Universidade Federal Fluminense

FLÁVIO MARCOS GASPERINI

AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE NANOHIDROXIAPATITAS NO REPARO ÓSSEO DE TÍBIAS DE COELHOS

NITERÓI

2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

FLÁVIO MARCOS GASPERINI

AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE NANOHIDROXIAPATITAS NO REPARO ÓSSEO DE TÍBIAS DE COELHOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ MAURO GRANJEIRO

Profª Colaboradora: Dra. MÔNICA DIUANA CALASANS MAIA

NITERÓI

2010

G249 Gasperini, Flávio Marcos
Avaliação da biocompatibilidade de nanohidroxiapatitas no reparo ósseo de tíbias de coelhos / Flávio Marcos Gasperini. – Niterói: [s.n.], 2010.

151 f.:il., 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade Federal Fluminense, 2010.

1. Transplante ósseo. 2. Biomateriais. 3. Hidroxiapatitas. 4. Tíbia-Coelho. I. Titulo.

CDD 617.471059

FLÁVIO MARCOS GASPERINI

AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE NANOHIDROXIAPATITAS NO REPARO ÓSSEO DE TÍBIAS DE COELHOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Ciências Médicas.

Aprovado em _____ de 2010.

BANCA EXAMINADORA

_____
Prof. Dr. JOCEMIR RONALDO LUGON
UFF

_____
Dra. ELENA MAVROPOULOS OLIVEIRA TUDE
CBPF / MCT

_____
Profª. Dra. INAYÁ CORRÊA BARBOSA LIMA
UERJ-IPRJ-DEMEC

Niterói

2010

AGRADECIMENTOS

Gostaria de manifestar meu sentimento de gratidão irrestrito e profundo às pessoas que colaboraram para a realização deste trabalho, de forma científica, filosófica, moral e/ou espiritual. Espero não pecar pelo esquecimento, mas é meu dever dividir esta conquista.

Aos meus pais Carlos e Lourdes pela presença em todos os momentos, pelo carinho, pela maneira como me educaram e ensinaram os verdadeiros valores da vida, espero compartilhar as alegrias e o aprendizado, amo vocês.

À minha esposa Rosana, minha namorada, companheira, amiga, meu braço direito e muitas vezes minha voz pensante todos os dias nesses quase quinze anos de convívio, obrigado por você existir na minha vida e no meu coração.

Ao meu pequeno grande rapaz, meu filho Pedro Henrique, razão incondicional de tanto esforço e da minha vida, muitas vezes o homem da casa, quando da minha ausência, cuidando da mamãe. Papai te amo muito.

Ao meu querido irmão Fernando, pelo convívio e exemplo, obrigado por permitir-me compartilhar muitos momentos importantes. À minha cunhada Patrícia, obrigado pela força e pelo carinho que sempre teve conosco. Ao meu querido sobrinho Murilo, que está prestes a surgir neste mundo para trazer mais alegrias à nossa família.

Aos meus sogros Manuel e Deolinda, que sempre me incentivaram e acreditaram no meu potencial, muito obrigado. À minha cunhada Patrícia, que mesmo distante, permanece sempre uma irmã que eu nunca tive. Obrigado.

Aos meus avós, Hermínio e Urondina, e Dulce (*in memoriam*), meu exemplo de grande família unida e de vida, sempre amarei vocês.

À minha família, que sempre observou meu esforço nesse longo caminho científico, meus sinceros agradecimentos.

Ao meu orientador José Mauro Granjeiro, por acreditar na minha capacidade desde o início, pela forma como conduz um grupo multidisciplinar focado na pesquisa científica relacionada aos biomateriais. Obrigado pelo aprendizado nesses anos de convívio e pela amizade.

Ao meu segundo irmão, o professor e amigo inestimável Fábio Mitri, pela convivência há quinze anos, pelo auxílio nesse vasto caminho profissional e pelos momentos de descontração e comprometimento, muito obrigado. À minha querida amiga, Daniela, agradeço o apoio e incentivo.

Ao grande amigo Rafael Bonato, pela boa convivência nesses dois anos de Pós-Graduação, pelo auxílio nas cirurgias, sempre prestativo, e pelos momentos descontraídos, meus sinceros agradecimentos.

Ao meu amigo e xerife do Image Pro, Gustavo Fernandes, obrigado pelo inesgotável interesse em ajudar, mesmo sem tempo para si próprio. Agradeço seu auxílio nas avaliações estatísticas e na elaboração das análises.

À professora e amiga Mônica Calasans, pelo companheirismo e irretocável comprometimento com o grupo, pelos ensinamentos, pelo convívio e por me orientar de forma tão prestativa, muito obrigado.

Ao amigo Rodrigo Resende, pela ajuda inestimável na cirurgia dos coelhos e pelo convívio nos dias de alojamento no LNLS-Campinas.

À professora Adriana Terezinha, por me receber no laboratório e possibilitar maior compreensão na análise das lâminas, no começo dos trabalhos.

À professora Eliane Pedra Dias, por me receber no estágio probatório, seus ensinamentos foram essenciais para compreender a Patologia.

Aos professores Solange Artimos de Oliveira, Gilberto Perez Cardoso e Jocemir Ronaldo Lugon, por me receberem no Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, pelas orientações e pela oportunidade de realizar esta pesquisa.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, em especial Luis Guillermo Coca Velarde e Maria Luiza Garcia Rosa, meus sinceros agradecimentos.

À química Sílvia pelo cuidado com a síntese e caracterização das biocerâmicas e pelos ensinamentos nessa área tão importante.

À Elena, Amanda e Andréa, pela inestimável contribuição nos testes de dissolução dos materiais e pelo aprendizado no CBPF, obrigado. Ao professor Alexandre Malta Rossi, pela atenção em me receber no LABIOMAT, pelas orientações quanto ao comportamento físico-químico das biocerâmicas estudadas e pelo tempo disponível a desanuviar meus questionamentos e incertezas, meus sinceros agradecimentos.

Aos anestesistas veterinários Fábio Áscoli e Alice, pelo cuidado e carinho com os animais, pela realização e monitoramento das anestesias e analgesias no trans e pós operatório e pelo aprendizado no manejo dos coelhos, muito obrigado. Ao Sr. Júlio, funcionário do laboratório de produção de coelhos (LPC), pelo cuidado com os animas e seu habitat.

À professora Carla Eponina, por me receber em seu laboratório na UFF e pelas orientações e prestatividade. À técnica Bartira, pela atenção e cuidado no processamento de parte das amostras, obrigado.

Às técnicas em histologia Aline e Marcelli, pelo cuidado e orientação no processamento das amostras.

Ao professor Marcos Farina, obrigado por me receber no Laboratório de Biomineralização da UFRJ, pelas orientações e por disponibilizar o microscópio para a realização da captura de todas as imagens histológicas, muito obrigado. À Mair Machado, técnica do laboratório, obrigado pelo comprometimento na metalização das amostras, pelas conversas e ensinamentos.

Aos funcionários do Laboratório de Microscopia Eletrônica da COPPE-UFRJ, por possibilitarem a análise dos biomateriais e pelo aprendizado recebido.

Ao professor Carlos Mandarim de Lacerda, que me recebeu com todo carinho nas suas aulas na UERJ, possibilitando o aprendizado básico das análises estereológicas, muito obrigado.

À professora Inayá Corrêa Barbosa Lima, por disponibilizar o Laboratório de Instrumentação Nuclear da COPPE-UFRJ para análise das amostras, pela colaboração inestimável nas análises de Microfluorescência de Raios X com Radiação Síncrotron, pelos ensinamentos e convívio no LNLS, meu sincero agradecimento. Às queridas Érika Sales e Gabriela Ribeiro, obrigado pelo comprometimento nas análises de Microtomografia Computadorizada e Microfluorescência de Raios X com Radiação Síncrotron das amostras e pelo aprendizado.

Aos funcionários do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas-SP, por permitir o uso da linha D09-µXRF-SR e possibilitar o refinamento das análises, em especial o Sr. Carlos Pérez.

Ao Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), por ceder espaço para análise de MEV de interface das amostras. Ao técnico Leandro Lidizio e à pesquisadora Lídia Ágata de Sena, pela execução destas análises no Núcleo de Laboratório de Microscopia (LABMI), obrigado.

Ao amigo e técnico do LABMI Igor Iuco Castro Silva, pela compilação dos resultados e pelo cuidado nas análises, pelo convívio e aprendizado.

Aos professores e amigos Gutemberg Alves, Carolina Spiegel e Aline Muniz, pelas inestimáveis orientações, pelo aprendizado e principalmente pelo convívio harmonioso. À querida amiga Letícia Castro, pelo comprometimento em tudo o que faz, pelo cuidado com as análises e na elaboração dos corantes, obrigado.

Aos queridos amigos do grupo Rafael Cotias, Bruno Melo, Callinca, Andrea, Cristina, Carol Bergmann, Erika Calvano, Débora Yassuda, Neusa, Ingrid, Waléria e aos alunos de iniciação, pelo convívio e aprendizado compartilhado.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Oftalmologistas, Cirurgiões, Nutricionistas e Ortopedistas pela troca de experiências e pela interação nos seminários.

Ao amigo José Calasans, pelas orientações e pela convivência recente, e às queridas Jane, Juliete e Suiam, pelo carinho com que me receberam no consultório, obrigado.

E agradeço àqueles que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho, seja num gesto, seja numa palavra, e àqueles que por algum motivo não pude enaltecer neste momento. Obrigado pelo aprendizado constante.

Agradeço à Deus, por ter-me dado forças
para trilhar os caminhos da ciência, com amor ao
próximo e sabedoria.

Aos meus dois amores

Rosana e Pedro Henrique,

minha luz e minha vida.

“A única coisa que se coloca entre um homem e o que ele quer na vida é normalmente meramente a vontade de tentar e a fé para acreditar que aquilo é possível.”

Richard M. Devos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **25**
2. REVISÃO DA LITERATURA **29**
2.1 TECIDO ÓSSEO **29**
2.2 MECANISMOS DE MINERALIZAÇÃO BIOLÓGICA **34**
2.3 MECANISMOS BIOLÓGICOS DO REPARO ÓSSEO **35**
2.4 CLASSIFICAÇÃO DOS ENXERTOS ÓSSEOS **37**
2.4.1 ENXERTOS AUTÓGENOS **37**
2.4.2 ENXERTOS ALÓGENOS **38**
2.4.3 ENXERTOS XENÓGENOS **38**
2.4.3 ENXERTOS ALOPLÁSTICOS **39**
2.4.3.1 FOSFATOS DE CÁLCIO **40**
2.4.3.1.1 HIDROXIAPATITA **40**
2.5 AVALIAÇÃO DA COMPATIBILIDADE **43**
2.5.1 CLASSIFICAÇÃO DOS BIOMATERIAIS QUANTO À RESPOSTA BIOLÓGICA **45**
2.5.1.1 BIOINERTE **45**
2.5.1.2 BIOREATIVO **45**
2.5.1.3 BIOATIVO **46**
2.5.1.4 ABSORVÍVEIS **47**
2.5.1.5 BIOTOLERANTE **47**
2.5.1.6 BIOFUNCIONAL **47**
2.5.1.7 BIOARTIFICIAIS **48**
2.5.2 TESTES DE BIOCOMPATIBILIDADE *IN VIVO* **49**
2.6 A UTILIZAÇÃO DO COELHO COMO MODELO ANIMAL EM CIRURGIA EXPERIMENTAL **49**
2.7 O USO DA ESCALA NANOMÉTRICA NA BIOENGENHARIA **52**
2.8 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DOS FOSFATOS DE CÁLCIO **55**
2.8.1 ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X (XRD) **56**
2.8.2 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NO INFRA VERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR) **57**
2.8.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (SEM) **57**
2.8.4 TESTES DE DISSOLUÇÃO EM TAMPÕES MES E HEPES **58**
2.8.5 MICROFLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR RADIAÇÃO SÍNCROTRON (μXRF-SR) **58**
3. HIPÓTESE **60**

4. OBJETIVOS **61**
4.1 OBJETIVO GERAL **61**
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS **61**
5. MATERIAL E MÉTODOS **62**
5.1 SÍNTESE DOS MATERIAIS **62**
5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA **63**
5.2.1 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (XRD) **64**
5.2.2 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORNADA DE FOURIER (FT-IR) **64**
5.2.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (SEM) **64**
5.2.4 TESTES *IN VITRO* DE DISSOLUÇÃO COM TAMPÕES MES E HEPES **65**
5.2.5 MICROFLUORESCÊNCIA DE RAIOS X COM RADIAÇÃO SÍNCROTRON (μXRF-SR) **66**
5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS **67**
5.4 INCLUSÃO EM RESINA **74**
5.5 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA **75**
6. RESULTADOS **79**
6.1 CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICA DOS MATERIAIS **79**
6.1.1 ANTES DA IMPLANTAÇÃO **79**
6.1.1.1 ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (XRD) **79**
6.1.1.2 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR) **79**
6.1.1.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (SEM) **80**
6.1.1.4 ANÁLISES DE DISSOLUÇÃO EM TAMPÕES MES E HEPES **80**
6.1.2 APÓS A IMPLANTAÇÃO **85**
6.1.2.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA **85**
6.1.2.2 ANÁLISE POR MICROFLUORESCÊNCIA DE RAIOS X COM RADIAÇÃO SÍNCROTRON (μXRF-SR) **94**
6.2 O COELHO COMO MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL **104**
6.3 MICROSCOPIA DE LUZ EM CAMPO CLARO E LUZ POLARIZADA **104**
6.4 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA **110**
7. DISCUSSÃO **112**
8. CONCLUSÃO **119**
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **120**
APÊNDICE 1 ..... **139**

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

®	Marca Registrada
°C	Grau Celsius
µm	Micrômetro
μm^2	Micrômetro quadrado
µXRF-SR	Do inglês, *Synchrotron Radiation Micro-X-Ray Fluorescence*
Å	Ângstron
a.C.	Antes de Cristo
ANOVA	Análise de Variância
As	Arsênio
BEI	Do inglês, *Backscattered Electron Image*
BEI-SEM	Do inglês, *Backscattred Electron Images of Scaning Electronic Microscopy*
BMP	Do inglês, *Bone Morphogenetic Protein*
Bpm	Batimentos cardíacos por minuto
Ca/P	Razão Cálcio/Fósforo
Ca^{2+}	Íon Cálcio
CBPF	Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CO_3	Carbonato
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
Cu	Cobre
DRX	Difração de Raios X
ECG	Eletrocardiograma
EDS-SEM	Do inglês, *Energy Dispersive Spectrometry of Scaning Electronic Microscopy*

ERE	Elétrons Retroespalhados
eV	Elétron-Volt
FDA	Do inglês, *Food and Drugs Administration*
Fe	Ferro
FT-IR	Do inglês, *Fourier Transformed InfraRed*
H_2O	Água
HA	Hidroxiapatita
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
Irm	Incursões respiratórias por minuto
Kgf	Quilograma-força
LIN	Laboratório de Instrumentação Nuclear
LPC	Laboratório de Produção de Coelhos
M	Mol
MEC	Matriz Extra Celular
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mL/min	Microlitro por minuto
mm	Milímetro
NanoHA	Hidroxiapatita Nanocristalina
NHA	Nanohidroxiapatita
nm	Nanômetro
O	Oxigênio
O_2	Oxigênio
OH^-	Radical Hidroxila
OH^-	Íon Hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONF	Osso Neoformado

OPE	Osso pré-existente
OPG	Osteoprotegerina
OPG-*L*	Ligante de Osteoprotegerina
P	Íon Fósforo
pH	Potencial hidrogeniônico
PO_4	Fosfato
RANK	Do inglês, *Receptor Activator of Nuclear Factor-KappaB*
RANK-*L*	Do ingles, *Receptor Activator of Nuclear Factor-KappaB Ligand*
REG	Retículo Endoplasmático Granuloso ou Rugoso
ROG	Regeneração Óssea Guiada
RPM	Rotações por Minuto
SBOT	Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia
SEM	Do ingles, *Scaning Electronic Microscopy*
SIN	Sistema de Implantes Nacional
SR	Do ingles, *Synchrotron Radiation*
Sr	Estrôncio
TCP	Do inglês, *Tricalcium Phosphate*
TNFα	Do inglês, *Tumor Necrosis Factor-alpha*
UMB	Unidade Multicelular Básica
UN	Do inglês, *United Nations*
US$	Do inglês, *United States $*
XRD	Do inglês, *X-Ray Diffraction*
Zn	Zinco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Expectativa de vida brasileira (1950-2010) (http://esa.un.org/unpp/) 26

Figura 2. Pentênios de previsão de crescimento populacional brasileiro (2010-2040) (http://esa.un.org/unpp/) 26

Figura 3. Organização hierárquica do tecido ósseo (Adaptado de NYMAN *et al.*, 2003). 30

Figura 4. Arranjo atômico da hidroxiapatita (Adaptado de McGREGOR, 1998).....42

Figura 5. Região de domínio da nanotecnologia, comparada com uma faixa que compreende desde a macroestrutura até dimensões subatômicas (escala logarítmica).....54

Figura 6. Vista panorâmica da localização da linha µXRF no anel do LNLS.....67

Figura 7. A. Aspecto das gaiolas suspensas na cunicultura do LPC. B. Um animal por gaiola.....68

Figura 8.Centro cirúrgico veterinário com o animal em decúbito dorsal e monitorado para controle de pressão arterial, freqüência cardíaca e saturação de O_2.....70

Figura 9. A. Oxímetro de pulso para avaliação de saturação de oxigênio durante o procedimento cirúrgico; B.Monitor multiparamétrico para avaliação de ECG, saturação de O_2, freqüência cardíaca e pressão arterial; C. Máscara para inalação do anestésico geral isoflurano a 1% no trans-operatório; D. Detalhe da máscara com o animal anestesiado. 70

Figura 10. A. Membro posterior tricotomizado e asséptico; B. Incisão reta de aproximadamente 40 mm; C. Afastamento do tecido muscular, incisão do periósteo e exposição do tecido ósseo tibial; D. Perfurações de 2 mm de diâmetro com 1 cm de distância entre elas; E. Preenchimento das perfurações com as microesferas hidratadas; e F. Sutura contínua com fio mononylon 5-0. 72

Figura 11. Obtenção dos blocos ósseos. A. Aspecto clínico da tíbia direita após 28 dias de implantação das HAs; B. Aspecto clínico da tíbia esquerda após 28 dias de

implantação das NanoHAs; e C. Disco diamantado acoplado em mandril para peça de mão para o corte da tíbia e obtenção dos blocos ósseos com margem de segurança.....73

Figura 12. A. Corte do excesso de resina com a utilização de arco de serra e serra de ourives número 3; e B. Corte de 100-200 µm da amostra no micrótomo Isomet®. 75

Figura 13. A. Delimitação da área entre as corticais ósseas; B. Área selecionada do segmento correspondente ao tecido ósseo neoformado; C. Área selecionada do segmento correspondente ao tecido conjuntivo; e D. Área selecionada total para contagem de tecido ósseo e conjuntivo (objetiva de 10 X, Luz Polarizada com Compensador).....77

Figura 14. Planilha do software Excel com contagem das áreas de interesse de osso neoformado e tecido conjuntivo,dos grupos e períodos experimentais. 78

Figura 15. Difratogramas mostram picos maiores nos materiais sinterizados (B e D), denotando maior cristalinidade que os materiais não-sinterizados (A e C). 81

Figura 16. Bandas espectrais similares quanto aos seus grupamentos químicos característicos de biocerâmicas à base de hidroxiapatita. Bandas típicas de Fosfato (*), Carbonato (#) e hidroxila (x). 82

Figura 17. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das microesferas permite visualizar a superfície irregular dos biomateriais (A, B, C e D), aumento de 100 X. Notam-se fendas e grandes irregularidades (E, F, G e H), sobretudo nos materiais não-sinterizados (F e H), aumento 1000X. 83

Figura 18. Teste de Dissolução em tampão HEPES - pH 7.4, revelando maior solubilidade de Ca em relação a P em todos os grupos. As colunas mostram um aumento significativo de solubilidade das NanoHAs. 84

Figura 19. Teste de Dissolução em tampão MES - pH 5.9, mostrando grande solubilidade de Ca e P em meio mais ácido, sendo o Ca mais solúvel que P, sobretudo nas NanoHAs. HA sinterizada teve um comportamento similar ao pH maior do outro tampão, ou seja, uma dissolução significativamente menor. 84

Figura 20. Micrografia (BEI-SEM e EDS-SEM) do grupo HA Sinterizada 7 dias. A. BEI-SEM mostra presença de osso neoformado (ONF), crescimento centrípeto do osso pré-existente cortical (OPE) em direção às esferas de hidroxiapatita (HA) preservadas. Mapeamento Elemental através de EDS-SEM, indicando em: B. Presença de Ca; C. Presença de P; e D. Presença de O. 86

Figura 21. Micrografia (BEI-SEM e EDS-SEM) do grupo HA Sinterizada 28 dias. A. BEI-SEM mostra presença de osso neoformado (ONF) permeando as esferas de hidroxiapatita (HA) preservadas – nota-se o contato justaposto na interface osso-biomaterial, indicando osteocondução e biocompatibilidade. Mapeamento Elemental através de EDS-SEM, indicando em: B. Presença de Ca; C. Presença de P; e D. Presença de O. 87

Figura 22. Micrografia (BEI-SEM e EDS-SEM) do grupo HA Não-Sinterizada 7 dias. A. BEI-SEM mostra a fragmentação das esferas de hidroxiapatita (HA). Mapeamento Elemental através de EDS-SEM, indicando em: B. Presença de Ca; C. Presença de P; e D. Presença de O. 88

Figura 23. Micrografia (BEI-SEM e EDS-SEM) do grupo HA Não-Sinterizada 28 dias. A. BEI-SEM mostra presença de osso neoformado (ONF) permeando as esferas de hidroxiapatita (HA) fragmentadas, com tons mais claros, bem como a ligação entre as duas corticais do defeito de 2 mm com a formação de novo osso – nota-se o contato justaposto na interface osso-biomaterial degradado, indicando osteocondução e biocompatibilidade. Mapeamento Elemental através de EDS-SEM, indicando em: B. Presença de Ca; C. Presença de P; e D. Presença de O.....89

Figura 24. Micrografia (BEI-SEM e EDS-SEM) do grupo NanoHA Sinterizada 7 dias. A. BEI-SEM mostra presença de osso neoformado (ONF): crescimento centrípeto do osso pré-existente cortical (OPE) em direção às esferas de nanohidroxiapatita (NHA) preservadas. Mapeamento Elemental através de EDS-SEM, indicando em: B. Presença de Ca; C. Presença de P; e D. Presença de O. 90

Figura 25. Micrografia (BEI-SEM e EDS-SEM) do grupo NanoHA Sinterizada 28 dias. A. BEI-SEM mostra presença de osso neoformado (ONF) permeando as esferas de nanohidroxiapatita (NHA) preservadas, em tons mais claros – nota-se o contato justaposto na interface osso-biomaterial, indicando osteocondução e

biocompatibilidade. Mapeamento Elemental através de EDS-SEM, indicando em: B. Presença de Ca; C. Presença de P; e D. Presença de O. 91

Figura 26. Micrografia (BEI-SEM e EDS-SEM) do grupo NanoHA Não-Sinterizada 7 dias. A. BEI-SEM mostra a fragmentação das esferas de nanohidroxiapatita (NHA) e o crescimento centrípeto de osso neoformado (ONF), partindo do osso nativo (OPE) em direção ao nanomaterial biodegradado. Mapeamento Elemental através de EDS-SEM, indicando em: B. Presença de Ca; C. Presença de P; e D. Presença de O. ...92

Figura 27. Micrografia (BEI-SEM e EDS-SEM) do grupo NanoHA Não-Sinterizada 28 dias. A. BEI-SEM mostra presença de osso neoformado (ONF) permeando as esferas de nanohidroxiapatita (HA) biodegradadas, com tons mais claros – nota-se o contato justaposto na interface osso-biomaterial, indicando osteocondução e biocompatibilidade. Mapeamento Elemental através de EDS-SEM, indicando em: B. Presença de Ca; C. Presença de P; e D. Presença de O. 93

Figura 28. A. Imagem de HA Sinterizada após 7 dias de implantação durante a análise de µXRF-SR; B. Imagem do espectro de intensidade para o cálcio; e C. Imagem do espectro de intensidade para o Zinco.....95

Figura 29. A. Imagem de HA Sinterizada após 28 dias de implantação durante a análise de µXRF-SR; B. Imagem do espectro de intensidade para o cálcio; e C. Imagem do espectro de intensidade para o Zinco.....96

Figura 30. A. Imagem de HA Não-Sinterizada após 7 dias de implantação durante a análise de µXRF-SR; B. Imagem do espectro de intensidade para o cálcio; e C. Imagem do espectro de intensidade para o Zinco.....97

Figura 31. A. Imagem de HA Não-Sinterizada após 28 dias de implantação durante a análise de µXRF-SR; B. Imagem do espectro de intensidade para o cálcio; e C. Imagem do espectro de intensidade para o Zinco.....98

Figura 32. A. Imagem de NanoHA Sinterizada após 7 dias de implantação durante a análise de µXRF-SR; B. Imagem do espectro de intensidade para o cálcio; e C. Imagem do espectro de intensidade para o Zinco.....99

Figura 33. A. Imagem de NanoHA Sinterizada após 28 dias de implantação durante a análise de µXRF-SR; B. Imagem do espectro de intensidade para o cálcio; e C. Imagem do espectro de intensidade para o Zinco.....100

Figura 34. A. Imagem de NanoHA Não-Sinterizada após 7 dias de implantação durante a análise de µXRF-SR; B. Imagem do espectro de intensidade para o cálcio; e C. Imagem do espectro de intensidade para o Zinco. 101

