials in medicine**, v. 13, n. 7, p. 623-632, 2002
- TADIC, D.; BECKMANN, F.; SCHWARZ, K.; EPPLE, M. A novel method to produce hydroxyapatite objects with interconnecting porosity that avoids sintering. **Biomaterials**, v. 25, n. 16, p. 3335-3340, 2004.
- TAKAGI, K.; URIST, M. R. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. **Annals of surgery**, v. 196, n. 1, p. 100-109, 1982.
- TAKANO, Y.; SAKAI, H.; BABA, O.; TERASHIMA, T. Differential involvement of matrix vesicles during the initial and appositional mineralization processes in bone, dentin, and cementum. **Bone**, v. 26, n. 4, p. 333-339, 2000.
- TEITELBAUM, S. L. Bone resorption by osteoclasts. **Science**, v. 289, n. 5484; p. 1504-1508, 2000.
- TEMENOFF, J. S.; MIKOS, A. G. Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2405-2412, 2000.
- UEDA, M.; SUMI, Y.; MIZUNO, H.; HONDA, M.; ODA, T.; WADA, K.; BOO, J. S.; HATA, K.-I. Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery. **Materials science and engineering**, v. 13, n. 1-2, p. 7-14, 2000.
- UEMURA, T.; DONG, J.; WANG, Y.; KOJIMA, H.; SAITO, T.; IEJIMA, D.; KIKUCHI, M.; TANAKA, J.; TATEISHI, T. Transplantation of cultured bone cells using combinations of scaffolds and culture techniques. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2277-2286, 2003.
- VATS, A.; TOLLEY, N. S.; POLAK, J. M.; GOUGH, J. E. Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications. **Clinical otolaryngology and allied sciences**, v. 28, n. 3, p. 165-172, 2003.

- VERNA, C.; BOSCH, C.; DALSTRA, M.; WIKESJÖ, U. M. E.; TROMBELLI, L.
Healing patterns in calvarial bone defects following guided bone regeneration in rats. A micro-CT scan analysis. **Journal of clinical periodontology**, v. 29, n. 9, p. 865-870, 2002.
- VIATEAU, V.; GUILLEMIN, G.; BOUSSON, V.; OUDINA, K.; HANNOUCHE, D.; SEDEL, L.; LOGEART-AVRAMOGLU, D.; PETITE, H. Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered grafts: a study on sheep. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 25, n. 6, p. 741-749, 2007.
- WU, T. J.; WU, T.-J.; HUANG, H.-H.; LAN, C.-W.; LIN, C.-H.; HSU, F.-Y.; WANG, Y.-J. Studies on microspheres comprised of reconstituted collagen and hydroxyapatite. **Biomaterials**, v. 25, n. 4, p. 651-658, 2004.

ANEXO



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
Avenida Universitária, S/N – Módulo I - 44.031-460 – Feira de Santana –BA
Fone (075) 3224-8365

Feira de Santana, 04 de maio de 2006.

Ofício: 012/06

De: Prof^a. Iraci Gomes Bonfim
Coordenadora do CEUA

Para: Ilma. Sra. Isabela Cerqueira Barreto

Prezada Mestranda,

Esclarecemos a V.Sa. que no Projeto, "UTILIZAÇÃO DE MICROESFERAS DE HIDROXIAPATITA NANOMÉTRICAS NA REGENERAÇÃO DE DEFEITOS CRÍTICOS EM CALVÁRIA E NÃO CRÍTICOS EM FÊMUR DE RATO" foram analisados: os objetivos, metodologia, revisão de literatura e justificativa, estando os mesmos em consonância com as normas do CEUA, motivo pelo qual, foi deferido favoravelmente a execução do projeto, conforme metodologia proposta.

Atenciosamente,


Prof^a Iraci G. Bonfim
Coordenadora CEUA

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)