Figura 35. A. Imagem de NanoHA Não-Sinterizada após 28 dias de implantação durante a análise de µXRF-SR; B. Imagem do espectro de intensidade para o cálcio; e C. Imagem do espectro de intensidade para o Zinco. 102

Figura 36. Espectros de µXRF-SR característicos de osso cortical da tíbia dos animais, HA sinterizada e NanoHA não-sinterizada. Os maiores picos do espectro de µXRF-SR para Ca estão indicados, bem como os menores picos de P, Fe, Cu, Zn, As e Sr. 103

Figura 37. Fotomicrografias do grupo controle (G1 7 dias) sem material implantado. Imagens de microscopia de luz polarizada (A) e luz polarizada com compensador (B), que mostram a orientação dos cristais (*), indicando início de formação óssea centrípeta a partir das corticais (OPE). (Objetiva 10X).....105

Figura 38. Fotomicrografias do grupo controle (G1 28 dias) sem material implantado. Imagens de microscopia em campo claro (A) e luz polarizada com compensador (B) mostram completa mineralização ocluindo o defeito com osso neoformado reticular (ONF) similar ao osso pré-existente (OPE). 106

Figura 39. Fotomicrografias do grupo HA Sinterizada – G2 7 dias. Imagens de microscopia em luz polarizada (A) e luz polarizada com compensador (B) mostram início de organização dos cristais (*) entre as esferas de hidroxiapatita (HA) preservadas, partindo do osso pre-existente.....106

Figura 40. Fotomicrografias do grupo HA Sinterizada – G2 28 dias. A. Imagem de microscopia em luz polarizada evidenciando a birrefringência do osso neoformado, similar ao osso nativo (OPE). B. Imagem de microscopia em luz polarizada com compensador mostra a formação de tecido ósseo (#) permeando as microesferas (HA) pouco degradadas na superfície, circundadas por tecido conjuntivo (TC).....106

Figura 41. Fotomicrografias do grupo HA Não-Sinterizada – G3 7 dias. A. Imagem de microscopia em campo claro mostra o biomaterial (HA) parcialmente fragmentado em grande parte do defeito, a partir da cortical do osso pré-existente (OPE). B. Imagem de microscopia em luz polarizada com compensador revela pequena degradação das esferas (HA).....107

Figura 42. Fotomicrografias do grupo HA Não-Sinterizada – G3 28 dias. Imagens de microscopia em luz polarizada (A) e luz polarizada com compensador (B) mostram formação óssea ocluindo o defeito. Maior parte das microesferas foi degradada (HA) dando lugar ao osso neoformado (ONF), este com birrefringência semelhante ao osso pré-existente (OPE), indicando osteocondução.....107

Figura 43. Fotomicrografias do grupo NanoHA Sinterizada – G4 7 dias. Imagens de microscopia em luz polarizada (A) e luz polarizada com compensador (B) mostrando início de organização dos cristais (#) de forma centrípeta a partir do osso pré-existente (OPE), evidenciando a birrefringência (*) semelhante. Esferas de nanoHA (NHA) preservadas, mas as fibras se dirigem a elas, sugerindo osteocondução....108

Figura 44. Fotomicrografias do grupo NanoHA Sinterizada – G4 28 dias. A. Imagem de microscopia em luz polarizada mostra a birrefringência (*) do osso neoformado, indicando sua mineralizaçao entre as esferas (NHA) ainda preservadas neste período, similar ao osso pré-existente (OPE). B. Imagem de microscopia em luz polarizada com compensador evidencia a formação de novo osso (ONF) permeando as esferas remanescentes (NHA) em íntimo contato, sugerindo osteocondução. ..108

Figura 45. Fotomicrografias do grupos NanoHA Não-Sinterizada – G5 7 dias. A. Imagem de microscopia em campo claro mostra as esferas (NHA) multifragmentadas na região do defeito, próximo ao osso pré-existente (OPE). B. Imagem de microscopia em luz polarizada com compensador evidencia início de formação óssea (#) a partir da cortical (OPE), em direção ao biomaterial (NHA) fragmentado. 109

Figura 46. Fotomicrografias do grupo NanoHA Não-Sinterizada – G5 28 dias. A. Imagem de microscopia em luz polarizada mostra a birrefringência (*) do osso neoformado similar ao osso pré-existente (OPE), indicando sua mineralizaçao entre as esferas remanescentes fragmentadas (NHA). B. Imagem de microscopia em luz

polarizada com compensador evidencia a formação de novo osso (ONF) ocluindo o defeito entre as corticais (OPE). Há presença de pouco remanescente do biomaterial (NHA), biodegradado em grande parte do defeito e substituído por osso neoformado (ONF). 109

Figura 47. Densidade por área de tecido ósseo neoformado nos dois períodos experimentais. * corresponde ao valor de p<0,05; ** é o valor de p<0,01; e *** para p<0,001 – diferenças estatisticamente significativas (ANOVA e pós-teste de Tukey, para p<0,05). As barras indicam o desvio padrão. 111

Figura 48. Densidade por área de tecido conjuntivo nos dois períodos experimentais. * corresponde ao valor de p<0,05; e ** é o valor de p<0,01 – diferenças estatisticamente significativas (ANOVA e pós-teste de Tukey, para p<0,05). As barras indicam o desvio padrão. 111

LISTA DE TABELA

TABELA 1. Materiais sintetizados e respectivos tratamentos térmicos.....63

TABELA 2. Grupos experimentais e disposição nas tíbias de coelhos 68

TABELA 3. Seqüência de processamento da amostra não desmineralizada 74

RESUMO

Os defeitos críticos ósseos oriundos de trauma, tumores ou doenças degenerativas determinam um desafio no campo da Ortopedia, visto que a reconstrução cirúrgica se faz necessária através de enxertos ósseos. Apesar de os enxertos autógenos serem considerados um “padrão ouro”, as cerâmicas sintéticas a base de Hidroxiapatita (HA) são materiais muito promissores, devido às suas inerentes características biocompatíveis. A possibilidade de diminuição do tamanho das partículas em escala nanométrica e o advento da hidroxiapatita nanoestruturada podem melhorar a remodelação óssea. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta tecidual e a biocompatibilidade de esferas de HA produzidas a partir de partículas nanométricas em comparação às esferas de HA produzidas a partir de partículas micrométricas, ambas no estado sinterizado e não-sinterizado, bem como seu potencial de degradação e osteogênese, em relação ao grupo controle (coágulo). Os biomateriais foram implantados em defeitos ósseos nas tíbias de 12 coelhos da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), pesando entre 2000g e 3500g. As esferas (400-600 µm) tiveram as propriedades físicas e químicas caracterizadas por DRX, FT-IR, MEV e foram também submetidas ao teste de dissolução. Os animais foram divididos randomicamente em cinco grupos: Grupo 1 (Controle) – coágulo sanguíneo; Grupo 2 – HA Sinterizada; Grupo 3 – HA Não-Sinterizada; Grupo 4 – NanoHA Sinterizada; e Grupo 5 – NanoHA Não-Sinterizada. Os animais foram mortos 7 e 28 dias após a cirurgia e as amostras submetidas ao processamento histológico. As esferas não-sinterizadas eram menos cristalinas que as sinterizadas (DRX e FT-IR), sendo mais solúveis in vitro (teste de dissolução). In vivo, a nanoHA e a HA, ambas não-sinterizadas, dissolveram e promoveram maior formação de tecido ósseo em relação às esferas sinterizadas. Concluiu-se que os materiais se mostraram biocompatíveis e osteocondutores, porém a neoformação óssea foi mais acentuada nos grupos da HA e nanoHA não-sinterizadas.

Palavras-chave: Biomateriais, Enxerto Ósseo, Hidroxiapatita Nanocristalina, Osso, Coelhos.

ABSTRACT

Bone critical defects from trauma, tumors or degenerative diseases prescribe a challenge in orthopedics, since surgical reconstruction is required by bone grafts. Although autografts are considered a gold standard, the synthetic ceramics based on hydroxyapatite (HA) are promising materials due to their inherent characteristics biocompatible. The possibility of decreasing the size of the particles at the nanometer scale and the advent of nanostructured hydroxyapatite may improve bone remodeling. The aim of this study was to evaluate the tissue response and biocompatibility of HA spheres shape made from nano-sized particles compared to the HA spheres made from micro-sized particles, both in sintered and non-state-sintered as well as its potential for degradation and osteogenesis compared to control group (clot). The spheres (400-600 µm) had the physical and chemical properties characterized by XRD, FT-IR, SEM and were also subjected to dissolution test and the biomaterials were implanted in bone defects on 12 New Zealand rabbit's tibiae (*Oryctolagus cuniculus*), weighing between 2000g and 3500g. The animals were randomly divided into five groups: Group 1 (Control) - blood clot, Group 2 - sintered HA, Group 3 - non-sintered HA, Group 4 - sintered NanoHA and Group 5 - non-sintered NanoHA. Animals were euthanized at 7 and 28 days after surgery and samples submitted to histological procedings. The non-sintered had a lower cristallinity that the sintered materials (XRD and FT-IR), being more soluble *in vitro* (dissolution tests). *In vivo*, NanoHA and HA, both non-sintered, degraded and promoted greater bone formation in relation to the sintered spheres. In conclusion, materials showed biocompatibility and osteoconduction, but the bone formation was more accentuated in the non-sintered groups.

Keywords: Biomaterials, Bone Grafts, Nanocrystalline Hydroxyapatite, Bone, Rabbits

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e a aplicação de biomateriais têm evoluído nos últimos 50 anos, num esforço estimado de mais de US$100 bilhões através de uma interface multidimensional entre a química, engenharia química, ciência dos materiais e de superfície, mecânica, bioengenharia, biologia e medicina, definidos de acordo com princípios éticos e normatizados por entidades governamentais, organizações e empreendedores (RATNER & BRYANT, 2004). O processo evolutivo de pesquisas desta ciência foca, sobretudo, a biocompatibilidade, tornando os materiais “passivos” em materiais que interagem ativamente e se integram ao ambiente biológico (ANDERSON, 2006).

Estudos da Organização Mundial da Saúde (OMS), da Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia (SBOT) e do Departamento de Ortopedia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro comprovam que, em poucos anos, metade da população da Terra terá mais de 50 anos (SBOT, 2010) e, de acordo com o relatório anual das perpectivas da população mundial da Organização das Nações Unidas, a expectativa de vida no Brasil aumentou cerca de 45% dos registros da década de 50, atingindo a média atual de 73,1 anos, para ambos os sexos (Fig. 1) (UN, 2009A).

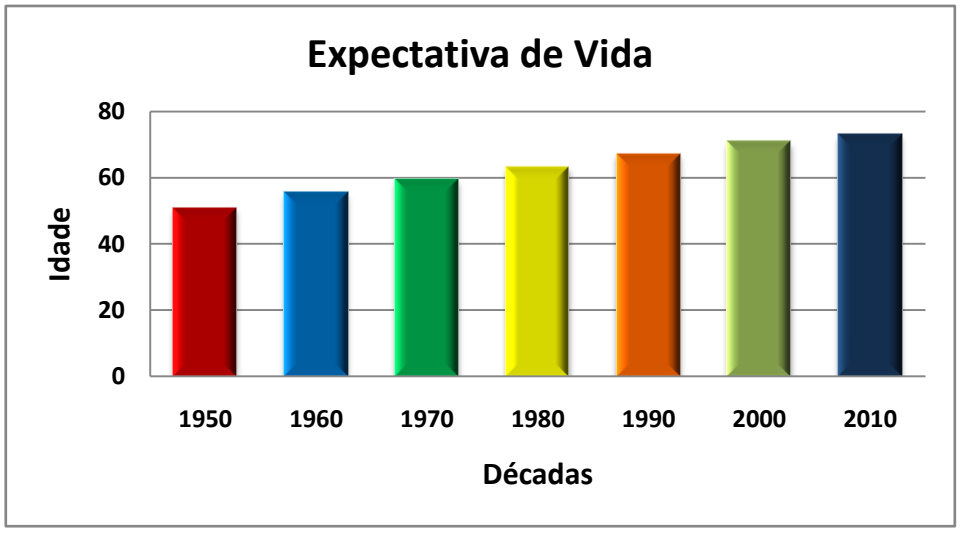


Figura 1. Expectativa de vida brasileira (1950-2010) (http://esa.un.org/unpp/)

Este mesmo relatório anual da Organização das Nações Unidas mostra o crescimento de quase 15% da população brasileira atual, até 2040 (Fig. 2) (UN, 2009B), fato que favorece o surgimento de lesões traumáticas pelo crescimento de grandes núcleos urbanos. Quanto aos traumas em crianças na faixa etária entre 0-14 anos, por exemplo, a OMS relata que no Brasil cerca de 65% acometem as regiões anatômicas de cabeça, pescoço e membros superiores derivados de quedas, atropelamentos e colisões (SBOT, 2010), o que viabiliza maiores investimentos e pesquisas em bioengenharia e materiais biomédicos.

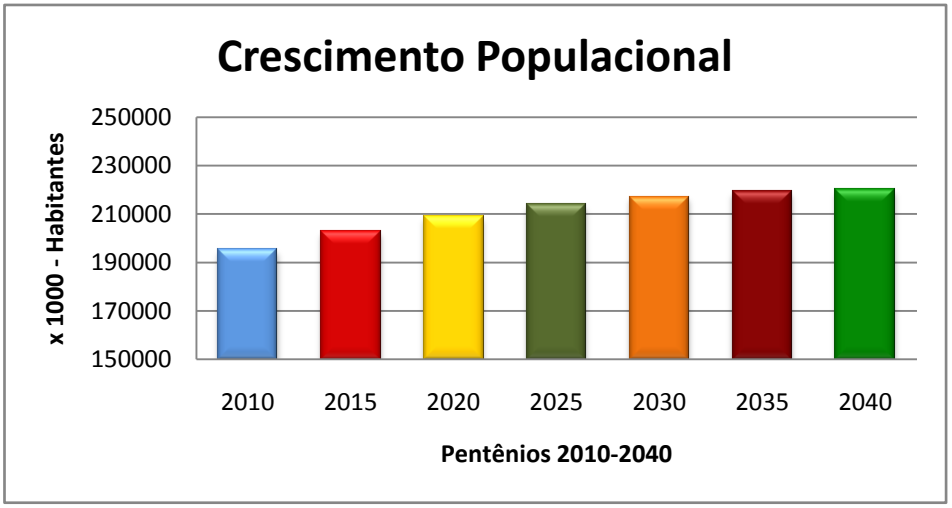


Figura 2. Pentênios de previsão de crescimento populacional brasileiro (2010-2040) (http://esa.un.org/unpp/)

Os defeitos ósseos gerados por traumas, tumores ou doenças degenerativas representam os maiores desafios para a reconstrução cirúrgica, e uma das diferentes aplicações dos biomateriais está associada à sua utilização no campo da Ortopedia. Problemas inflamatórios e degenerativos de ossos e articulações afetam milhões de pessoas em todo o mundo, sendo aproximadamente a metade de todas as doenças crônicas de pessoas acima de 50 anos de idade em países desenvolvidos (NAVARRO *et al.*, 2008).

A primeira geração de biomateriais desenvolvidos exibia um comportamento inerte quando implantados no organismo, pois os cirurgiões buscavam dispositivos que pudessem fornecer: • propriedades mecânicas adequadas ao uso; • resistência à corrosão; e • ausência de efeitos danosos como carcinogenicidade, toxicidade, alergia e inflamação. A partir da segunda metade do século XX, cientistas se associaram aos físicos, iniciando o desenvolvimento de novos materiais mais adequados à implantação tecidual, como por exemplo, as cerâmicas sintéticas à base de fosfato de cálcio denominadas hidroxiapatitas (HA) – $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (NARAYAN, 2010). Com a estrutura química similar à fase mineral do osso humano, a HA é capaz de se unir ao osso sem a interface do tecido conjuntivo fibroso, favorecendo a formação de tecido ósseo, caracterizando estas cerâmicas como biocompativeis e osteocondutoras (SCHEPERS *et al.*, 1991; DUCHEYNE, 1994).

A hidroxiapatita sintética pode ser considerada um material bioativo, capaz de interagir com o ambiente hospedeiro e melhorar a resposta biológica, além de permitir um comportamento bioabsorvível de degradação progressiva enquanto novo tecido se regenera, (NAVARRO *et al.*, 2008). De acordo com o processo de síntese, as cerâmicas à base de fosfato de cálcio, como a HA e seus derivados, mostram diferentes propriedades físicas e quimicas (EL-GHANNAM, 2005).

A nanotecnologia, popularizada na década de 80, é uma ciência multidisciplinar e pode ser considerada a próxima etapa lógica da ciência, integrando engenharia com biologia, química e física (DUTTA & HOFMANN, 2003). Novos métodos capazes de melhorar as características físicas e químicas surgiram no final da década passada, configurando a hidroxiapatita como um biomaterial de terceira geração, por capacitá-la a estimular respostas celulares específicas ao nível

molecular (HENCH & POLAK, 2002). O desenvolvimento da hidroxiapatita nanoestruturada promove mudanças nas propriedades físico-químicas, alterando a dimensão dos cristais de HA e a solubilidade do material, o que permite maior interação entre a superfície e os tecidos adjacentes (NARAYAN *et al.*, 2004). A redução do tamanho das partículas aumenta a bioatividade, favorecendo a biodegradação destes materiais e permitindo a proliferação e migração celular, vascularização tecidual e a difusão de nutrientes, características essenciais para a regeneração óssea (NAVARRO *et al.*, 2008).

Entretanto, a avaliação da biocompatibilidade das hidroxiapatitas nanocristalinas, seu comportamento *in vivo* de biodegradação e consequente formação de tecido ósseo ainda não está bem esclarecido. Neste contexto, fornecer novos parâmetros para o desenvolvimento de biomateriais, como opções ao enxerto ósseo autógeno, é fundamental e pode trazer novas perspectivas do que poderá ocorrer em humanos na prática clínica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TECIDO ÓSSEO

O osso é um tecido conjuntivo denso mineralizado, altamente especializado, complexo e dinâmico, provendo suporte mecânico, permitindo a hematopoese e estabelecendo a homeostase mineral do organismo (HILL & ORTH, 1998; GREEN *et al.*, 2002; COHEN Jr., 2006; WOO *et al.*, 2007), pelo envolvimento de enzimas, citocinas, fatores de crescimento e prostaglandinas (SHAFER *et al.*, 1987; HOBO *et al.*, 1997; HILL *&* ORTH, 1998; COHEN Jr., 2006). Por ser rígido, tem a reputação de ser um tecido inerte e estático. Entretanto, tem a capacidade de adaptar sua forma e volume à demanda funcional, podendo se reparar completamente sem deixar qualquer sinal de lesão, além de mobilizar rapidamente reservas minerais conforme a demanda metabólica (SOMMERFELDT & RUBIN, 2001).

A matriz óssea é composta de substâncias inorgânicas e orgânicas, fundamentalmente sais minerais inorgânicos, como a hidroxiapatita (fosfato de cálcio que configura força e rigidez à estrutura), além de componentes orgânicos celulares e protéicos, como as células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e proteínas da matriz, como o colágeno tipo I, e não-colagenosas como a osteopontina, osteonectina, fibronectina, sialoproteína óssea e osteocalcina, sendo esta exclusiva do osso (HILL *&* ORTH, 1998; COHEN Jr., 2006). Sua organização pode ser descrita em cinco níveis hierárquicos: • Osso cortical e esponjoso em nível macroestrutural; • Sistema haversiano (osteonas) e tecido intersticial ou trabecular numa escala sub-milimétrica; • Lamelas (lacunas e canalículos) num nível

micrométrico; • Matriz mineral e fibrilas de colágeno numa escala sub-micrométrica; e • Cristais minerais, moléculas de colágeno e de água em nível nanométrico (Figura 3) (NYMAN *et al.*, 2005).

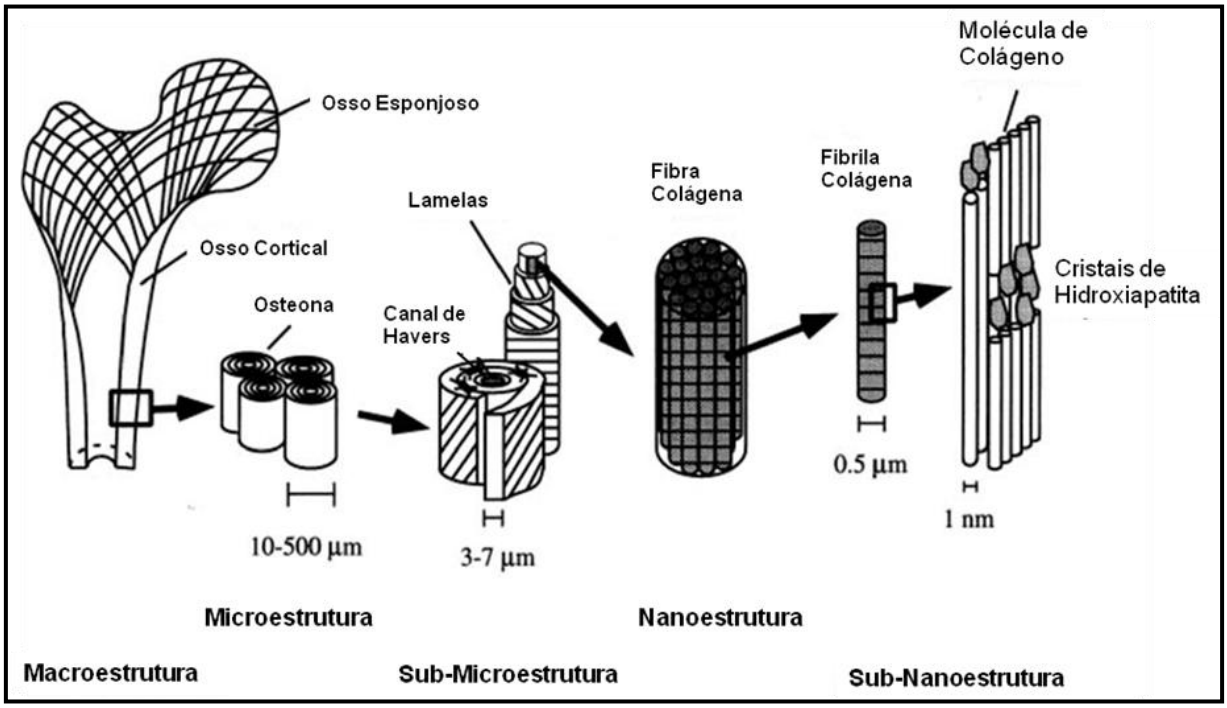


Figura 3. Organização hierárquica do tecido ósseo (Adaptado de NYMAN *et al.*, 2003).

O colágeno é a principal proteína de todos os tecidos conjuntivos – pele, osso, tendão e cartilagem – havendo pelo menos 28 tipos geneticamente distintos (RAMSHAW *et al.*, 2009). Cada filamento protéico se estrutura triplamente em α-hélice (associadas por pontes dissulfeto) devido à hidroxilação dos aminoácidos. Esses filamentos entrelaçados são liberados em vesículas do retículo endoplasmático rugoso (REG) para fora das células, onde sofrem clivagem das terminações amina e carboxila. Após a quebra, formam-se segmentos de protocolágeno orientados e de tamanho uniforme, ou seja, moléculas unitárias de colágeno que se unem através de ligações cruzadas, o que configura estabilidade e resistência (FERREIRA *et al.*, 2000; NYMAN *et al.*, 2003). Dentre todos, os mais abundantes são o intersticial e os colágenos que formam fibras, particularmente o colágeno tipo I (RAMSHAW *et al.*, 2009), este responsável por 90% do peso do componente orgânico do osso (ROBBINS & COTRAN, 2005). Embora a dureza do

osso dependa dos sais minerais inorgânicos cristalizados, a flexibilidade depende de suas fibras colágenas, que, junto com outras moléculas orgânicas, conferem resistência à tração da estrutura óssea (TORTORA & GRABOWSKI, 2002).

Sua organização celular permite que este tecido participe de um contínuo processo de remodelação, ou seja, frequentes reabsorções seguidas de neoformações ósseas, conforme a necessidade, durante toda a vida. São três os tipos celulares principais encontrados no osso responsáveis por esse processo: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, que respondem pela síntese, manutenção e reabsorção da matriz óssea, respectivamente (SOMMERFELDT & RUBIN, 2001; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). Os osteoblastos sintetizam a MEC – constituída de colágeno tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas, regulam sua mineralização, pois são células capazes de concentrar fosfato de cálcio e expressar genes específicos e ainda induzem e regulam os osteoclastos (COHEN Jr, 2006). Derivadas das células-tronco mesenquimais, morfologicamente são cubóides quando ativas e dispõem-se lado a lado em uma fina camada celular, conferindo características ultra-estruturais de células que secretam colágeno e proteínas não-colagênicas, que é uma matriz óssea não-calcificada, denominada osteóide (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). Apesar da camada simples, as células osteoblásticas estão firmemente ancoradas umas às outras através de proteínas transmembranosas e receptores específicos, mantendo assim sua função e resposta aos estímulos metabólicos e mecânicos (LECANDA *et al.*, 1998; FERRARI *et al.*, 2000), por controlar a passagem dos íons Ca e P. Bioquimicamente, quanto aos íons minerais, os osteoblastos fornecem toda a energia necessária ao processo, consumindo aerobicamente suas reservas energéticas; promovem ainda a concentração de Ca e Fosfato sanguíneos para obter sua precipitação na forma de fosfato tricálcico amorfo e, posteriormente, em hidroxiapatita cristalina (FERREIRA *et al.*, 2000).

A vida média de um osteoblasto varia entre 3 dias em coelhos novos a mais de 8 semanas nos humanos; nesta curta vida de intensa secreção, esta célula é capaz de depositar entre 0,5 a 1,5 µm de matriz osteóide por dia. Nesta atividade impetuosa, a matriz pode se depositar ao redor do corpo das células e de seus prolongamentos, formando lacunas e canalículos e modificando seu fenótipo com atividade citoplasmática diminuída, o que caracteriza a diferenciação em osteócitos

(OWEN, 1972; JOWSEY, 1977). Derivados então dos osteoblastos, os osteócitos são muito mais numerosos do qualquer outra célula de síntese óssea, numa proporção de 10:1, sendo ainda morfológica e funcionalmente diferentes por reduzirem suas organelas celulares e a produção da matriz. Estas células passam a ter baixa atividade secretora por conter menos ribossomos e retículo endoplasmático e, apesar de se tornarem morfologicamente achatadas e quiescentes, apresentam um grande número de filópodes (prolongamentos de extensões citoplasmáticas) que interconectam osteócitos entre si e os mesmos às células de revestimento ósseo, através de junções comunicantes que permitem a transferência de substratos (ROBBINS & COTRAN, 2005). As flutuações dos níveis séricos de cálcio e fósforo permitem alterar a concentração destes minerais no compartimento líquido extracelular local. Dessa forma, os osteócitos podem detectar forças mecânicas e traduzi-las para a atividade biológica adequada. Tais características mostram que os osteócitos são essenciais para a manutenção da matriz óssea, bem como a sua vitalidade; a apoptose desta célula estimula a atividade osteoclástica com reabsorção da matriz (SOMMERFELDT & RUBIN, 2001; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Derivados das células hematopoiéticas, os osteoclastos são células multinucleadas formadas pela fusão de progenitores mononucleares da família dos monócitos/macrófagos, móveis e altamente polarizadas, pois transportam um arsenal de enzimas lisossomais (TEITELBAUM, 2000). Morfologicamente, os osteoclastos são extensamente ramificados, com citoplasma granuloso e com vacúolos. Por estarem intimamente relacionadas com a superfície óssea, através da membrana apical e forte ligação com proteínas de adesão da matriz, estas células gigantes multinucleadas são capazes de se superpor à superfície de reabsorção por inúmeras extensões vilosas, conhecidas como borda em escova, aumentando assim a área de contato. Nesse microambiante, tais filamentos vilosos de actina secretam produtos de digestão, acidificando este espaço com um sistema de bombas de hidrogênio, além da liberação de enzimas proteolíticas e colagenases, que favorecem a reabsorção do osso mineralizado em depressões chamadas lacunas de Howship. (SOMMERFELDT & RUBIN, 2001; ROBBINS & COTRAN, 2005; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). A diferenciação dos osteoclastos depende da ação de citocinas como TNFα, ligantes e receptores de membrana, bem como

outras citocinas e fatores de crescimento (ASAGIRI & TAKAYANAGI, 2007). A reabsorção óssea também está sob controle hormonal, onde fatores calciotrópicos e prereabsortivos, além de interleucinas, corticosteróides, citocinas e algumas proteínas hormonais coordenam o processo, mas também sinalizam outros fatores antireabsortivos, quando a reabsorção óssea deve ser reduzida ou interrompida, através de proteínas hormonais de crescimento, proteínas não-colagenosas – calcitonina e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) – e mobilização de cálcio pelos osteoblastos, configurando um equilíbrio entre reabsorção e formação óssea (ROBBINS & COTRAN, 2005; BRUZZANITI & BARON, 2006; COHEN Jr, 2006). Um desequilíbrio nessa regulação pode gerar desordens metabólicas, onde a proliferação dos osteoclastos favoreceria o surgimento da osteoporose (SHOBACK, 2007), e osteoblastos em intensa atividade secretora pelo comprometimento da reabsorção óssea pelos osteoclastos permitiria o surgimento da osteopetrose (DEL FATTORE *et al.*, 2008).

A essa relação de equilíbrio entre osteoblastos e osteoclastos, denominamos o processo de remodelação óssea. Estas células são consideradas unidades funcionais do osso chamadas de unidades multicelulares básicas – UMBs – geográfica e cronologicamente separadas umas das outras, onde os processos de formação e reabsorção óssea ocorrem conjugados no local, mediados por fatores autócrinos ou parácrinos (HILL & ORTH, 1998). Este processo ocorre durante toda a vida, chegando a aproximadamente 1 milhão de UMBs ativas simultaneamente em adultos, substituindo 10% de todo sistema esquelético a cada ano (ROBBINS & COTRAN, 2005). Ocorre a interação das células formadoras e reabsortivas de osso através da Osteoprotegerina (OPG), um polipeptídeo de 317 aminoácidos e de seu ligante cognato (OPG-L), uma proteína de membrana tipo II (receptor transmembrana) expressada em osteoblastos. Ambas as moléculas podem se ligar ao RANK, um receptor transmembrana expressado em preosteoclastos. A interação entre OPG-L e RANK inicia a sinalização e a cascata de expressão gênica, resultando na promoção da osteoclastogênese. Neste ambiente, a OPG – molécula secretada pelos osteoblastos – atua como um coadjuvante solúvel de ligação competitiva ao RANK-L, inibindo a formação de osteoclasto e, consequentemente, a reabsorção óssea (HOFBAUER *et al.*, 2000; SOMMERFELDT & RUBIN, 2001).

O tecido ósseo pode ser afetado por doenças hereditárias, congênitas ou adquiridas em qualquer faixa etária, infecciosas ou não, que culminam em reações ósseas dinâmicas (SHAFER *et al.*, 1987; HOBO *et al.*, 1997; HILL *&* ORTH, 1998; SOLHEIM, 1998; LORENZO, 2000; GREEN *et al.*, 2002; TORTORA & GRABOWSKI, 2002; ROBBINS & COTRAN, 2005; COHEN Jr., 2006). Idade avançada e distúrbios relacionados aos hormônios favorecem o desequilíbrio mineral do sistema esquelético, bem como o retardo na solução de processos inflamatórios e a diminuição a flexibilidade articular, o que suscetibiliza estes indivíduos às lesões ósseas (DEQUEKER, 1975; RIZZOLI *et al.*, 2008; SEEMAN, 2008).

Uma cascata de eventos ocorre quando o tecido ósseo é lesado (ALBREKTSSON, 1980; LORENZO, 2000; BLAIR & ZAIDI, 2006; BRUZZANITI & BARON, 2006; ASAGIRI & TAKAYANAGI, 2007; SEEMAN, 2008; STADELMANN *et al.*, 2008), mobilizando hormônios e citocinas a sinalizarem às células ósseas e angiogênicas o início do reparo (HAROON *et al.*, 1999; MIDY *et al.*, 2001; BALOOCH *e al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2005; KILIAN *et al.*, 2005; SHIRLEY *et al.*, 2005; ALFORD & HANKENSON, 2006; COHEN Jr., 2006; KANAAN & KANAAN, 2006; MATSUMOTO *et al.*, 2006; PEZZATINI *et al.*, 2006; SHOBACK, 2007). Em muitos casos, o defeito criado não é capaz de se consolidar espontaneamente, tornando crítico o seu reparo. Fraturas cominutivas extensas, perda de substância óssea, doenças degenerativas entre outras, são alguns exemplos em que os transplantes ósseos ou o uso de materiais substitutos se fazem necessários.

2.2 MECANISMOS DE MINERALIZAÇÃO BIOLÓGICA

O processo de mineralização da matriz osteóide é um conjunto de reações bioquímicas complexas controladas por células específicas, apesar de ocorrer nos espaços intercelulares. Os minerais são bombeados para dentro da célula, especialmente íons Ca^{2+}, fosfolipídeos e fosfatases, e acumulados no interior de vesículas onde o ambiente supersaturado favorece a precipitação dos cristais. Tais vesículas são liberadas para o meio extracelular e “descarregam” o conteúdo mineral sobre a matriz osteóide rica em colágeno, onde a água ocupa os espaços da

estrutura orgânica. Esse conteúdo mineral, numa reação química com a água pré-existente nos espaços intermoleculares, culmina na formação dos cristais insolúveis de **Hidroxiapatita** – **$Ca_{10}(PO_4)_6.(OH)_2$** – que “deslocam” a água à medida que agregam mais conteúdo mineral das vesículas continuamente liberadas dos osteoblastos (FERREIRA *et al.*, 2000; NYMAN *et al.*, 2005). Como a concentração mineral dos íons cálcio e fosfato não é suficiente para a precipitação espontânea dos cristais, o papel das vesículas criadas pelas células é fundamental, pois o primeiro cristal formado será o centro de nucleação, esta homogênea; os cristalitos de hidroxiapatita em forma de agulhas crescem e formam aglomerados de cristais que se fundem. A matriz de colágeno funciona também como centro de nucleação heterogênea para a deposição de cristais de HA, onde fibrilas de colágeno, fibronectina e glicoproteínas como a osteonectina e a osteopontina, determinam a orientação e organização destes cristais minerais ósseos (SOMMERFELDT & RUBIN, 2001; JOOS *et al.*, 2006). A cristalização propriamente dita necessita que íons, ou seus grupos, estejam bem próximos e ordenados, com energia de colisão suficiente para formar “núcleos críticos”, que são as menores combinações estáveis de íons com estrutura cristalina (FERREIRA *et al.*, 2000). O fato de a matriz de colágeno ser organizada favorece a aglomeração, fusão e uniformidade dos cristais minerais ósseos de hidroxiapatita (BOSKEY, 2003).

2.3 MECANISMOS BIOLÓGICOS DO REPARO ÓSSEO

Os mecanismos biológicos de reparo ósseo associados aos biomateriais ou enxertos ósseos podem ser classificados em diferentes níveis, como osteogênese, osteoindução, osteocondução e osteopromoção.

A osteogênese se caracteriza pela atividade de osteoblastos e pré-osteoblastos viáveis transplantados com o enxerto para o defeito ósseo a partir de uma área doadora do próprio indivíduo. Entretanto, mesmo que algumas células do enxerto sobrevivam à transferência, as principais fontes de células para esta fase são as células osteogênicas e osteoprogenitoras do hospedeiro. Logo, a osteogênese independe de células mesenquimais indiferenciadas para que haja uma nova formação óssea (LINDHE *et al.*, 2005). A eficiência deste processo

depende da fonte de enxerto utilizada – o osso medular, especialmente aquele acompanhado de medula óssea tende a apresentar maior revascularização que o cortical, porém, este último tende a apresentar maior suporte estrutural. Como desvantagens desta técnica, deve-se considerar a morbidade do paciente e variável disponibilidade em quantidade e qualidade do osso na área doadora (LUNDGREN *et al.*, 2008).

URIST em 1965, realizando experimentos em animais, observou acidentalmente um fenômeno de indução óssea, a osteoindução. Verificou-se que proteínas não-colagenosas orientaram a modulação e diferenciação de células mesenquimais em células da linhagem óssea, promovendo a osteogênese (URIST & STRATES, 1971; ALBREKTSSON & JOHANSSON, 2001). Neste processo células são estimuladas a produzir osso e é evidente a conversão fenotípica de células indiferenciadas do mesênquima em osteoblastos na área do defeito. É um mecanismo biológico básico que acontece com frequência regular, como no reparo de fratura (ALBREKTSSON & JOHANSSON, 2001). São exemplos deste processo a matriz óssea desmineralizada (YAEDÚ *et al*., 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2008) e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) (GRANJEIRO *et al*., 2005; CAPORALI *et al.*, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2007).

A osteocondução se refere ao crescimento ósseo sobre a superfície do biomaterial (ALBREKTSSON & JOHANSSON, 2001; CALASANS-MAIA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2009; FERNANDES *et al.*, 2009). Outros autores definem osteocondução como o processo em que o enxerto serve como arcabouço, de forma passiva, para migração de vasos sangüíneos e deposição de novo osso na superfície ou dentro de poros, canais ou túneis (ALBREKTSSON & JOHANSSON, 2001; FLECKENSTEIN *et al.*, 2006).

A osteopromoção utiliza barreiras mecânicas ou membranas de proteção que evitam a proliferação do tecido conjuntivo em meio ao defeito ósseo, permitindo que o mesmo seja povoado por células osteoprogenitoras (TAGA *et al.*, 2008). Esta exclusão tecidual é realizada com o uso de membranas (barreiras físicas), que podem ser bioabsorvíveis ou não. As membranas, rígidas ou com reforço de titânio, são capazes de promover a formação de quantidade significativa de novo osso e

manter espaço suficiente, sem a adição de material de preenchimento. Isso ocorre devido à sua capacidade de impedir a invasão de outros tecidos competitivos (DAHLIN *et al.*, 1988). A técnica de regeneração óssea guiada (ROG) é indicada no tratamento de defeitos ósseos, para aumentar a altura e largura da crista óssea, onde a barreira física é adaptada para proteger o coágulo sanguíneo, criando um espaço isolado e permitindo a regeneração óssea (JOVANOVIC & NEVINS, 1995; SCHWARZ *et al.*, 2006).

2.4 CLASSIFICAÇÃO DOS ENXERTOS ÓSSEOS

Os enxertos ósseos são classificados de acordo com a sua origem como autógenos, alógenos, xenógenos e sintéticos ou aloplásticos.

2.4.1 Enxertos Autógenos

É considerado protocolo cirúrgico de primeira opção ou “padrão ideal” o uso de enxertos ósseos autógenos na reconstrução de defeitos críticos, ou seja, defeitos tais que fisiologicamente não são capazes de se regenerarem, necessitando de algum material que conduza ou estimule esse processo (JENSEN *et al.*, 2002; Den BOER *et al.*, 2003; BILKAY *et al.*, 2004; DACULSI, 2004; MARINS *et al.*, 2004; RAMMELT *et al.*, 2004; TADIC et al, 2004; HUBER *et al*., 2006A; HUBER *et al*., 2006B; McMILLAN *et al.*, 2007; SCHNEIDERS *et al*., 2007; WOO *et al.*, 2007). O sucesso atribuído aos enxertos autógenos se deve ao fato de este material preservar as características celulares e protéicas, pois são obtidos do próprio indivíduo, catalisando o processo de reparo ósseo pela presença de proteínas ósseas não-colagenosas e fatores de crescimento ativos (RAMMELT *et al.*, 2004; NISHIKAWA *et al.*, 2005; SCHREIBER *et al.*, 2005; SHIRLEY *et al.*, 2005; SCHLIEPHAKE *et al.*, 2008). Podem ser adquiridos de fontes intra ou extra bucais, sendo necessários dois acessos cirúrgicos, e englobam os quatro tipos de mecanismo de formação óssea (MATHIAS *et al.*, 2003), pois há o envolvimento de células ósseas vivas e fatores de crescimento juntamente com a matriz óssea para o local receptor. Para perdas ósseas de pequeno porte, como em alvéolo dentário, as

áreas doadoras intrabucais são o mento, a tuberosidade maxilar e a região retromolar, corpo e processo coronóide da mandíbula. Nos casos de grandes reconstruções, pode-se recorrer a fonte extra bucal como a crista ilíaca, calota craniana, tíbia e costela (MISCH & DIETSH, 1993).

Entretanto, um procedimento cirúrgico adicional, bem como significativa morbidade e possibilidade de complicações no ato da coleta, além de quantidade limitada de osso esponjoso do leito doador podem ser consideradas desvantagens ou limitações de escolha dos enxertos autógenos (GREEN *et al.*, 2002; JENSEN *et al.*, 2002; Den BOER *et al.*, 2003; BILKAY *et al.*, 2004; DACULSI, 2004; MARINS *et al.*, 2004; RAMMELT *et al.*, 2004; MIRANDA *et al.*, 2005; HUBER *et al*., 2006A; HUBER *et al*., 2006B; HUBER *et al*., 2006C; PEZZATINI *et al.*, 2006; McMILLAN *et al.*, 2007; WOO *et al.*, 2007).

2.4.2 Enxertos Alógenos

O enxerto alógeno é obtido de doadores humanos vivos ou de cadáveres, mas é processado e armazenado antes de ser utilizado. É vantajoso devido ao fato de evitar um segundo acesso cirúrgico, causando menor morbidade operatória (GOLDBERG & STEVENSON, 1987). Geralmente oriundos de Bancos de Ossos, estes enxertos podem ser utilizados nas terapias de cirurgia ortopédica reconstrutiva, onde conservam a estrutura óssea original e podem ser utilizados mineralizados ou não, conforme as necessidades biomecânicas. Entretanto, sua utilização envolve o risco de transmissão de doenças, respostas imunológicas adversas, remodelação óssea incompleta, falta de controle sanitário adequado dos bancos de ossos, os problemas éticos de comercialização de tecidos humanos e os exaustivos cuidados adicionais quanto à esterilização, que podem alterar as propriedades estruturais, mecânicas e reabsortivas destes biomateriais (GREEN *et al.*, 2002; JENSEN *et al*, 2002; DUNSMUIR & GALLACHER, 2003; DACULSI, 2004; MARINS *et al.*, 2004; AKKUS & BELANEY, 2005; CHARALAMBIDES *et al.*, 2005; FREI *et al.*, 2005; FUJISHIRO *et al.*, 2005; HOFMANN *et al.*, 2005; HUBER *et al.*, 2006; PEZZATINI *et al.*, 2006; WOO *et al.*, 2007).

2.4.3 Enxertos Xenógenos

Os enxertos ósseos xenógenos são caracterizados por serem retirados de uma espécie diferente daquela do receptor. Esses enxertos são fabricados da porção inorgânica do tecido ósseo de origem animal e são classificados como osteocondutores (MISCH & DIETSH, 1993). Estes enxertos também podem ser utilizados nas terapias de cirurgia ortopédica reconstrutiva, permitindo ajustar o tamanho dos grânulos e mantendo a estrutura óssea original. Entretanto, sua utilização envolve riscos de transmissão de doenças, influência de caráter imunológico, aspectos religiosos relacionados a alguns animais, bem como exaustivos processos de esterilização que podem alterar ou comprometer a viabilidade estrutural deste tecido (GREEN *et al.*, 2002; JENSEN *et al*, 2002; DANSMUIR & GALLACHER, 2003; DACULSI, 2004; AKKUS & BELANEY, 2005; FREI *et al.*, 2005; FUJISHIRO *et al.*, 2005; HOFMANN *et al.*, 2005; PEZZATINI *et al.*, 2006; WOO *et al.*, 2007).

2.4.3 Enxertos Aloplásticos

As limitações e dificuldades existentes para a obtenção de enxertos ósseos autógenos, como desconforto pós-operatório do paciente, morbidade do sítio doador, limitação da quantidade de enxerto, além das questões éticas, religiosas e a possibilidade de transmissão de doenças dos enxertos alógenos e xenógenos mantém estimulados os pesquisadores a desenvolverem biomateriais sintéticos, aloplásticos, para auxiliar na regeneração do tecido ósseo perdido (YAMAMOTO *et al.*, 1994).

Segundo HUBER *et al.* (2006C), os substitutos ósseos artificiais devem atender alguns padrões: 1. Deve ser um procedimento direto; 2. Deve ser tolerado pelos tecidos circundantes; 3. Deve ter integração rápida ao osso; e 4. Deve permitir rápido crescimento ósseo pela sua degradação.

Os materiais sintéticos utilizados na regeneração óssea incluem as cerâmicas de fosfato de cálcio sintéticas – sobretudo a hidroxiapatita e fosfato tricálcico – e, mesmo em busca das propriedades adequadas, esta classe tem revolucionado os

campos da pesquisa e tratamento, pois além de evitar uma segunda etapa cirúrgica como no caso dos enxertos autógenos, apresenta-se em diferentes formas (pó, partículas, pastilhas, esferas ou blocos), tamanhos, texturas, graus de porosidade (macro ou microporoso), graus de cristalinidade (cristalino ou amorfo), fases cristalinas e solubilidade (absorvíveis ou não absorvíveis) (GRANJEIRO *et al.*, 2005). Além disso, o mecanismo de reparação associado é a osteocondução como nos xenoenxertos (CALASANS-MAIA *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2009), apesar de outros trabalhos mostrarem uma capacidade osteoindutora da hidroxiapatita (RIPAMONTI, 1996; EID *et al.*, 2001; GOSAIN *et al.*, 2002; KURASHINA *et al.*, 2002; HABIBOVIC *et al.*, 2006).

2.4.3.1 Fosfatos de cálcio

Os fosfatos de cálcio têm sido estudados como materiais utilizados no reparo ósseo nos últimos 80 anos. O primeiro estudo *in vivo* ocorreu em 1920 (ALBEE, 1920). Nos anos seguintes, outros fosfatos de cálcio foram testados para investigar a sua eficácia na reparação de fraturas (HALDEMAN & MOORE, 1934). O primeiro uso da hidroxiapatita implantada ocorreu em ratos e porcos da Índia em 1951, onde os estudos foram caracterizados como o início das experimentações clínicas e a primeira geração de materiais substitutos ósseos (RAY *et al.*, 1952). Contudo, só na década de 1970 outros fosfatos de cálcio foram sintetizados, caracterizados, analisados e testados, potencializando seu uso como substitutos ósseos (LeGEROS, 1988).

2.4.3.1.1 Hidroxiapatita

Dentre as cerâmicas à base de fosfato de cálcio, a HA tem sido amplamente utilizada como um importante recurso para a substituição óssea e se distingue das demais cerâmicas à base de fosfato de cálcio por ser similar à porção inorgânica do tecido ósseo, biocompatível, resistente mecanicamente, bioativa, não tóxica, radiopaca permitindo o acompanhamento periódico através de exames de imagem, provoca pouca reação tecidual e não é antigênica e nem carcinogênica (HENCH, 1991; LeGEROS, 2002; HING, 2004; PATEL, 2005). A degradação das HAs é um

fator que reflete na substituição por tecido ósseo, uma vez que a disposição química pode torná-la mais ou menos degradável, tendo em vista a necessidade de se obter um material resistente ou não às cargas maiores, sob o aspecto funcional da reabilitação ortopédica. De acordo com DRY e BEEBE (1960), a química de superfície das HAs influencia as características de adsorção no ambiente de reparo ósseo.

Ainda que seja um material com características de compatibilidade e aceitação biológica ímpares, a baixa velocidade de degradação em condições fisiológicas permite que as HAs estequiométricas com proporção Ca/P em torno de 1,67 mantenha o seu volume no local implantado ao longo do tempo (WALSH *et al.*, 2003; TADIC *et al.*, 2004; LILLEY *et al.*, 2005; THIAN *et al.*, 2006; KASAJ *et al.*, 2008). A velocidade de degradação esta relacionada com a área de superfície, composição química, características físicas, cristalinidade e carga de estresse mecânico (GOSAIN *et al.*, 2002; DOROZHKIN, 2008).

A versatilidade da hidroxiapatita (HA) é ainda mais promissora, tendo sido utilizada para o preenchimento de falhas ósseas de qualquer origem e reconstrução de defeitos ósseos provocados por ressecções cirúrgicas, com a possibilidade de inclusão de componentes moleculares orgânicos e inorgânicos da matriz óssea, como algumas proteínas e fatores de crescimento ósseo (URIST & STRATES, 1971; SCHNEIDERS *et al.*, 2007). Pode ainda ser utilizada como revestimento de componentes metálicos para fixação, no revestimento da superfície de metais, aumentando a interação entre esta superfície e o tecido ósseo (PARK *et al.*, 2003; VALLET-REGÍ & GONZÁLEZ-CALBET, 2004; MITRI *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2006; REIKERÅS & GUNDERSON, 2006; SATO *et al.*, 2006; ZHU *et al.*, 2006). Além disso, o Ca^{2+} da estrutura química (Figura 4) pode ser substituído por cátions bivalentes ou trivalentes, que tendem a acelerar ou melhorar o reparo do defeito pela maior interação molecular aos osteoblastos (SATO *et al.*, 2006), pois alteram a cristalinidade, os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a textura superficial, a estabilidade e a solubilidade da hidroxiapatita (WEBSTER *et al.*, 2002; WEBSTER, 2004; CALASANS-MAIA *et al.*, 2008; SHEPERD & BEST, 2008).

A hidroxiapatita, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, apresenta uma razão Ca/P de 1,67, podendo esta razão variar até 1,5 nos casos de substituições (FULMER *et al.*, 2002). A HA se cristaliza no sistema hexagonal sendo que sua célula unitária contém 10 íons cálcio (ELLIOTT, 1994).

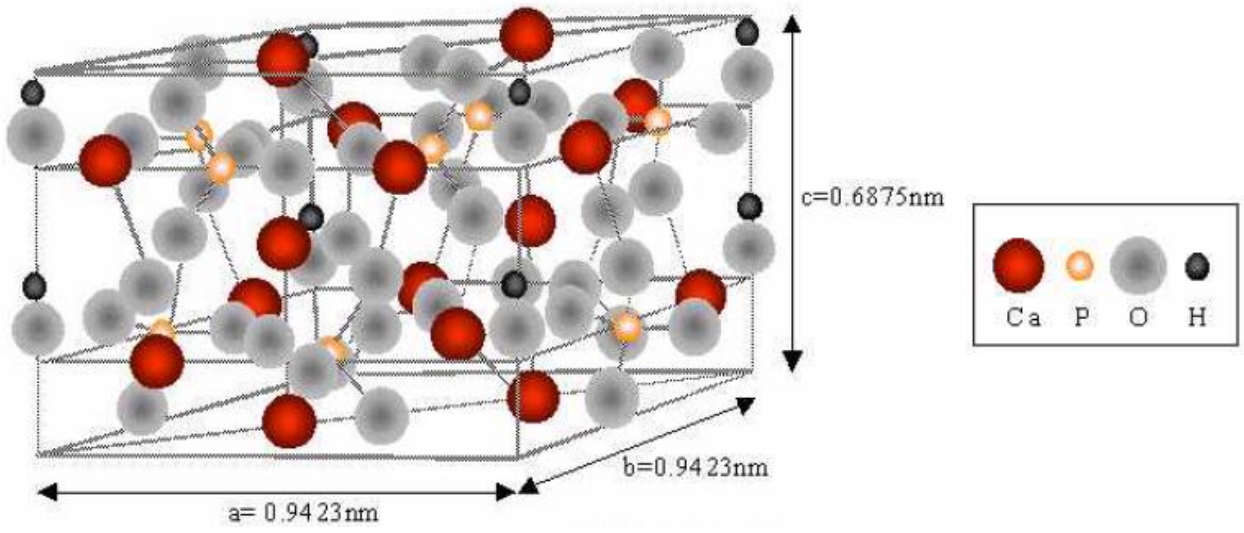


Figura 4. Arranjo atômico da hidroxiapatita (Adaptado de McGREGOR, 1998).

A HA sintética pode ser obtida através de diferentes rotas de síntese (precipitação via úmida, síntese no estado sólido, sol-gel, microondas, centrifugação, precipitação ultrassônica e síntese mecanoquímica) e, dependendo da rota utilizada, a razão Ca/P, a cristalinidade, a dimensão dos cristais, a área superficial, e, consequentemente, o grau de compactação, resistência mecânica e porosidade podem variar (SURYANARAYANA & KOCH, 2000; TORRENT-BURGUES & RODRIGUEZ-CLEMENTE, 2001; YEONG *et al.*, 2001; KURIAKOSE *et al.*, 2004; CAO *et al.*, 2005; MEEJOO *et al.*, 2006; FATHI & HANIFI, 2007; MOBASHERPOUR *et al.*, 2007).

As HA sintéticas são produzidas por processos que envolvem uma série de reações químicas utilizando, principalmente, carbonato de cálcio e ácido fosfórico. Ao final dessas reações de síntese, obtêm-se as cerâmicas na forma de um pó, isto é, constituídas por um aglomerado de partículas em simples justaposição, mantidas juntas por ligações muito fracas. Nessas condições, as cerâmicas apresentam quase nenhuma propriedade mecânica e essa forma é utilizada para a preparação de

amostras, chamadas de verdes, que posteriormente são submetidas ao processo de sinterização (ROSA *et al.*, 2000).

A sinterização é o resultado do tratamento térmico (calcinação) que é dado às amostras de cerâmica verde. Nesse processo ocorre a progressiva transição daquele estado de aglomeração, partículas em simples justaposição, para uma unidade na qual as partículas fundem-se umas com as outras. Durante esse processo, ocorrem várias modificações nas cerâmicas, tais como: diminuição da área de superfície, diminuição do volume da amostra, aumento da fase cristalina e aumento das propriedades mecânicas. A diminuição do volume da amostra se dá como conseqüência da densificação da cerâmica durante a sinterização, a qual, por sua vez, determina o nível de porosidade (ROSA *et al.*, 2000).

A presença de poros interconectados favorece a inserção, adesão, proliferação e diferenciação celular no interior de sua estrutura, assim como a proliferação vascular, mantendo a nutrição local (KAWACHI, 2000; LOGEART-AVRAMOGLOU *et al.*, 2005). Quando estes poros são confeccionados com dimensões adequadas, favorecem o crescimento do tecido ósseo, levando a uma união do osso neoformado com a HA (KAWACHI, 2000; GOSAIN *et al.*, 2002; LOGEART-AVRAMOGLOU *et al.*, 2005). O tamanho mínimo dos poros necessário para o crescimento de células ósseas é entre 100 a 200 µm. (ZANER & YUKNA, 1984), 200 a 300 µm (GOSAIN *et al*., 2004) e de 150 a 500 µm (FLECKENSTEIN *et al.*, 2006).

Mais recentemente, descobriu-se que há possibilidade de diminuição do tamanho da partícula de HA através da temperatura baixa de mistura, onde o aumento de área de superfície acarreta maior solubilidade e, consequentemente, maior degradação (BARRALET *et al.*, 2004; LILLEY *et al.*, 2005; GERBER *et al.*, 2006).

2.5 AVALIAÇÃO DA COMPATIBILIDADE

Biocompatibilidade e biofuncionalidade são duas importantes características necessárias para que os biomateriais possam exercer suas funções. De acordo com *Clemson Advisory Board for Biomaterials*, um biomaterial é sistematicamente e farmacologicamente uma substância inerte desenhada para incorporação ou implantação dentro de um tecido vivo, definição que foi adotada pela 6° *Annual International Biomaterials* – 1974 (PARK, 1984). Alguns anos depois, na Conferência do Instituto de Desenvolvimento de Consenso em Saúde, em 1982, ficou estabelecido que um biomaterial seria qualquer substância (outra que não droga) ou combinação de substâncias, sintética ou natural de origem, que poder ser usada por um período de tempo, completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo. WILLIAMS em 1987 definiu biomaterial como qualquer material não vivo usado em dispositivos médicos com a intenção de interagir com sistemas biológicos. De acordo com a *Food and Drugs Administration* (FDA) um biomaterial para ser considerado biocompatível não deve ser tóxico, carcinogênico, antigênico nem mutagênico, não deve interferir com a cicatrização dos tecidos lesados durante o ato cirúrgico e os tecidos do hospedeiro devem tolerar bem as propriedades biomecânicas dos materiais (HELMUS & TWEDEN, 1995). Além disso, deve ser fabricável, esterilizável e estável durante a implantação e quando necessário, para aplicação. Não deve ser corrosível, degradável (CEHRELI *et al.*, 2003). São implantados no corpo com o objetivo de reposição de um tecido doente, lesado ou perdido ou de reposição de todo um órgão.

A biocompatibilidade descreve as interações entre os sistemas vivos e o biomaterial implantado dentro deste sistema. Para avaliar a biocompatibilidade dos biomateriais utilizados nos seres humanos, os mesmos devem ser testados utilizando diferentes procedimentos. A biocompatibilidade de um material é considerada ótima se o material após a implantação permite a formação de tecidos normais na sua superfície e, adicionalmente, se ele estabelece uma interface contínua capaz de suportar as cargas que normalmente ocorrem no local da sua implantação (KOHN & DUCHEYNE, 1992).

2.5.1 CLASSIFICAÇÃO DOS BIOMATERIAIS QUANTO À RESPOSTA BIOLÓGICA

De acordo com a resposta biológica dos tecidos aos biomateriais, podemos classificar os biomateriais em bioinerte, bioativo, bioreativo, biestável, biocompatível, biotolerante e biofuncional.

2.5.1.1 Bioinerte

São materiais menos suscetíveis a causar uma resposta biológica adversa devido a sua estabilidade química em comparação com outros materiais, são tolerados pelo organismo e praticamente não liberam nenhum tipo de componente. No entanto, esses materiais tendem a ser envolvidos por uma cápsula fibrosa que o isolam do meio vivo. A espessura da camada fibrosa depende de muitos fatores como as condições do implante, tecido e carga mecânica existente na interface. As cerâmicas (Zircônia e Alumina) são muito estáveis e, portanto, muito pouco prováveis de terem uma resposta biológica adversa (HENCH & WILSON, 1993: CASTNER & RATNER, 2002).

Um material é bioinerte quando a interface material e tecido é estável, isto é, quando os componentes dos tecidos nem reagem com o biomaterial nem dissolvem quimicamente entre si. Quando a interface não está em equilíbrio, ou seja, quando a interface é instável, a relação entre material e hospedeiro é caracterizada por irritação, inflamação, lesão, imunogenicidade, pirogenicidade, toxicidade e mutagenicidade ou carcinogenicidade, evidenciando um estado de bioincompatibilidade, enquanto o estado de biocompatibilidade existe na ausência dessas características.

2.5.1.2 Bioreativo

Os materiais classificados como bioreativos ficam no limite entre os bioinertes e bioativos. No caso dos metais, adquirem a bioatividade após um tratamento de

ativação da superfície, como por exemplo, o titânio, o nióbio e o tântalo. Deve-se ressaltar que os materiais metálicos considerados bioreativos são os utilizados na ortopedia e na implantodontia, porém, excluindo esse grupo, a maioria dos materiais metálicos não é bioreativa, ficando mais próxima à classe dos materiais bioinertes (RATNER *et al.*, 1996; DUCHEYNE & QIU, 1999).

2.5.1.3 Bioativo

O termo bioatividade é definido como sendo a propriedade de formar tecido sobre a superfície de um biomaterial e estabelecer uma interface capaz de suportar cargas funcionais (KOHN & DUCHEYNE, 1992). São os materiais que favorecem a ligação química entre o material implantado e o tecido ósseo (osteointegração), sem a presença de invólucros fibrosos. Em função da similaridade química entre tais materiais e a parte mineral óssea, os tecidos ósseos se ligam a eles, permitindo a osteocondução através do recobrimento por células ósseas. Quando o material bioativo é implantado no corpo, uma série de reações bioquímicas ocorre na interface implante/tecido. (HENCH & WILSON, 1993; BOSS, 2000). Os materiais bioativos podem ainda ser classificados em:

Materiais Osteoindutores – são materiais que promovem uma resposta intracelular e extracelular na interface. Por meio desse processo uma superfície bioativa é colonizada pelas células-tronco livres no ambiente defeituoso como resultado de intervenções cirúrgicas. Como exemplo estão os biovidros que podem se ligar aos tecidos moles e também aos tecidos mineralizados (RIPAMONTI, 1996).

Materiais osteocondutores – promovem uma superfície biocompatível que favorece o desenvolvimento das células ósseas. Isso ocorre quando um material promove somente uma resposta extracelular na interface. Como exemplo podemos citar a hidroxiapatita sintética (CAO & HENCH, 1996).

Hidroxiapatitas bioativas é um assunto em questão visto que estimula a proliferação e diferenciação de fibroblastos e osteoblatos e induz a síntese de colágeno por essas células. O colágeno tipo III e tipo V são sintetizados no período

imediato após a implantação. A substituição pelo colágeno tipo I é considerada como um atributo à resposta de biocompatibilidade do material (BOSS, 2000).

2.5.1.4 Absorvíveis

São materiais que, após certo período de tempo em contato com os tecidos, acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Tais materiais são extremamente interessantes em aplicações clínicas em função de ser desnecessária nova intervenção cirúrgica para a sua retirada. Os principais exemplos desses materiais são o fosfato tricálcio (TCP) e o ácido poliático (PRADO *et al.*, 2001).

2.5.1.5 Biotolerante

São materiais apenas toleráveis pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes por meio da formação de camada envoltória de tecido fibroso. Esta camada é induzida por meio da liberação de compostos químicos, íons, produtos de corrosão e outros por parte do material implantado. Quanto maior a espessura da camada de tecido fibroso formada, menor a tolerabilidade dos tecidos ao material. Os materiais biotoleráveis são praticamente todos os polímeros sintéticos assim como a grande maioria dos metais. Biomateriais que não podem ser eliminados do corpo e são encapsulados por tecido fibroso (PIZZO, 2007). Biomateriais que não podem ser eliminados do corpo e são encapsulados por tecido fibroso são chamados de biotolerantes.

2.5.1.6 Biofuncional

Caracterizam-se por desempenhar funções desejadas dadas as suas propriedades mecânicas, químicas, ópticas e elétricas. Devem atender ao requisito de funcionalidade para o qual foram projetados, não estimulando ou provocando o mínimo de reações alérgicas ou inflamatórias. Embora este conceito seja algo não muito preciso, é consenso que a funcionalidade está associada à aplicação a que se

destina, de tal modo que um material biocompatível para uma dada função pode ser inadequado se usado em outras aplicações (SILVA, 1999).

2.5.1.7 Bioartificiais

Podem ser definidos como sendo uma combinação de materiais sintéticos e células vivas (HENCH & WILSON, 1993).

Se o material for tóxico (bioincompatível), o tecido adjacente morre. Se o material não for tóxico e biologicamente inativo (quase inerte), um tecido fibroso de variável espessura se forma. Se o material não for tóxico e biologicamente ativo (bioativo), uma adesão se forma, porém se o material não for tóxico e se dissolver (absorvível), será substituído pelos tecidos adjacentes (RATNER *et al.*, 1996).

Os padrões de resposta dos tecidos dependem das propriedades químicas e físicas dos implantes assim como do potencial de reação do hospedeiro. Os fatores críticos abrangem a toxicidade, composição química, afinidade ou não pela água, tamanho, forma, peso por área, textura da superfície, superfície livre de energia, carga superficial, adsorção superficial de proteínas, solubilidade, porosidade, tamanho do poro, grau de degradação, produtos de degradação, local de implantação e reações específicas das espécies (RATNER *e al.*, 1996).

Segundo KOKUBO *et al.* (2000), um dos pré-requisitos para um material ligar-se ao osso é a formação de uma camada de apatita biologicamente ativa na interface material/osso, normalmente conhecida como *apatita semelhante ao osso*. Tal camada de apatita é similar à fase mineralizada do tecido ósseo, em composição. Acredita-se que ela atua como sinalizadora de proteínas e células para iniciar a cascata de eventos que resultam na formação da estrutura óssea. Ou seja, os osteoblastos, células ósseas responsáveis pela produção do tecido ósseo, proliferam preferencialmente e se diferenciam produzindo apatita e colágeno sobre a camada de apatita formada anteriormente, o que favorece a união do implante com o osso.

2.5.2 Testes de Biocompatibilidade *In Vivo*

As diversas situações que necessitam do uso de animais em pesquisas promoveram, ao longo da história, reflexões éticas, bioéticas, filosóficas e religiosas direcionadas para pesquisa em animais vertebrados (PETROIANU, 1996; SILVA, 1997). Porém, somente na segunda guerra mundial, ocorreu uma conscientização mundial para a necessidade de preservação da vida humana (FAGUNDES & TAHA, 2004). Com isso, o Código de Nurenberg (1947) determinou que a experimentação no homem devesse ter como substrato a pesquisa em animais, posição esta reforçada pela Declaração de Helsinque de 1975 (SCHANAIDER & SILVA, 2004).

A avaliação da biocompatibilidade dos biomateriais constitui um pré-requisito para a segura e eficaz indicação clínica do material e, nesse sentido, os modelos experimentais utilizando animais ainda são fundamentais, pois não há modelos *in vitro* capazes de mimetizar completamente a complexidade do organismo.

Os modelos são analisados de acordo com a sua pertinência, ou seja, se ele é capaz de representar os aspectos de um determinado processo empírico e de apresentar a precisão suficiente para satisfazer a proposta (FERREIRA & FERREIRA, 2003). Esses modelos animais são classificados de acordo com o porte em: pequeno (ratos, camundongos e porquinho da índia) (SANADA *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2009; FERNANDES *et al.*, 2009), médio (coelhos, mini porcos, gatos e cães) (MIRANDA, 2005; CASTANEDA *et al.*, 2006; CARDOSO *et al.*, 2007; CALASANS-MAIA *et al.*, 2008) e grande (ovelhas, cabras e porcos) (MENDES *et al.*, 2001; DAÍ *et al.*, 2005; GOSAIN *et al.*, 2006; HABIBOVIC *et al.*, 2008).

2.6 A UTILIZAÇÃO DO COELHO COMO MODELO ANIMAL EM CIRURGIA EXPERIMENTAL

A utilização de animais em experimentos tem sido muito indicada para o aperfeiçoamento e comprovação de procedimentos já existentes (SANADA *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2004; MIRANDA, 2005) desenvolvimento de novos materiais (MENDES *et al.*, 2001; CALASANS-MAIA *et al.*, 2008) e a compreensão

dos diversos processos fisiológicos e patológicos (DAI *et al.*, 2005; CASTANEDA *et al.*, 2006; CARDOSO *et al.*, 2007). Assim, estudos pré-clínicos são a principal ferramenta que os pesquisadores dispõem para testar a eficácia, mimetizando o estudo em humanos (NOVAES Jr. & QUEIROZ, 2010).

A escolha do modelo experimental é determinada por diversos fatores como custo, viabilidade técnica do procedimento, fundamentação científica, disponibilidade, aceitação da sociedade e facilidade de acomodação, base de dados disponível, além da similaridade com as características humanas (PETROIANU, 1996; CALASANS-MAIA *et al.*, 2009). O conhecimento das características ósseas dos animais, como microestrutura e composição óssea e processos de formação e reabsorção óssea são importantes para permitir a correlação dos achados com situações clínicas em humanos (NOVAES Jr. & QUEIROZ, 2010).

Os coelhos apresentam a vantagem de facilidade de manuseio devido ao tamanho reduzido, além de atingirem a maturidade esquelética precocemente. O tamanho, contudo, limita a quantidade de materiais implantados, bem como o seu diâmetro, que não deve exceder 2 mm. Os coelhos ainda mostram características estruturais bem distintas dos humanos, com estrutura óssea primária e canais de ósteons dispostos paralelamente ao longo eixo do osso e renovação óssea mais acelerada. Contudo, são muito utilizados para avaliar biomateriais, previamente aos modelos animais maiores (PEARCE *et al.*, 2007). Os coelhos brancos da Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*) são freqüentemente utilizados como modelo animal indicado para experimentos em diversas áreas, incluindo a ortopedia (MENDES *et al.*, 2001; DAÍ *et al.*, 2005; CASTANEDA *et al.*, 2006) e a cirurgia crânio-maxilofacial (CARDOSO *et al.*, 2007; CALASANS-MAIA *et al.*, 2009).

Como em todos os modelos experimentais, o uso dos coelhos como modelo experimental também apresenta vantagens e desvantagens (CALASANS-MAIA *et al.*, 2008; CARDOSO *et al.*, 2007; SCHANAIDER & SILVA, 2004), descritas a seguir:

Vantagens:

(1) a sua fácil manutenção e observação;

(2) permite que se trabalhe com uma quantidade grande de indivíduos;

(3) apresenta, em geral, ciclos vitais curtos (gestação, lactação, puberdade);

(4) permite a padronização do ambiente;

(5) permite a padronização genética;

(6) permite transplantes ou transmissão de tumores e em geral existe uma grande quantidade de informações básicas disponíveis.

Desvantagens:

(1) vivem em ambiente totalmente artificial;

(2) possuem uma dieta padronizada;

(3) as doenças, quando de seu estudo, são artificialmente induzidas, na grande maioria dos experimentos.

O conhecimento anátomo-clínico do pesquisador sobre o animal auxilia na escolha do modelo mais adequado. As freqüências cardíacas e respiratórias são muito variáveis entre as espécies. No coelho o número de batimentos cardíacos por minuto (bpm) oscila em torno de 200 bpm e a frequência respiratória é de 50 incursões respiratórias por minuto (irm) (SCHANAIDER & SILVA, 2004). Dados biológicos, como o tempo de vida, fases do desenvolvimento e características reprodutivas são parâmetros fundamentais a serem controlados.

Quando as pesquisas são realizadas com os animais adequados resultam em informações próximas das que podem ser esperadas no homem (PETROIANU, 1996). Algumas similaridades já foram relatadas em relação à composição, remodelação e densidade óssea entre modelos animais e seres humanos, por exemplo, a densidade mineral óssea e a resistência às fraturas dos coelhos e humanos são muito similares (WANG *et al.*, 1998; PEARCE *et al.*, 2007).

A anestesia de coelhos é vista pelos veterinários como um procedimento de alto risco, o que demanda um conhecimento do mecanismo de ação e vias de acesso dos anestésicos (SCHANAIDER & SILVA, 2004). Deve-se atentar para o custo, a viabilidade e a possibilidade de interferência das substâncias administradas com os parâmetros que serão analisados no experimento (HARCOURT-BROWN,

2002). As vias de administração da anestesia mais utilizadas são: intramuscular, intravenosa, intraperitoneal e inalatória, ou a combinação delas. Preparar o animal com anestesia intramuscular é mais cômodo e rápido do que realizar anestesia geral (venosa e/ou inalatória), mas pode não ser adequado ao procedimento cirúrgico. O monitoramento adequado (capnógrafo, cardioscópio, oxímetro, coluna de pressão arterial média, etc.) mostra-se essencial para o controle hemodinâmico per-operatório, o que assegura a obtenção de dados mais confiáveis (SCHANAIDER & SILVA, 2004).

A utilização dos animais nas pesquisas experimentais deve estar baseada em três aspectos: científico, ético e legal (PETROIANU, 1996). A experimentação animal, assim como os estudos clínicos em humanos, tem permitido a compreensão dos diversos processos fisiológicos e patológicos que os acometem (FERREIRA *et al.*, 2005).

2.7 O USO DA ESCALA NANOMÉTRICA NA BIOENGENHARIA

Desde a antiguidade, o homem já se preocupava em entender o comportamento da matéria que constitui os corpos por meio de especulações filosóficas. Aristóteles (384-322 a.C.) acreditava que a matéria poderia ser dividida indefinidamente sem qualquer limite, entretanto, Leucipo (490/470-420 a.C.), foi o primeiro homem a propor que a matéria era constituída por pequenas unidades indivisíveis que seu discípulo Demócrito (460-370 a.C.) chamou de *átomo* (DURANT, 2000; SOUZA, 2000). Da filosofia à comprovação científica quando, em 1803, Dalton apontou para o fato de que os componentes químicos poderiam ser explicados pelo agrupamento de átomos que formam unidades maiores denominadas *moléculas*. E um século adiante, o peso do trabalho de Albert Einstein explicou movimentos oriundos da colisão entre átomos (HAWKING, 2001).

Com o passar dos séculos, viu-se que a concepção em relação à constituição da matéria foi mudando, à medida que novos métodos e equipamentos de investigação científica foram sendo aperfeiçoados e incorporados à ciência. Estudar os elementos constitucionais da matéria para então poder compreender e controlar o

seu comportamento macroscópico, ou seja, manipular os átomos e/ou moléculas individuais em escala nanométrica, é uma idéia relativamente recente, que só ganhou consistência a partir da palestra proferida na *American Physical* Society, em 1959, por Richard Feynman, físico ganhador de dois prêmios Nobel (DREXLER, 1990).

Em sua palestra, intitulada *There's a plenty of room at the bottom,* FEYNMAN (1959) mostrou que não há razões físicas que impeçam a fabricação de dispositivos por meio da manipulação dos átomos individuais. Propôs ainda que essa manipulação não só era perfeitamente possível, como também inevitavelmente resultaria na fabricação de dispositivos úteis para todos os campos do conhecimento (DURÁN *et al.*, 2006).

Nesta escala, 1 nanômetro corresponde à bilionésima parte da metro (1 nm = 1/1.000.000.000 m = 10^{-9} m), ou aproximadamente a distância ocupada por cerca de 5 a 10 átomos, empilhados de maneira a formar uma linha (Figura 5). *Nanotecnologia* pode então ser definida como a habilidade de manipulação átomo por átomo na escala compreendida entre 0,1 e 100 nm, para criar estruturas maiores fundamentalmente com nova organização estrutural. É um ramo da ciência que engloba a pesquisa com estruturas que tenham pelo menos uma dimensão menor que 100 nm, que sejam manipuladas por meio de processos que possibilitem o controle sobre seus atributos químicos e fisicos e possam ser combinadas para formar estruturas maiores (SURYANARAYANA & KOCH, 2000; CNPq, 2002; LIU & WEBSTER, 2007). A figura 3 mostra uma escala que abrange a faixa de domínio da nanotecnologia.

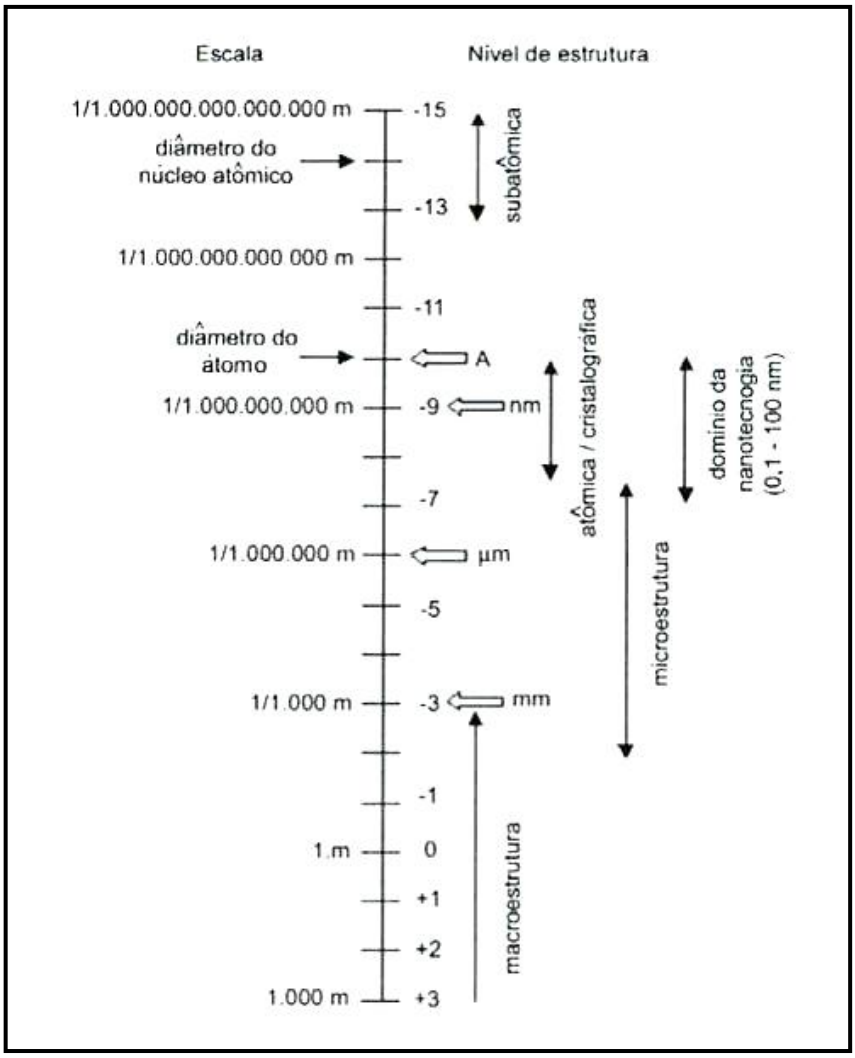


Figura 5. Região de domínio da nanotecnologia, comparada com uma faixa que compreende desde a macroestrutura até dimensões subatômicas (escala logarítmica).

Toda matéria é um material em potencial. A linha divisória para que algo possa ser tratado como um material corresponde ao momento em que alguma de suas propriedades (óticas, magnéticas, mecânicas, catalíticas, elétricas etc.) lhe confira uma função específica. A integração entre a perspectiva macroscópica que caracteriza os materiais, com o enfoque atômico/molecular característico da Química é imprescindível para o conhecimento e controle das conexões existentes entre estrutura, propriedades e funções de diferentes materiais (ZARBIN, 2007).

O grande impacto para a ciência é que quando as dimensões de uma porção de material sólido se tornam muito pequenas, suas propriedades físico-químicas

podem se tornar diferentes daquelas do mesmo material em escalas maiores (BARRALET *et al.*, 2004). Quimicamente falando, estes materiais apresentam ao menos uma dimensão na faixa de tamanho nanométrica, ou abaixo do *tamanho crítico* capaz de alterar alguma de suas propriedades (ZARBIN, 2007).

A notável capacidade de reconhecimento das biomoléculas quando combinadas com as propriedades únicas dos nanomateriais, pode levar a um novo patamar de substitutos teciduais. Nanorecobrimentos e materiais nanoestruturados criados por várias técnicas podem interagir com proteínas e, subsequentemente, com células fundamentais para regenerar muitos tecidos, como osso, cartilagem e sistemas neurais (LIU & WEBSTER, 2007).

Nanocerâmicas a base de hidroxiapatita mostraram proliferação osteoblástica, com suas funções melhoradas sobre grânulos ou fibras de tamanho menor do que 100 nm (WEBSTER *et al.*, 2000). Com o advento da hidroxiapatita nanocristalina, a possibilidade de maior interação molecular entre o material nanoestruturado e a estrutura do osso mineral aumenta, através de intensa atividade celular, estimulando a osteogênese. A remodelação óssea pode ser mais efetiva pela mimetização da porosidade e da estrutura cristalina do osso.

A ciência dos biomateriais para enxerto ósseo busca estimular as funções osteoblásticas, permitindo assim acelerar a formação de novo osso. Estudos têm demonstrado que o aspecto da partícula na fase nano (< 100 nm) melhora a adesão e a proliferação do osteoblasto, a atividade de fosfatase alcalina e a deposição de cálcio, o que pode favorecer o reparo ósseo de forma mais efetiva (SATO *et al.*, 2006).

2.8 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DOS FOSFATOS DE CÁLCIO

As técnicas de caracterização são realizadas para definir as características estruturais, superficiais, dissolução e composição química dos materiais, e com isso reunir as suas informações mais importantes. Dentre as técnicas as mais utilizadas, estão: Difração de Raios X (XRD) e a Espectroscopia Vibracional no Infravermelho

por Transformada de Fourier (FT-IR) para análise de fases cristalinas presentes; Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) para análises de morfologia de superfície e interface; Testes de Dissolução para avaliar a concentração dos íons em solução; e Microfluorescência de Raios X com Radiação Síncrotron (µXRF-SR) para a quantificação de elementos químicos.

2.8.1 Análise de Difração de Raios X (XRD)

Dentre as vantagens da técnica de difração de raios X para a caracterização de fases minerais e cristalinas, destacam-se a simplicidade e rapidez do método, a confiabilidade dos resultados obtidos (pois o perfil de difração obtido é característico para cada fase cristalina), a possibilidade de análise de materiais compostos por uma mistura de fases e uma análise quantitativa destas fases (ALBERS *et al*., 2002).

A técnica da difratometria dos Raios X utiliza radiação com comprimento de onda da mesma ordem de grandeza das distâncias interplanares existente nas células unitárias dos cristais; desta forma a radiação atravessa os retículos cristalinos, e ao atingir planos de reflexão paralelos, produz uma figura de difração. Cada pico obtido no difratograma é resultado da interação da radiação (sob um determinado ângulo em relação ao feixe incidente e amostra) com um plano específico do cristal. Quanto maior o ângulo do feixe difratado em relação ao incidente, menor o espaçamento entre planos. O arranjo espacial dos átomos numa célula unitária define a estrutura cristalina e os planos cristalinos existentes. O número e a posição dos picos no difratograma de Raios X de uma amostra dependem do tipo e dimensão da célula unitária (corpo centrado, face centrada, cúbica) e sistema cristalino de simetria (triclínico, monoclínico, tetragonal, hexagonal, ortorrômbico) (BISH & REYNOLDS, 1989).

A partir da análise do padrão de difração é possível determinar os valores dos parâmetros da célula unitária de uma amostra desconhecida. Isto é feito utilizando programas específicos que refinam o padrão de difração experimental.

2.8.2 Análise de Espectroscopia Vibracional no Infra Vermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

A técnica de espectroscopia no infravermelho permite observarmos as seguintes características dos materiais analisados: identificação da fase ou da presença de fases e a identificação de grupos funcionais (CO_3, PO_4, OH, H_2O). Os dados obtidos por essa análise complementam os dados observados na difração de raios X, pois identificam a composição química dos fosfatos de cálcio. Na identificação do fosfato de cálcio, como a apatita, a espectroscopia de infravermelho identifica alguns elementos da sua composição, principalmente a substituição de grupos e a presença de grupos carbonato, fosfato e hidroxila. A combinação dos dados da análise das amostras no XRD e FT-IR fornecem informações precisas nas substituições encontradas na estrutura da HA (LeGEROS *et al.*, 1995).

2.8.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

A microscopia eletrônica de varredura é utilizada em várias áreas do conhecimento, incluindo a biológica. O uso desta técnica vem se tornando mais frequente por fornecer informações de detalhes da superfície do material, com aumentos de até 100.000 vezes, resultando assim em imagens com aparência tridimensional. O microscópio eletrônico de varredura é utilizado na avaliação da superfície de amostras espessas, não transparentes aos elétrons (KESTENBACH *et al.*, 1989), sendo um equipamento versátil que permite a obtenção de informações estruturais e químicas de amostras diversas. A imagem eletrônica de varredura é formada pela incidência de um feixe de elétrons no material sob condições de vácuo. Um feixe fino de elétrons de alta energia varre a superfície da amostra ponto a ponto onde, podendo ser refletido ou produzir elétrons secundários, que correspondem a elétrons arrancados da amostra pelo feixe incidente. A intensidade dos elétrons refletidos ou dos secundários pode modular, ponto a ponto, a intensidade do sinal em um monitor, gerando uma imagem da superfície varrida. Os elétrons refletidos possuem energia aproximadamente igual à do feixe, sendo denominados retroespalhados (ERE) ou *back scattered* (BEI). Já os elétrons secundários possuem energia baixa ($<$ 50 eV) e trazem informação da camada mais externa da amostra.

A imagem por elétrons secundários provém de interações inelásticas entre elétrons e amostra, levando a perda de energia do feixe, com pequena mudança de direção dos elétrons. Fornece maior resolução de imagem, grande profundidade de campo, impressão tridimensional e fácil interpretação. A imagem por elétrons retroespalhados provém de relações elásticas entre elétrons e amostra ocorrendo a mudança de direção sem perda apreciável de energia, apresentando como principal característica o contraste de composição (GOODHEW *et al.*, 2001).

2.8.4 Testes de Dissolução em Tampões MES e HEPES

Adsorção é definida como o acúmulo de matéria na interface entre a fase aquosa e um adsorvente sólido. Espécies adsorvidas podem ser acumuladas na superfície simplesmente por atração coulômbicas pela carga da superfície, ou podem reagir com grupos funcionais da superfície, formando uma ligação química específica, ou ainda, podem trocar com um constituinte do sólido para ocupar um sítio na estrutura superficial do adsorvente (STIPP *et al.*, 1992).

A modificação dos padrões de síntese da HA com a diminuição da temperatura da mistura, bem como a temperatura do tratamento térmico do material podem influenciar características como: solubilidade, cristalinidade, estabilidade térmica, atividade catalítica, rugosidade entre outras. Simular as condições de pH e temperatura, permite avaliar o comportamento da solubilidade de materiaiscerâmicos de diferentes cristalinidades (FULMER *et al.*, 2002).

2.8.5 Microfluorescência de Raios X por Radiação Síncrotron (XRF-SR)

A Microfluorescência de Raios X é uma variante da Fluorescência de Raios X por Dispersão em Energia, onde um feixe de raios X microscópico é utilizado para excitar localmente uma pequena área da amostra (da ordem de 100 x 100 μm^2 ou 10 x 10 μm^2 quando empregado capilar óptico) podendo-se realizar um mapeamento, ponto a ponto, da mesma. Com isso, tem-se a determinação da concentração elementar juntamente com o mapeamento bidimensional superficial

dos elementos químicos contidos na amostra. Logo, para cada ponto da amostra tem-se um espectro contendo todos os elementos presentes no local (LIMA, 2006).

A fonte de luz Síncrotron é uma fonte de excitação que, quando utilizada permite alcançar baixos limites de detecção e, quando comparadas a tubos convencionais de raios X, é extremamente “brilhante”, ou seja, possui um alto brilho espectral resultando em um aumento da intensidade de raios X primários (da ordem de 3 à 5 vezes) (ABRAHAM *et al.*, 2005).

Uma visão esquemática da Microfluorescência de Raios X por Radiação Síncrotron (XRF-SR) pode ser explicada através da seguinte seqüência: a radiação primária, que se origina do anel de armazenamento de radiação Síncrotron (SR), é transformada em um microfeixe por um sistema óptico. Esse microfeixe é utilizado para excitar a região de interesse na amostra e, a fluorescência emergente e a radiação espalhada são detectadas por um detector (LIMA, 2006).

3. HIPÓTESE

- As microesferas nanoestruturadas são biocompatíveis;

- A conformação de nanopartículas de Hidroxiapatita (HA) incorporadas ao biomaterial proporciona uma biodegradação gradual, com maior formação óssea em relação à HA estequiométrica.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos das NanoHAs no reparo ósseo de tíbias de coelhos, em relação ao defeito controle (coágulo) e às HAs estequiométricas, através de análises histológica e histomorfométrica

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Analisar as características físicas e químicas da estrutura das biocerâmicas;

2- Avaliação do grau de absorção (degradação) *in vitro* das esferas através de testes de dissolução, confrontando com a situação *in vivo*;

3- Avaliar a densidade por área de osso neoformado, bem como a densidade por área de tecido conjuntivo fibroso entre os grupos, através de segmentação das imagens de microscopia em Campo Claro e Luz Polarizada;

4- Avaliar o potencial osteocondutor dos biomateriais;

5- Analisar a interface osso-biomaterial e a biodegradação, através da Microscopia Eletrônica de Varredura (BEI-SEM);

6- Avaliar a distribuição elemental na interface osso-biomaterial através de µXRF-SR e EDS-SEM.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal Fluminense, sob o protocolo nº 0032/08.

5.1 SÍNTESE DOS MATERIAIS

Foram utilizados biocerâmicas à base de hidroxiapatita de cálcio estequiométrica em forma de esferas, com granulometria entre 425-600 µm, em diferentes conformações físicas, sintetizadas pelo CBPF (Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas), sob coordenação do Dr. Alexandre Malta Rossi.

Uma solução de nitrato de cálcio [$Ca(NO_3)_2.4H_2O$] com concentração total de cátions de 0,2 M, foi adicionada por gotejamento sobre uma solução de fosfato dibásico de amônio, $(NH_4)_2HPO_4$ a 0,2 M, numa taxa de 4,5 mL/min, mantendo-se o pH 9 com hidróxido de amônio concentrado (NH_4OH) em temperatura de 90°C e agitação mecânica de 240 rpm utilizando-se uma placa magnética. Esse procedimento configurou uma pasta homogênea de hidroxiapatita de cálcio (HA). Em relação à hidroxiapatita nanoestruturada (NanoHA), tal solução foi sintetizada em baixa temperatura, mantendo-se o alto ph, o que favoreceu o menor tamanho dos cristais, inferior a 12 nm.

Cada pasta foi extruída da seringa pelo método de gotejamento manual (RIBEIRO *et al.*, 2006) numa solução de 0,1 M de Cloreto de Cálcio ($CaCl_2$), conformando as partículas em formato esférico instantaneamente. Após um endurecimento mínimo de 30 minutos, as microesferas foram rinsadas em água e secas em estufa a 100° C overnight. Uma vez secas, foram então peneiradas, onde se obteve microesferas numa granulometria entre 425-600 µm. Os materiais então sofreram tratamento térmico para aumentar sua resistência, por calcinação ou por sinterização, conforme a tabela 1, e fornecidas esterilizadas por autoclavagem, de acordo com AKKUS e BELANEY (2005).

TABELA 1. Materiais sintetizados e respectivos tratamentos térmicos

Materiais	**Temperatura**
Hidroxiapatita Sinterizada	≥ 1000° C
Hidroxiapatita Não-Sinterizada	≤ 800° C
Hidroxiapatita Nanoestruturada Sinterizada	≥ 1000° C
Hidroxiapatita Nanoestruturada Não-Sinterizada	≤ 800° C

5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Os biomateriais foram submetidos ao refinamento de análises de caracterização físico-química, em parceria com o Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), formalizando características estruturais, morfologia de superfície, composição química e análise dos cristais, permitindo assim agrupar informações relevantes dos materiais.

Antes da implantação nos animais, foram utilizadas as técnicas de Difração de Raios-X (XRD), Espectroscopia Vibracional no Infravermelho por Transformada de Fourrier (FT-IR), Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) e Testes de Dissolução *in vitro* em tampões MES e HEPES.

Após a implantação, as amostras foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura com Elétrons Retroespalhados e Mapeamento Elemental através da

Espectroscopia de Energia Dispersiva (BEI-SEM e EDS-SEM), e Microfluorescência de Raios X com Radiação Síncrotron (µXRF-SR).

5.2.1 Difração de raios-X (XRD).

Caracterização que permite investigar as possíveis fases presentes e o grau de cristalinidade de cada material. Os difratogramas de Raios X para as amostras de HA e NanoHA em pó foram obtidos no Laboratório de Cristalografia e Difração de Raios-X do CBPF, com o difratômetro de pó Zeiss HZG4 usando radiação de CuKα (= 1,5418 Å) e varredura angular de 10 – 100° com passo de 0,05/s. Os difratogramas obtidos foram comparados aos padrões difratométricos de fases individuais disponíveis para os vários fosfatos de cálcio.

5.2.2 Espectroscopia Vibracional no Infravermelho por Transfornada de Fourier (FT-IR)

A técnica de espectroscopia vibracional no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) permite identificar os grupos químicos e também determinadas substituições na composição química da hidroxiapatita, através da oscilação de frequência de vibração em infravermelho. Os espectros do infravermelho para as amostras em pó da HA e NanoHA foram obtidos no Laboratório de Biomateriais do CBPF utilizando o espectrofotômetro por transformada de Fourier da Schimadzu, IR-Prestige 21 (Figura 4) com detector DTGS KBr (Figura 5), separador de feixes de KBr. A análise foi feita por transmitância utilizando pastilhas com 1% de KBr na região mediana do infravermelho (4000 – 400 cm^{-1}).

5.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

- **Das microesferas antes da implantação**

Análise que possibilita a caracterização da morfologia da superfície dos biomateriais. Possibilitou a obtenção de imagem detalhada da superfície das microesferas, que foram coladas sobre uma fita de carbono e recobertas com ouro,

utilizando-se aumentos de 100x para a visualização dos materiais e de 1000x para avaliação da superfície. As imagens resultaram de elétrons secundários (ES) e de observação sob condições de baixo vácuo. Foi utilizado o equipamento JEOL JSM 5310 do Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

- **Das amostras das microesferas implantadas nas tíbias dos coelhos**

Após a coleta das amostras e adequado processamento para inclusão em resina (descrito a seguir), os blocos referentes a cada grupo e período experimental foram preparados e recortados em lâminas de espessura média de 300 µm. Cada amostra foi acondicionada em suporte de alumínio (stubs) e colada com fita de carbono de alta área superficial, à temperatura ambiente de 24,0° C ± 1,0° C para análise no Núcleo de laboratório de Microscopia (LABMI) do INMETRO, em microscópio eletrônico de varredura QUANTA 200 (FEI, Inc.) com equipamento de espectrometria por energia dispersiva (EDS). As amostras não-metalizadas foram analisadas em baixo vácuo (modo ambiental), realizando-se uma varredura convencional (SEM) e uma análise Elemental (EDS) segmentada por área. Esta análise de microscopia buscou avaliar a interface osso-biomaterial, além do grau de biodegradação das esferas implantadas e a composição química do ambiente observado.

5.2.4 Testes *In Vitro* de Dissolução com tampões MES e HEPES

Permite avaliar a dissolução do cálcio e do fosfato das amostras de HA e NanoHA, em meios tamponados distintos. O experimento de dissolução foi feito em triplicata, onde a massa total das amostras em cada tubo Falcon foi de 0,05g, que foi incubada em 20 ml de tampões MES (pH 5,9) e HEPES (pH 7,4), sob agitação mecânica constante e suave (Agitador Kline CT-150) por 1 e 7 dias a 37° C. Após agitação, os tubos foram centrifugados a 6000 rpm por 10 minutos (Centrífuga CT-6000 R – Cientec®) e o sobrenadante pipetado e diluído em ácido nítrico a 12,5 %. Com os tempos estabelecidos, alíquotas de 5 mL das soluções foram retiradas e filtradas através de membranas 0,22 µm (Millipore). As concentrações de Ca e P foram determinadas por Espectrometria de Emissão Atômica com plasma acoplado

indutivamente - ICP/OES, modelo OPTIMA 3000 – Perkin-Elmer (EMBRAPA SOLOS-RJ.

5.2.5 Microfluorescência de Raios X com Radiação Síncrotron (µXRF-SR)

Foram utilizadas amostras com espessura de 200-300µm para a µFRX, obtidas de blocos de resina (micrótomo Isomet®), sendo uma de cada grupo em cada período experimental totalizando dez amostras. Os cortes não foram corados, nem montados em lâmina de vidro. O mapeamento Elemental através da µXRF-SR foi realizado no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas – São Paulo, Brasil, na linha de Fluorescência de Raios X em D09-XRF (Figura 6) conforme proposta número 8066 e 10108 e sob a orientação da professora Dra. Inayá Corrêa Barbosa Lima do Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN) da COPPE-UFRJ.

Um feixe claro (4 keV min – 23 keV max) foi usado para a excitação da amostra. Para focalizar o feixe de raios X foi utilizado um sistema ótico capilar, que é um dos melhores instrumentos para µXRF. Neste caso foi utilizado um capilar de vidro de 20 µm de diâmetro. Foi utilizada uma angulação de 45/45, o que significa que as amostras foram colocadas em 45º ao feixe incidente e, neste mesmo ângulo ao detector de estado sólido Si (Li), para a cletade radiação de raios X fluorescente. As medições foram realizadas em uma mesa computadorizada XYZ controlada, que permitiu a escolha da região de interesse (ROI) em cada amostra de osso. As amostras foram colocadas em um template de resina e presas com uma fita adesiva, onde os espectros foram direcionados diretamente no centro das amostras ósseas, sem envolver o template. A escolha do ROI foi feita com base na interface entre o osso e o implante (coágulo sanguíneo, HA ou NanoHA), definido pelo microscópio e a câmera CCD. O mapeamento elemental µXRF-SR foi realizado em uma área igual 1,2 mm^2, com uma resolução de imagem de 30 µm, produzindo 1.681 espectros. O tempo de medição por ponto foi de 10 segundos, levando cerca de quatro horas para completar uma única varredura. Todos os espectros de XRF foram analisados utilizando software QXAS / AXIL. Por fim, cada elemento foi plotado separadamente

sobre o mapeamento da distribuição implementada, com o apoio do programa auxiliar MATLAB.

Figura 6. Vista panorâmica da localização da linha µXRF no anel do LNLS.

Os biomateriais foram submetidos ao refinamento de análises de caracterização físico-química, em parceria com o Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), formalizando características estruturais, morfologia de superfície, composição química e análise dos cristais, permitindo assim agrupar informações relevantes dos materiais.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

A pesquisa foi realizada de acordo com as normas recomendadas pelo COBEA. Foram utilizados coelhos da raça Nova Zelândia Branca (*Oryctolagus cuniculus*) (*n*=12), machos e fêmeas adultos pesando entre 2000 e 3500g, oriundos do Laboratório de Produção de Coelhos (LPC) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense localizado na Fazenda Escola, em Cachoeiras de Macacu – no estado de Rio de Janeiro.

Os animais foram divididos randomicamente em 5 grupos experimentais, (*n*=5/grupo/período), os quais foram mortos em 7 e 28 dias após os procedimentos

cirúrgicos. A tabela 2 mostra os grupos experimentais e a disposição dos biomateriais:

Tabela 2. Grupos experimentais e disposição nas tíbias de coelhos

Grupos	Tíbia Direita	Grupos	Tíbia Esquerda
G1	Coágulo Sanguíneo (Controle)	**G4**	NanoHA Sinterizada
G2	HA Sinterizada	**G5**	NanoHA Não-Sinterizada
G3	HA Não-Sinterizada		

Aos grupos experimentais estarão dispostas 03 (três) perfurações na tíbia direita e 02 (duas) na tíbia esquerda dos coelhos, conforme a tabela 2: Durante o período experimental os animais foram mantidos no LPC, sendo um animal por gaiola tradicional em malha galvanizada medindo 0,90 x 0,60 x 0,45 m (Figura 7B), suspensas a 0,80 m do chão (Figura 7A). Após 30 dias de vida os coelhos foram desmamados e transferidos do Setor de Maternidade para o Setor de Recria. A alimentação após o desmame era à base de dieta padrão, constituída por 150 gramas/dia de ração balanceada na forma peletizada (Coelhil®, da Socil), fornecida obedecendo a horários e quantidades regulares para evitar a formação e proliferação de fungos por exposição do alimento. Durante todo o experimento a água foi fornecida *ad libitum*, através de bebedouros tipo bico.

Figura 7. A. Aspecto das gaiolas suspensas na cunicultura do LPC. B. Um animal por gaiola.

Todos os procedimentos a serem realizados nos animais e que pudessem resultar em ansiedade e/ou dor, foram conduzidos sob anestesia. Os animais foram privados de ração seis horas antes do ato operatório, exceto água, e pesados em balança digital de precisão.

Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico sob anestesia geral, com o médico anestesista veterinário Dr. Fábio Áscoli, e receberam como medicação pré-anestésica 20 mg/Kg de Cloridrato de Ketamina (Clortamina®, BioChimico) e 1 mg/kg de Cloridrato de Xylazina (Rompun®, Bayer), por via intramuscular trinta minutos antes do procedimento para diminuir o tônus vagal. Observando-se a ausência de reflexos à dor, os animais receberam como medicação anestésica Isoflurano 1% (Isoran®, BioChimico), por via inalatória mantida até o término do procedimento cirúrgico (Figuras 9C e 9D), e 2 ml de Prilocaína 3% com Felipressina (Citocaína®, Cristália Prod. Quím. Farmacêuticos), por via infiltrativa intramuscular. Os animais foram monitorados durante todo trans-operatório (Figuras 9A e 9B).

Para a recuperação anestésica, os coelhos foram devolvidos às suas gaiolas, permanecendo envoltos pelos campos operatórios, evitando-se hipotermia pós-anestésica. Permitiu-se aos coelhos ração e água à vontade e apoio imediato dos membros operados.

Os animais foram posicionados na mesa operatória em decúbito dorsal, com a cabeça hiperestendida para manter livres as vias aéreas superiores, sendo instalada a máscara inalatória para a manutenção anestésica (Figura 8). Após a realização da tricotomia nos membros posteriores dos animais, foi realizada a anti-sepsia com solução à base de iodo degermante (Povidine® tópico, Johnson Diversey) (Figura 10A), seguida de acomodação dos campos cirúrgicos estéreis, isolando-se as regiões que serão operadas.

Figura 8.Centro cirúrgico veterinário com o animal em decúbito dorsal e monitorado para controle de pressão arterial, freqüência cardíaca e saturação de O_2.

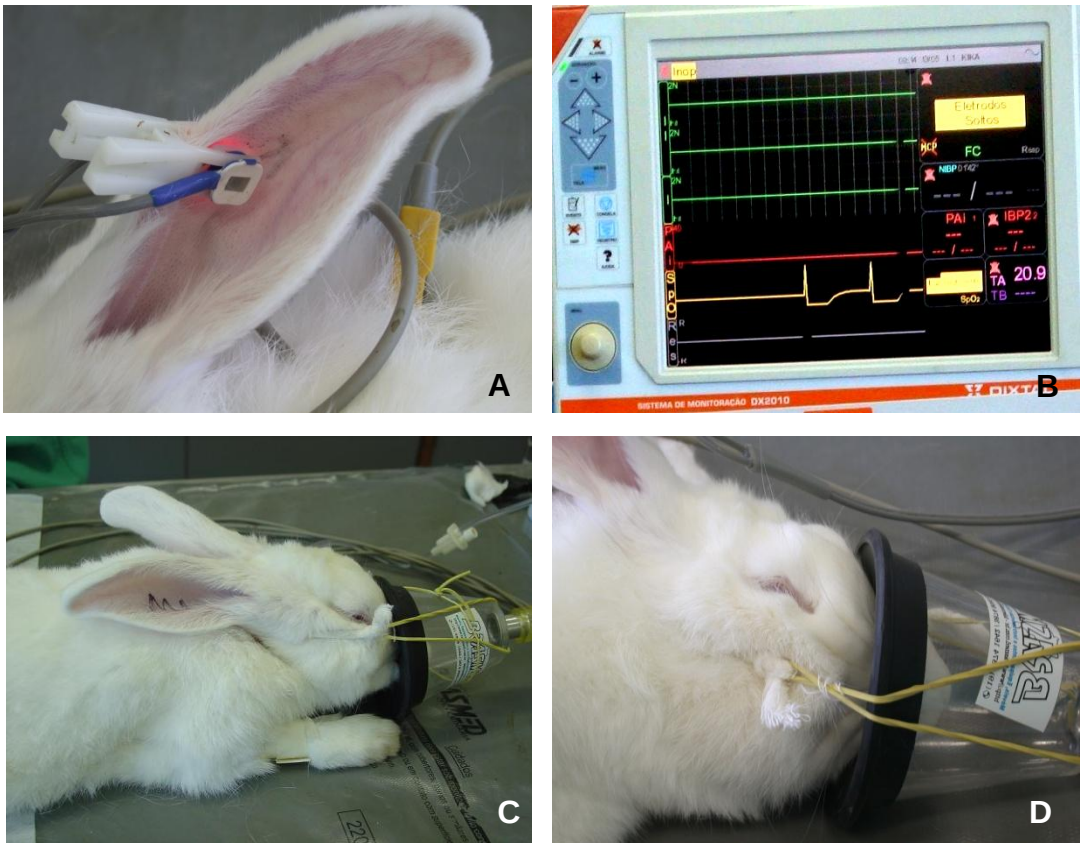


Figura 9. A. Oxímetro de pulso para avaliação de saturação de oxigênio durante o procedimento cirúrgico; B.Monitor multiparamétrico para avaliação de ECG, saturação de O_2, freqüência cardíaca e pressão arterial; C. Máscara para inalação do anestésico geral isoflurano a 1% no trans-operatório; D. Detalhe da máscara com o animal anestesiado.

Uma incisão longitudinal de aproximadamente 40 mm de comprimento foi realizada na região súpero-medial do membro posterior, na altura da porção proximal da tíbia, através do uso de cabo de bisturi n°3 (Bard Parker) e lâmina n°15 C (Becton-Dickinson. Ind. Cirúrgica S.A.) (Figura 10B). Após a incisão da pele, sem comprometer tecido muscular, nova incisão foi realizada no periósteo, expondo tecido ósseo (Figura 10C). Com o auxílio de brocas cirúrgicas para Implantodontia (Surgical Kit – Compact, Conexão Máster), realizaram-se três leitos cirúrgicos na porção proximal da tíbia direita e dois na tíbia esquerda (Figura 10D), para a instalação dos biomateriais. A primeira broca utilizada foi a do tipo “lança”, seguida pela broca esférica de 2 mm de diâmetro, broca “pilot”, com 2 a 3 mm de profundidade, apenas com o rompimento da cortical óssea, numa velocidade de rotação em torno de 1500 RPM e intermitente, com irrigação externa profusa de solução fisiológica estéril (cloreto de sódio a 0,9%) (Darrow Laboratórios S.A.) na intenção de manter a refrigeração da região, evitando-se a necrose tecidual local e desnaturação das proteínas do tecido ósseo por superaquecimento. O tamanho da perfuração no osso foi compatível com a necessidade de acomodação dos biomateriais, sem condensação excessiva para evitar a proliferação de tecido fibroso. Na tíbia direita com 03 (três) perfurações, foram implantados 02 (dois) biomateriais, na sequência crânio-caudal, como se segue: 1. Sem utilização de material de enxerto, sendo considerado o coágulo controle; 2. HA estequiométrica sinterizada; e 3. HA estequiométrica não-sinterizada (Figura 10E). Na tíbia esquerda, foram implantados 02 (dois) biomateriais na sequência crânio-caudal: 4. HA Nanocristalina Sinterizada; e 5. HA Nanocristalina não-sinterizada. No total, os grupos experimentais contaram com 60 amostras em 12 coelhos, permitindo a análise estatística adequada. Para o procedimento cirúrgico foi utilizado um motor (SIN) de tecnologia norte-americana (Driller®), com especificações próprias para cirurgias implantodônticas.

Após o enxerto dos biomateriais, o periósteo foi reposicionado para sutura em pontos simples, diretamente sobre as perfurações com fio Mononylon 5.0 (ETHICON®, Johnson & Johnson), possibilitando orientação posterior; o plano muscular e a pele foram suturados em ponto contínuo com fio Mononylon 5.0 (ETHICON®, Johnson & Johnson) (Figura 10F). Todos os animais receberam terapia antibiótica por meio de uma injeção intramuscular de 0,3 mg/kg de antibiótico

(Pentabiótico Veterinário®, Fort Dodge) e 0,3 mg/kg de meloxicam veterinário (Maxicam®, Ouro Fino Bem Estar Animal), em doses únicas.

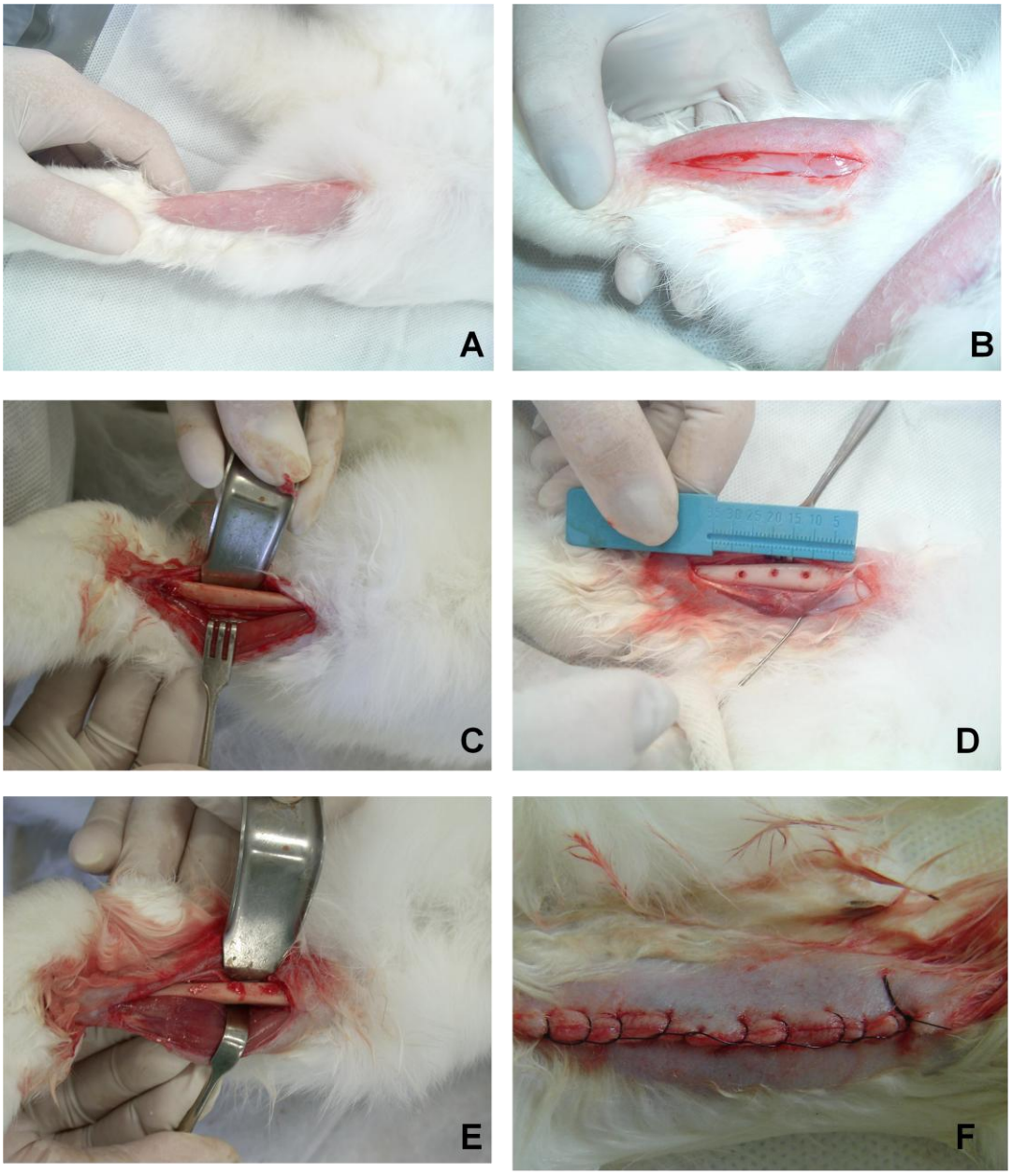


Figura 10. A. Membro posterior tricotomizado e asséptico; B. Incisão reta de aproximadamente 40 mm; C. Afastamento do tecido muscular, incisão do periósteo e exposição do tecido ósseo tibial; D. Perfurações de 2 mm de diâmetro com 1 cm de distância entre elas; E. Preenchimento das perfurações com as microesferas hidratadas; e F. Sutura contínua com fio mononylon 5-0.

Decorridos os períodos experimentais de 7 e 28 dias, os animais foram pré-anestesiados como descrito para os procedimentos cirúrgicos e mortos por dose excessiva de anestésico para coleta das amostras, seguindo as normas do COBEA.

Os tecidos moles foram dissecados para visualização (Figuras 11A e 11B). Os blocos ósseos contendo os enxertos no centro de cada bloco foram removidos através de um disco diamantado acoplado em mandril para peça de mão sob irrigação profusa (Figura 11C) e imediatamente mantidos imersos em solução fixadora de glutaraldeído – Glutaraldeído 25%, Cacodilato de Sódio 0,1 M e Água Destilada – durante um período mínimo de quarenta e oito horas e as amostras submetidas à inclusão em resina. As amostras foram então encaminhadas para o processamento histológico, no Laboratório de Bioengenharia, Materiais e Mineralização Biológica da UFF, sob orientação do Prof. Dr. José Mauro Granjeiro.

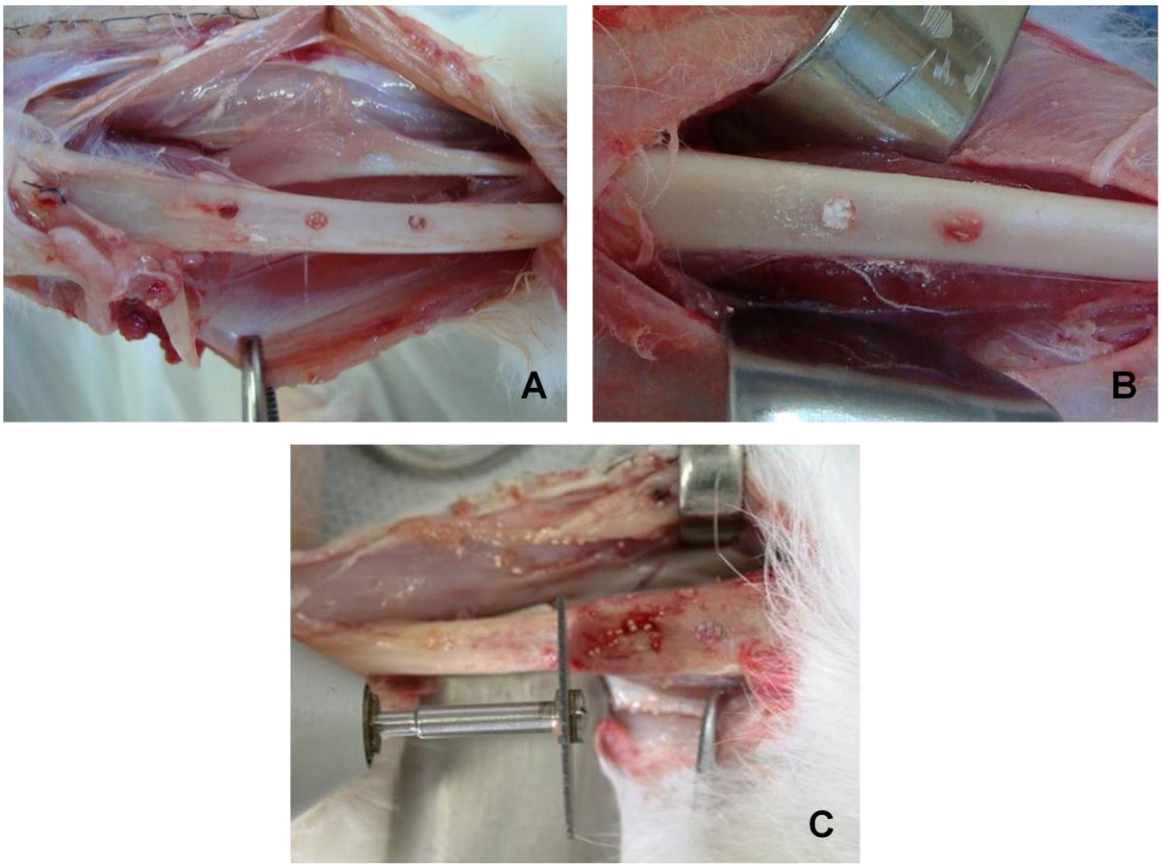


Figura 11. Obtenção dos blocos ósseos. A. Aspecto clínico da tíbia direita após 28 dias de implantação das HAs; B. Aspecto clínico da tíbia esquerda após 28 dias de implantação das NanoHAs; e C. Disco diamantado acoplado em mandril para peça de mão para o corte da tíbia e obtenção dos blocos ósseos com margem de segurança.

5.4 INCLUSÃO EM RESINA

As amostras fixadas em solução de glutaraldeído sofreram desidratação com banhos sucessivos de álcool – álcool 70%, álcool 95% e álcool 100% absoluto – permanecendo 02 (dois) dias em cada solução. As amostras foram então diafanizadas em solução de xileno por 24 horas, seguidas de banhos consecutivos em 03 (três) soluções de diferentes concentrações de resina para completa impregnação. Solução 1 – Metil Metacrilato e Di-Butil Ftalato, na proporção 3:1 – 7,5 ml de Metil Metacrilato e 2,5 ml de Di-Butil Ftalato para cada amostra por 02 (dois) dias. Solução 2 – 7,5 ml de Metil Metacrilato, 2,5 ml de Di-Butil Ftalato e 0,1 g de Peróxido de Benzoíla para cada amostra, também por 02 (dois) dias. Passados estes períodos, cada amostra foi incluída na solução 3 – 7,5 ml de Metil Metacrilato, 2,5 ml de Di-Butil Ftalato e 0,25 g de Peróxido de Benzoíla, acomodadas em potes plásticos resistentes com tampa rosqueável (Labcom Materiais e Equipamentos) para minimizar a entrada de ar e consequente formação de bolhas. Os frascos foram então devidamente etiquetados, identificados e posicionados verticalmente, dentro de uma estufa de termômetro digital a 39° C por um período mínimo de 07 (sete) dias, até a sua completa polimerização (Tabela 3).

TABELA 3. Seqüência de processamento da amostra não desmineralizada

Soluções	Tempo	Temperatura
Álcool 70%	2 dias	16°C
Álcool 95%	2 dias	16°C
Álcool 100%	2 dias	16°C
Xilol	1 dia	16°C
7,5 ml de metil-metacrilato 2,5 ml de di-butil-ftalato	2 dias	16°C
0,1g de peróxido de benzoíla 7,5 ml de metil-metacrilato 2,5 ml de di-butil-ftalato	2 dias	16°C
0,25 g de peróxido de benzoíla 7,5 ml de metil-metacrilato 2,5 ml de di-butil-ftalato	7 dias	39°C

Posteriormente, cada bloco de resina contendo a amostra foi recortado com serra de ourives número 3 em arco de serra (Figura 12A), seguido de acabamento através de uma broca de Tungstênio (Edenta®, Labordental), remanescendo apenas uma fina camada recobrindo a cortical óssea. As amostras foram então posicionadas

num equipamento de cortes de precisão em baixa velocidade (Isomet®, Buehler), para cortes finos de aproximadamente 300 µm (Figura 12B). Cada corte foi então lavado, seco e colado (Araldite®, Brascola) sobre uma lâmina fosca de microscopia (Labor Slides). Após 4 horas de secagem, as lâminas sofreram acabamento e polimento com lixas d'água (Norton®, Saint-Gobain) de granulações decrescentes (400, 600, 800, 1200 e 1500), passando a uma espessura final aproximada de 40 µm. Foram então fechadas com Entellan® (Merck©, Darmstadt, Alemanha) e lamínula de vidro para avaliação microscópica.

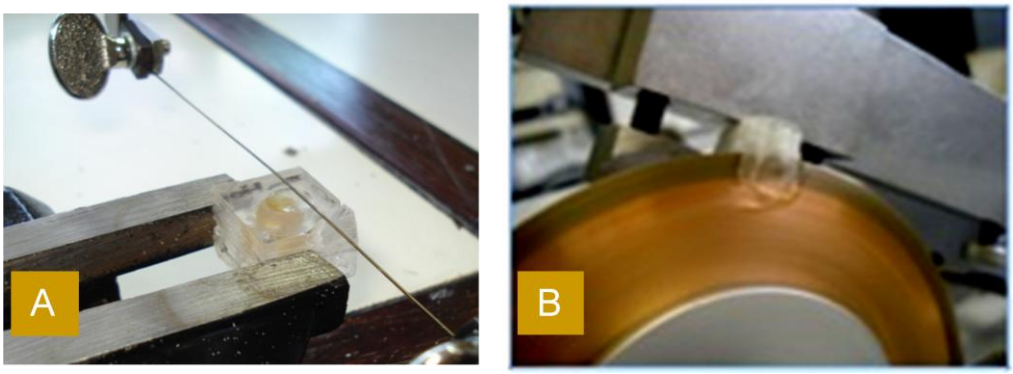


Figura 12. A. Corte do excesso de resina com a utilização de arco de serra e serra de ourives número 3; e B. Corte de 100-200 µm da amostra no micrótomo Isomet®.

5.5 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

As lâminas contendo as amostras não-desmineralizados foram avaliadas em microscopia de luz em campo claro e microscopia de polarização com compensador para evidenciar birrefringência do tecido ósseo e das fibras colágenas em luz polarizada (microscópio Zeiss-Axioplan, Alemanha – Objetiva 10x/0,30 Acroplan.Neofluar). As imagens capturadas (Evolution MP Color 5.0, Media Cybernetics, Canadá) permitiram avaliações qualitativas e quantitativas da região intercortical relacionada ao local enxertado, através de segmentação pelo programa Image Pro Plus® (Media Cybernetics, L. P., Silver Spring, MD.), a fim de mensurar as características do osso neoformado e sua interface com o osso pré-existente e os biomateriais, bem como análise estatística pertinente.

Foram fotografados 4 campos compreendendo dois pontos a partir das corticais em cada corte histológico, correspondente a 4 biomateriais e 1 controle por animal que geraram 55 cortes, perfazendo um total de 220 imagens digitais. Antes da colocação da lâmina na platina do microscópio, sua limpeza foi feita com lenço de papel para remoção de impurezas. A iluminação do microscópio foi mantida constante durante todas as sessões de captura de imagem e a objetiva escolhida para a captura foi a de 10X por propiciar um bom campo de observação, além de permitir o detalhamento morfológico do tecido.

A análise histomorfométrica foi realizada com o auxílio do programa Image Pro Plus®, no qual foi realizada a segmentação das imagens para obtenção de densidade por área de osso neoformado e de tecido conjuntivo (APFEL *et al.*, 2002; MANDARIM-DE-LACERDA, 2003). As imagens foram delimitadas na região de interesse, seguida de segmentação do tecido ósseo neoformado e do tecido conjuntivo, definidos separadamente (Figura 13). Os dados obtidos dos cortes histológicos dos 5 grupos experimentais foram tabulados (Figura 14) para análise estatística pertinente. Neste contexto, utilizamos os programas GraphPad InStat versão 3.01 (GraphPad Software, San Diego, California, EUA) e GraphPad Prism versão 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, EUA), analisando os grupos experimental e controle através da comparação entre as densidades por área de osso neoformado e de tecido conjuntivo na região entre as corticais do defeito da tíbia dos animais e na interface osso e esferas remanescentes, em cada período experimental (7 e 28 dias). As médias e desvios padrão obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA com pós-teste de Tukey (se $p<0,05$).

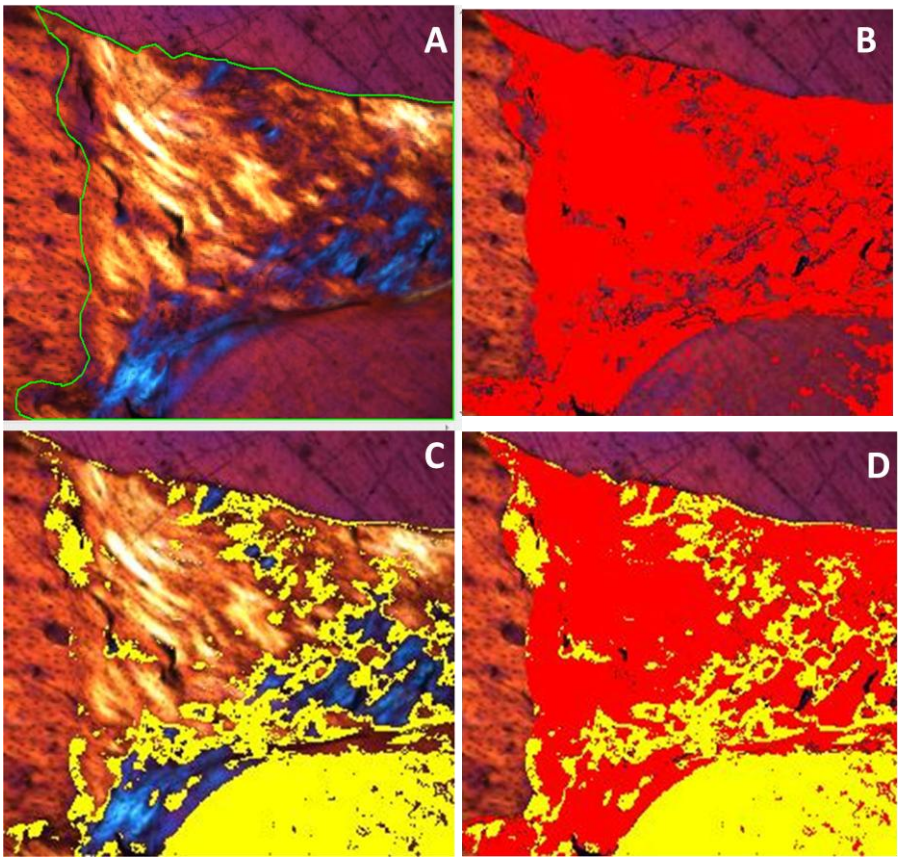
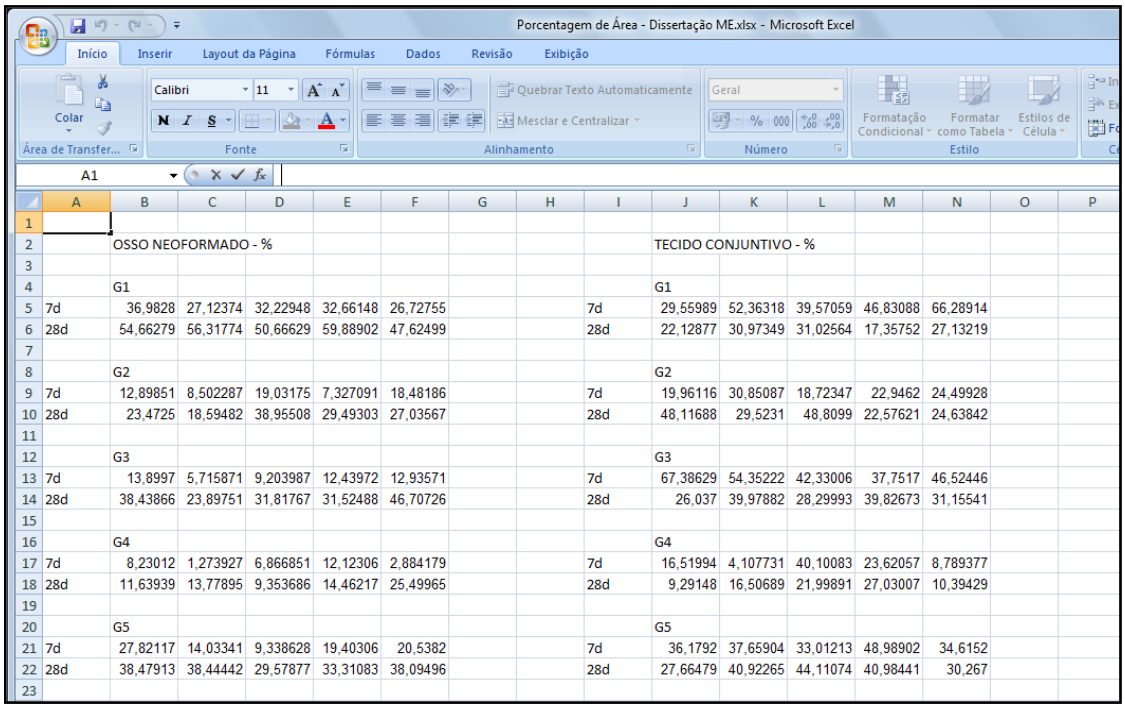


Figura 13. A. Delimitação da área entre as corticais ósseas; B. Área selecionada do segmento correspondente ao tecido ósseo neoformado; C. Área selecionada do segmento correspondente ao tecido conjuntivo; e D. Área selecionada total para contagem de tecido ósseo e conjuntivo (objetiva de 10 X, Luz Polarizada com Compensador).



Porcentagem de Área - Dissertação ME.xlsx - Microsoft Excel

1																
2		OSSO NEOFORMADO - %								TECIDO CONJUNTIVO - %						
3																
4		G1								G1						
5	7d	36,9828	27,12374	32,22948	32,66148	26,72755			7d	29,55989	52,36318	39,57059	46,83088	66,28914		
6	28d	54,66279	56,31774	50,66629	59,88902	47,62499			28d	22,12877	30,97349	31,02564	17,35752	27,13219		
7																
8		G2								G2						
9	7d	12,89851	8,502287	19,03175	7,327091	18,48186			7d	19,96116	30,85087	18,72347	22,9462	24,49928		
10	28d	23,4725	18,59482	38,95508	29,49303	27,03567			28d	48,11688	29,5231	48,8099	22,57621	24,63842		
11																
12		G3								G3						
13	7d	13,8997	5,715871	9,203987	12,43972	12,93571			7d	67,38629	54,35222	42,33006	37,7517	46,52446		
14	28d	38,43866	23,89751	31,81767	31,52488	46,70726			28d	26,037	39,97882	28,29993	39,82673	31,15541		
15																
16		G4								G4						
17	7d	8,23012	1,273927	6,866851	12,12306	2,884179			7d	16,51994	4,107731	40,10083	23,62057	8,789377		
18	28d	11,63939	13,77895	9,353686	14,46217	25,49965			28d	9,29148	16,50689	21,99891	27,03007	10,39429		
19																
20		G5								G5						
21	7d	27,82117	14,03341	9,338628	19,40306	20,5382			7d	36,1792	37,65904	33,01213	48,98902	34,6152		
22	28d	38,47913	38,44442	29,57877	33,31083	38,09496			28d	27,66479	40,92265	44,11074	40,98441	30,267		
23																

Figura 14. Planilha do software Excel com contagem das áreas de interesse de osso neoformado e tecido conjuntivo,dos grupos e períodos experimentais.

6. RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICA DOS MATERIAIS

As amostras de hidroxiapatita e nanohidroxiapatita, sinterizadas e não-sinterizadas, tiveram suas características físicas e químicas avaliadas antes e após a implantação nos animais.

6.1.1 Antes da implantação

6.1.1.1 Análise de Difração de Raios-X (XRD)

Os difratogramas de Raios X realizados nas hidroxiapatitas e nanohidroxiapatitas mostram espectros similares, condizentes com as fases cristalinas de materiais biocerâmicos à base de apatitas. Entretanto, os picos espectrais são mais intensos nos materiais sinterizados, onde o tratamento térmico acima de 1000° C aumenta sua cristalinidade, como mostra a Figura 15. Os picos menores dos materiais não-sinterizados mostram as mesmas fases cristalinas dos materiais sinterizados. Independente da síntese de cada material, todos mantiveram os mesmos padrões difratométricos.

6.1.1.2 Análise de Espectroscopia Vibracional no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros de infravermelho das hidroxiapatitas e nanohidroxiapatitas antes da implantação mostram bandas na faixa de comprimento de onda aproximado de 1000 cm^{-1} correspondente ao grupamento funcional fosfato $(PO_4)^{3-}$. O comprimento de onda na faixa de 3500-3600 cm^{-1} corresponde às bandas de hidroxilas (OH^{-1}) e as bandas de comprimento de onda aproximado entre 1450-1600 cm^{-1} sugerem a presença de carbonato (Figura 16).

6.1.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

A técnica de microscopia de varredura detalhou a morfologia de superfície das amostras de hidroxiapatita e Nanohidroxiapatita, nos aumentos de 100 X e 1000 X. Notam-se superfícies bem irregulares com maior número de fendas e poros, característica comum, sobretudo nos materiais não-sinterizados. A superfície da HA e NanoHA sinterizadas se mostraram mais coesas (Figura 17)

6.1.1.4 Análises de Dissolução em Tampões MES e HEPES

Os ensaios de dissolução *in vitro* foram realizados nos tempos de 1 e 7 dias para as amostras dos quatro materiais estudados, em triplicata. Observa-se no tampão MES (pH 5,9) que as concentrações de cálcio e fósforo são muito maiores que no tampão HEPES (pH 7,4), em ambos os períodos estudados (Figuras 18 e 19). Os materiais se solubilizam mais em meio mais ácido. Nota-se ainda que os materiais não-sinterizados liberam mais Ca e P que os sinterizados, bem como as Nanohidroxiapatitas em relação às hidroxiapatitas.

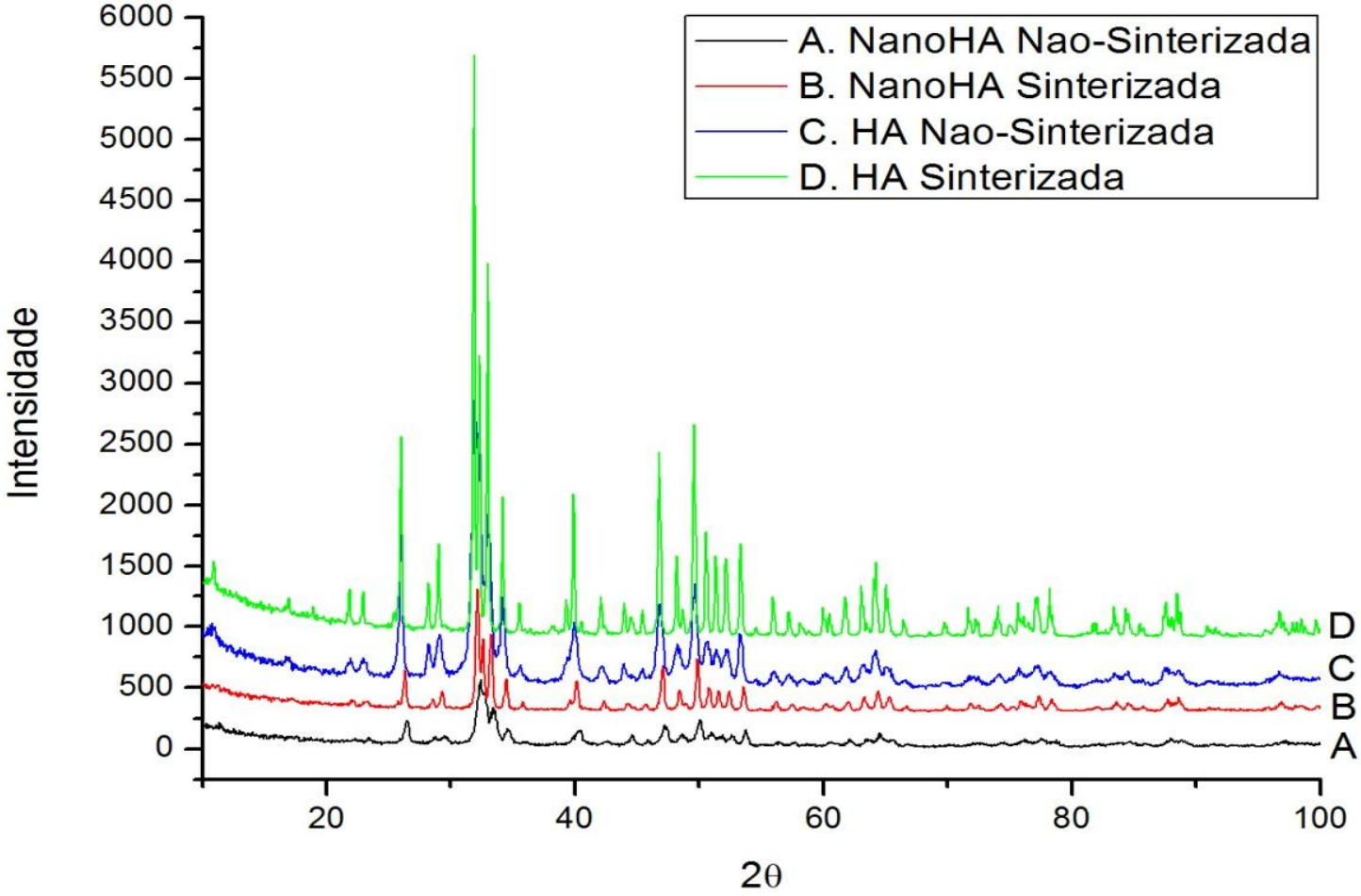


Figura 15. Difratogramas mostram picos maiores nos materiais sinterizados (B e D), denotando maior cristalinidade que os materiais não-sinterizados (A e C).

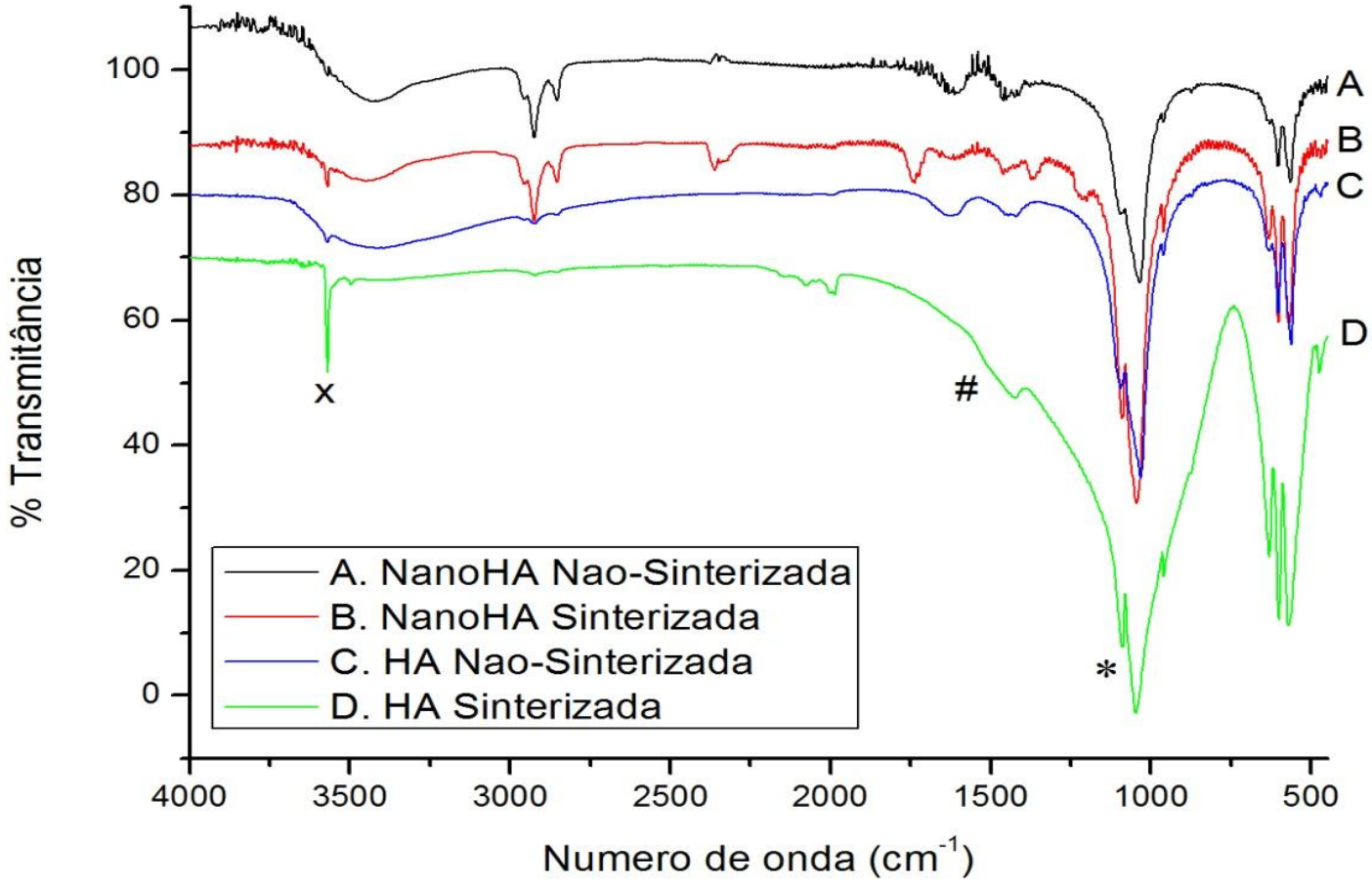


Figura 16. Bandas espectrais similares quanto aos seus grupamentos químicos característicos de biocerâmicas à base de hidroxiapatita. Bandas típicas de Fosfato (*), Carbonato (#) e hidroxila (x).

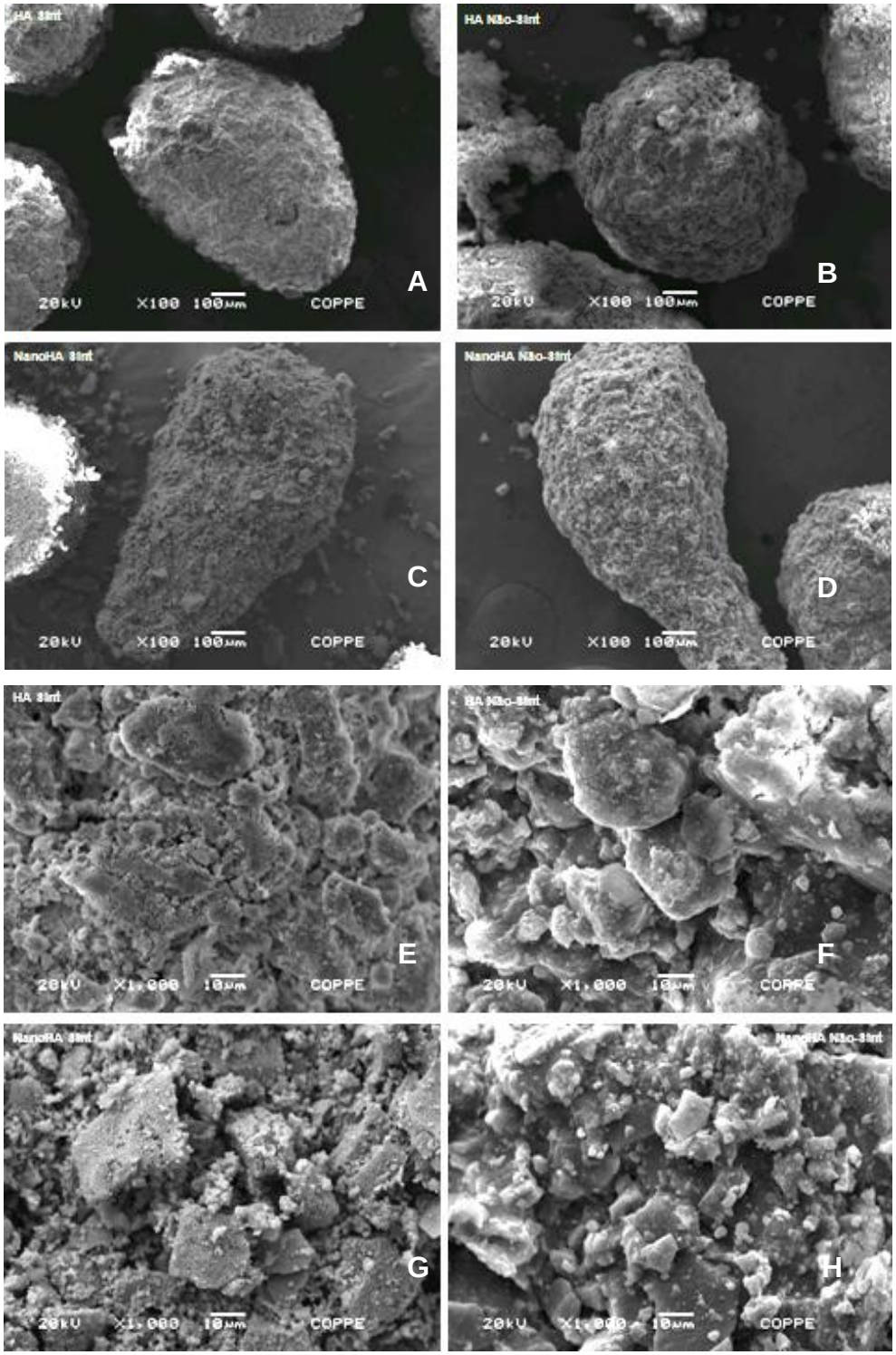


Figura 17. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das microesferas permite visualizar a superfície irregular dos biomateriais (A, B, C e D), aumento de 100 X. Notam-se fendas e grandes irregularidades (E, F, G e H), sobretudo nos materiais não-sinterizados (F e H), aumento 1000X.

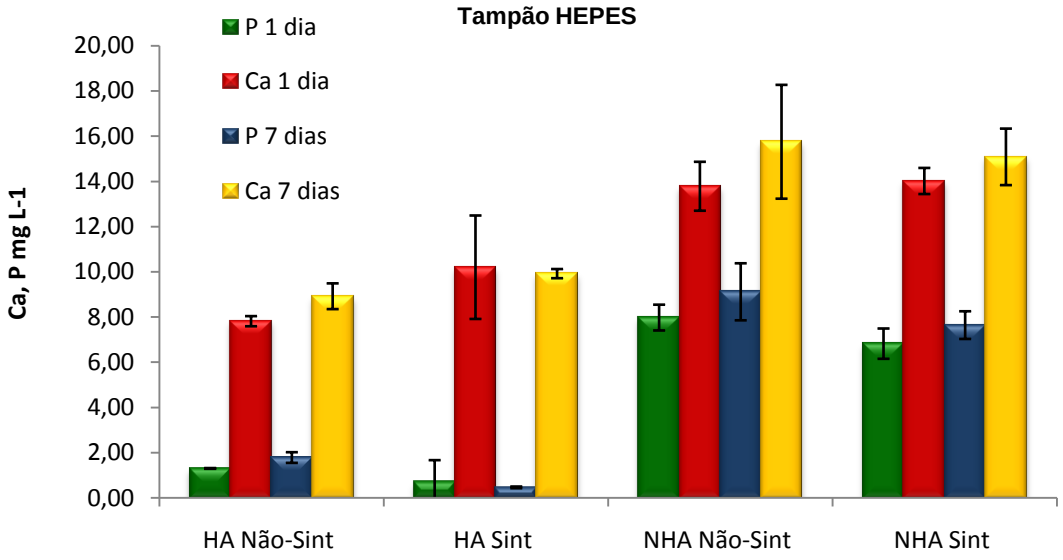


Figura 18. Teste de Dissolução em tampão HEPES - pH 7.4, revelando maior solubilidade de Ca em relação a P em todos os grupos. As colunas mostram um aumento significativo de solubilidade das NanoHAs.

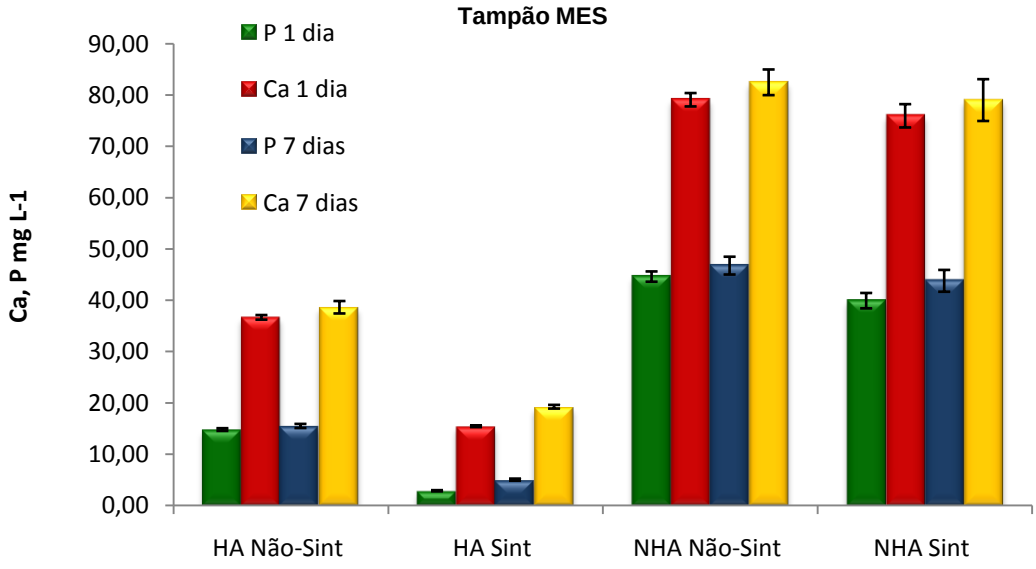


Figura 19. Teste de Dissolução em tampão MES - pH 5.9, mostrando grande solubilidade de Ca e P em meio mais ácido, sendo o Ca mais solúvel que P, sobretudo nas NanoHAs. HA sinterizada teve um comportamento similar ao pH maior do outro tampão, ou seja, uma dissolução significativamente menor.

6.1.2 Após a implantação

6.1.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Após a implantação foi realizada a microscopia eletrônica de varredura nas amostras incluídas em resina dos quatro grupos e nos dois períodos experimentais avaliados. Foi realizada a análise das imagens eletrônicas de varredura com elétrons retro-espalhados e análise da composição química Elemental através da Energia Superficial Dispersiva.

Na análise da composição química, o mapeamento Elemental através da EDS detectou a presença dos elementos Cálcio e Fósforo em todas as amostras, tanto nos tecidos ósseos pré-existente e neoformado como nas microesferas biodegradadas, parcial ou totalmente. A presença de Carbono foi evidente nos espaços onde inexistiam tecidos neoformados ou biomateriais. (Figuras 20-27, itens A, B e C).

As imagens com elétrons retroespalhados revelaram o início de formação óssea de maneira centrípeta em direção às esferas aos 7 dias de implantação, inclusive com esferas particuladas e algumas fragmentadas (Figuras 20A, 22A, 24A e 26A), sobretudo nos materiais não-sinterizados. Aos 28 dias pós-operatórios, observamos formação de novo osso permeando as esferas, em íntimo contato com as mesmas, sugerindo osteocondução. Nos grupos de materiais não-sinterizados, houve grande biodegradação das esferas e sua substituição por novo osso (Figuras 23A e 27A).

- **HA Sinterizada – 7 dias**

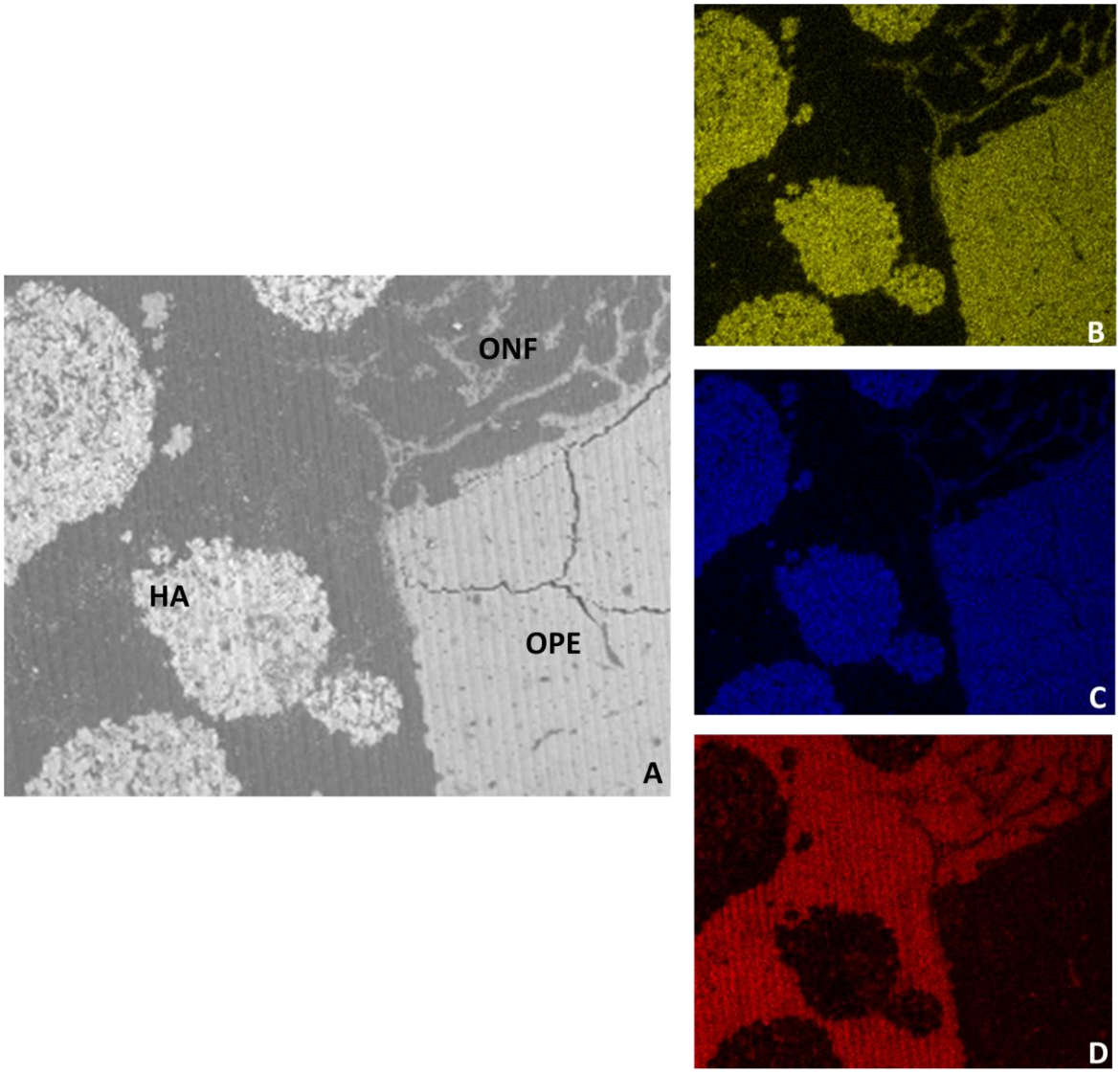


Figura 20. Micrografia (BEI-SEM e EDS-SEM) do grupo HA Sinterizada 7 dias. A. BEI-SEM mostra presença de osso neoformado (ONF), crescimento centrípeto do osso pré-existente cortical (OPE) em direção às esferas de hidroxiapatita (HA) preservadas. Mapeamento Elemental através de EDS-SEM, indicando em: B. Presença de Ca; C. Presença de P; e D. Presença de O.

- **HA Sinterizada – 28 dias**

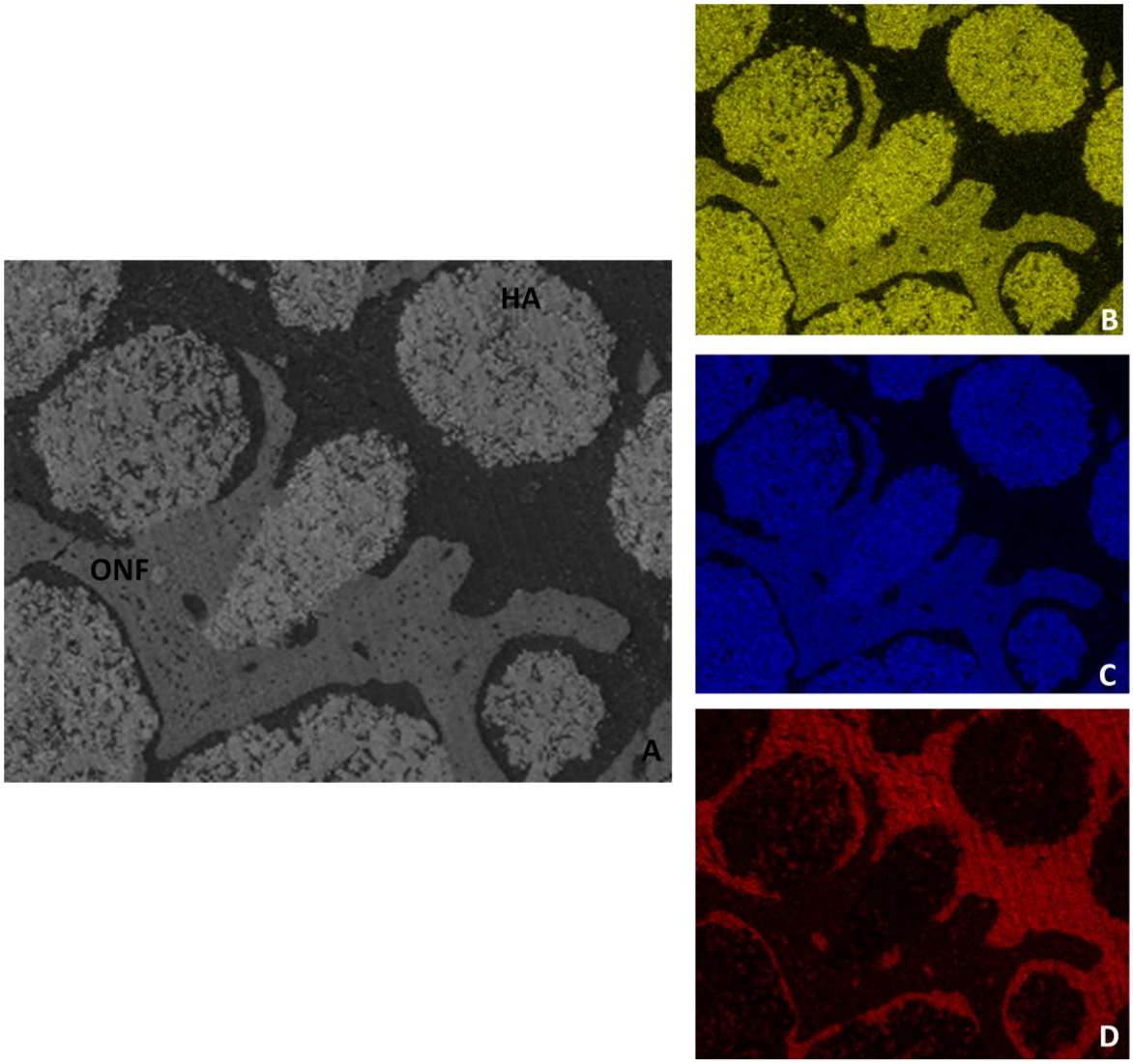


Figura 21. Micrografia (BEI-SEM e EDS-SEM) do grupo HA Sinterizada 28 dias. A. BEI-SEM mostra presença de osso neoformado (ONF) permeando as esferas de hidroxiapatita (HA) preservadas – nota-se o contato justaposto na interface osso-biomaterial, indicando osteocondução e biocompatibilidade. Mapeamento Elemental através de EDS-SEM, indicando em: B. Presença de Ca; C. Presença de P; e D. Presença de O.

- **HA Não-Sinterizada – 7 dias**

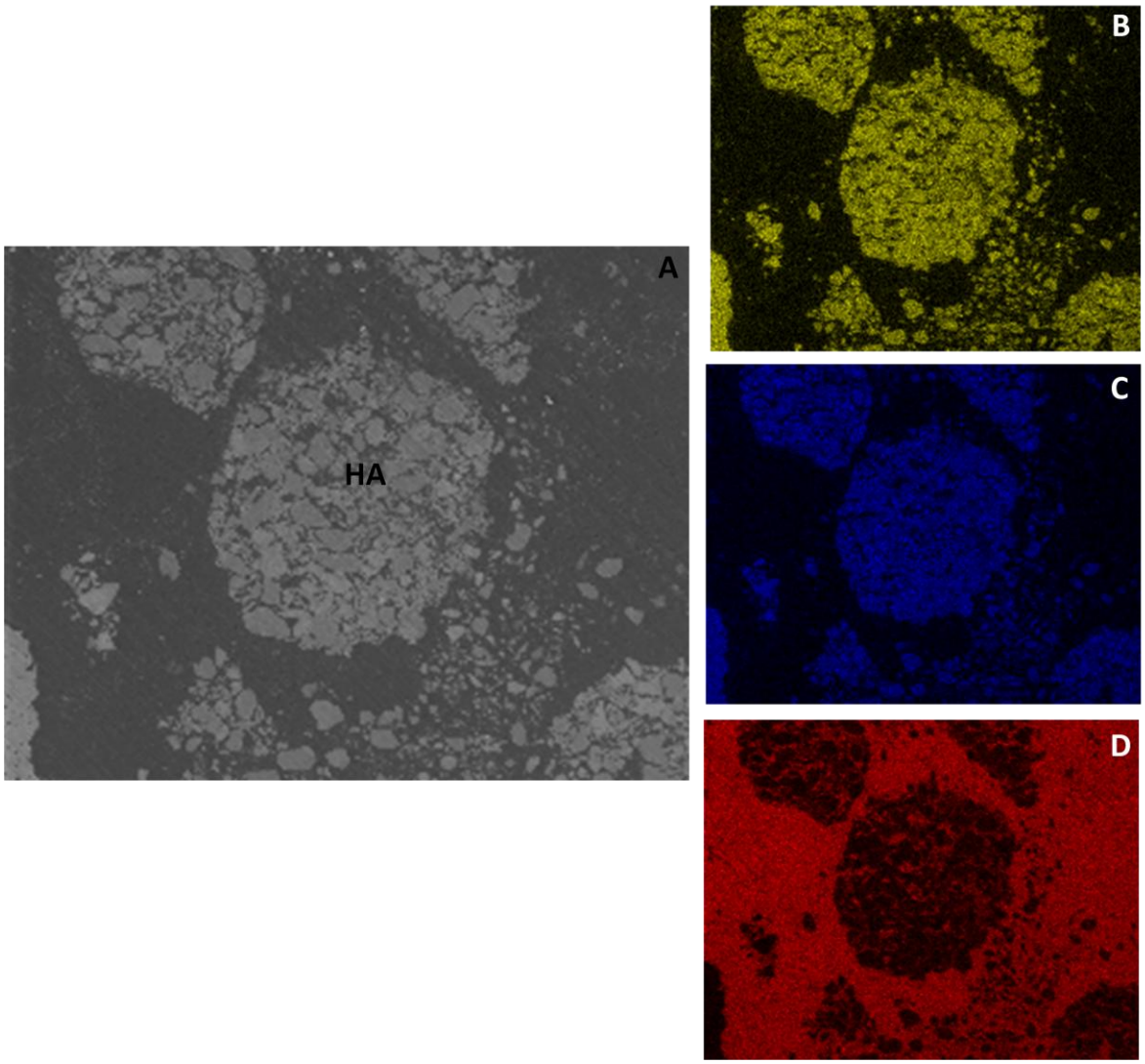


Figura 22. Micrografia (BEI-SEM e EDS-SEM) do grupo HA Não-Sinterizada 7 dias. A. BEI-SEM mostra a fragmentação das esferas de hidroxiapatita (HA). Mapeamento Elemental através de EDS-SEM, indicando em: B. Presença de Ca; C. Presença de P; e D. Presença de O.

- **HA Não-Sinterizada – 28 dias**

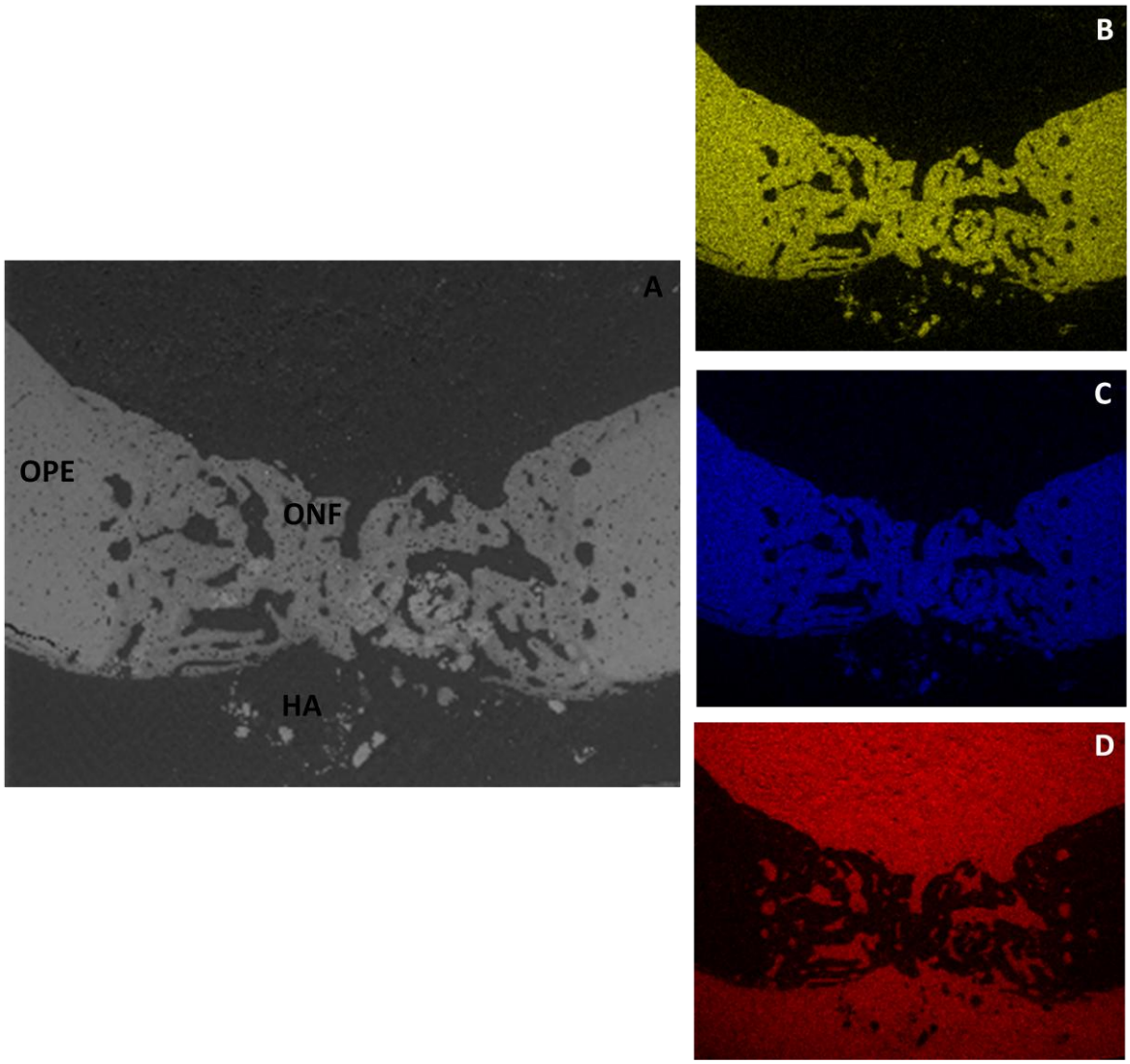


Figura 23. Micrografia (BEI-SEM e EDS-SEM) do grupo HA Não-Sinterizada 28 dias. A. BEI-SEM mostra presença de osso neoformado (ONF) permeando as esferas de hidroxiapatita (HA) fragmentadas, com tons mais claros, bem como a ligação entre as duas corticais do defeito de 2 mm com a formação de novo osso – nota-se o contato justaposto na interface osso-biomaterial degradado, indicando osteocondução e biocompatibilidade. Mapeamento Elemental através de EDS-SEM, indicando em: B. Presença de Ca; C. Presença de P; e D. Presença de O.

- **NanoHA Sinterizada – 7 dias**

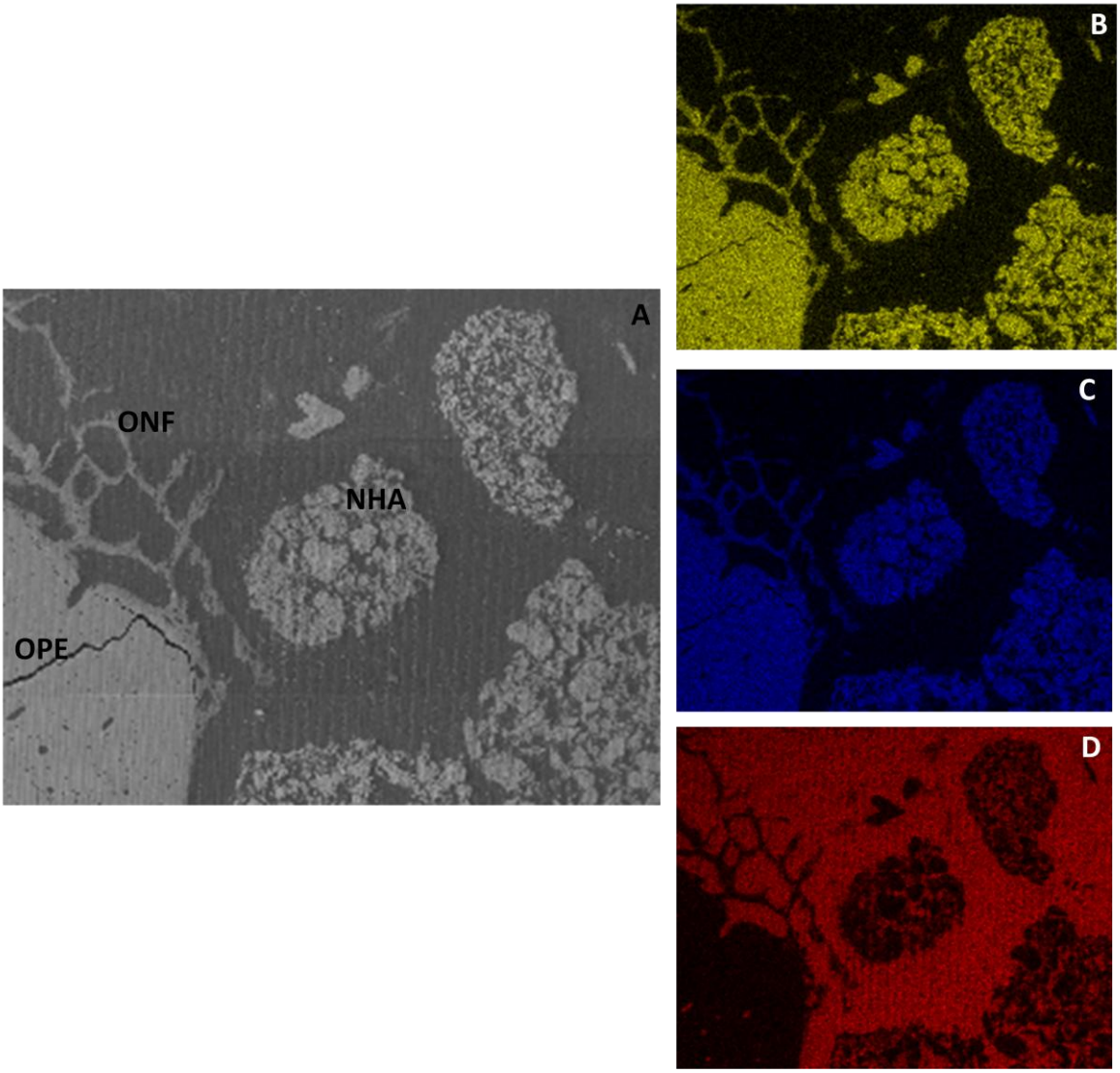


Figura 24. Micrografia (BEI-SEM e EDS-SEM) do grupo NanoHA Sinterizada 7 dias. A. BEI-SEM mostra presença de osso neoformado (ONF): crescimento centrípeto do osso pré-existente cortical (OPE) em direção às esferas de nanohidroxiapatita (NHA) preservadas. Mapeamento Elemental através de EDS-SEM, indicando em: B. Presença de Ca; C. Presença de P; e D. Presença de O.

- **NanoHA Sinterizada – 28 dias**

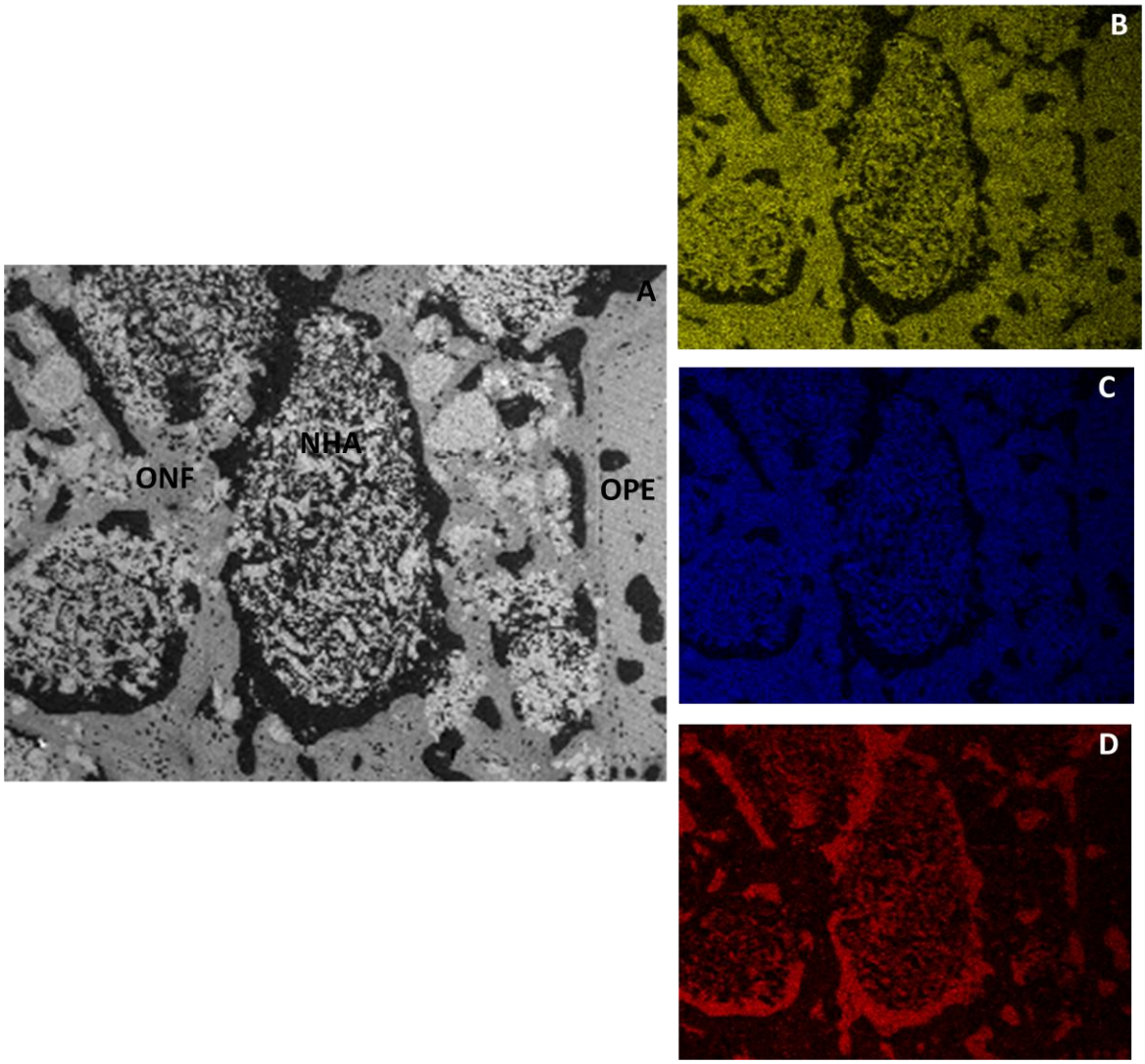


Figura 25. Micrografia (BEI-SEM e EDS-SEM) do grupo NanoHA Sinterizada 28 dias. A. BEI-SEM mostra presença de osso neoformado (ONF) permeando as esferas de nanohidroxiapatita (NHA) preservadas, em tons mais claros – nota-se o contato justaposto na interface osso-biomaterial, indicando osteocondução e biocompatibilidade. Mapeamento Elemental através de EDS-SEM, indicando em: B. Presença de Ca; C. Presença de P; e D. Presença de O.

- **NanoHA Não-Sinterizada – 7 dias**

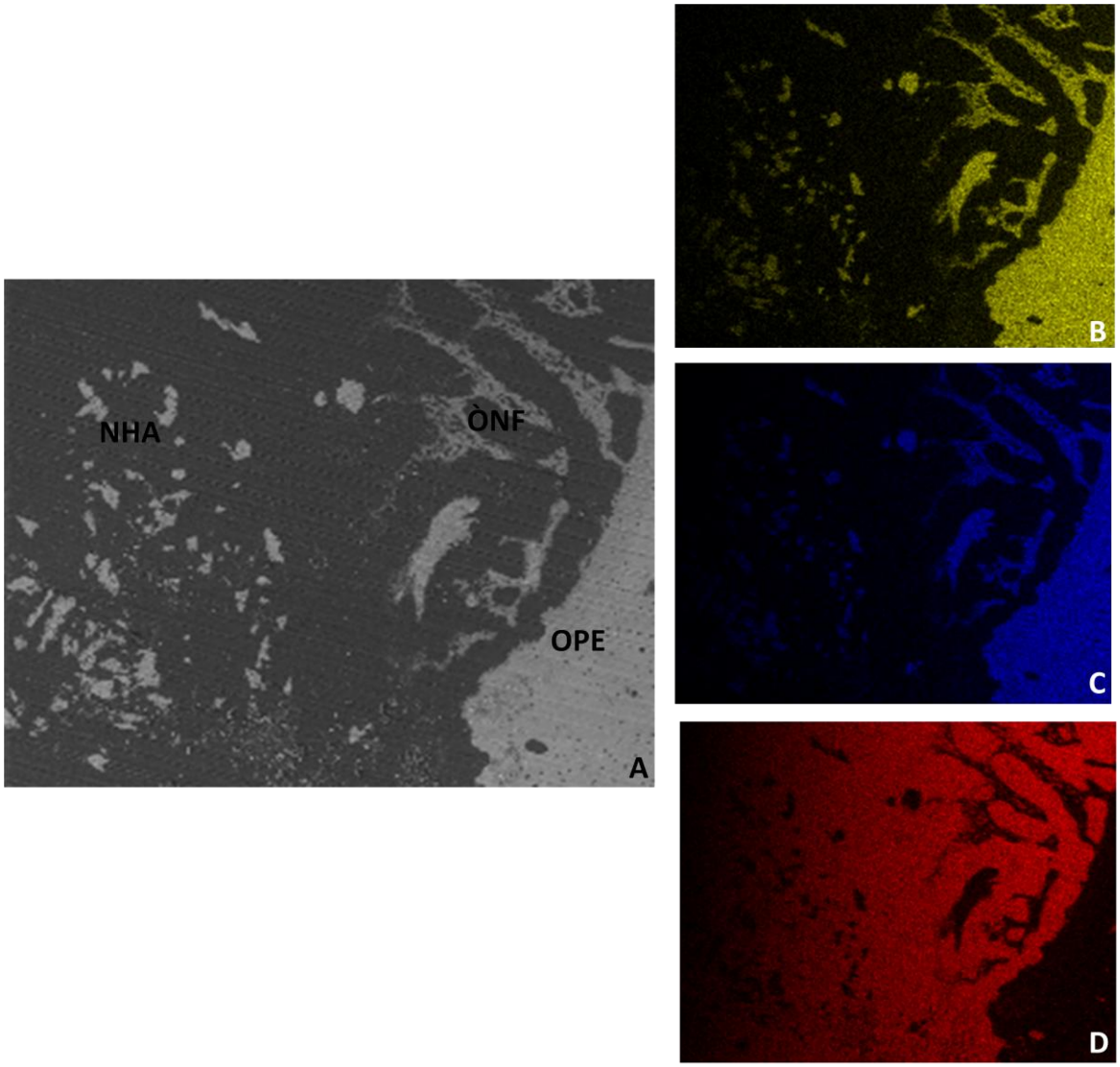


Figura 26. Micrografia (BEI-SEM e EDS-SEM) do grupo NanoHA Não-Sinterizada 7 dias. A. BEI-SEM mostra a fragmentação das esferas de nanohidroxiapatita (NHA) e o crescimento centrípeto de osso neoformado (ONF), partindo do osso nativo (OPE) em direção ao nanomaterial biodegradado. Mapeamento Elemental através de EDS-SEM, indicando em: B. Presença de Ca; C. Presença de P; e D. Presença de O.

- **NanoHA Não- Sinterizada – 28 dias**

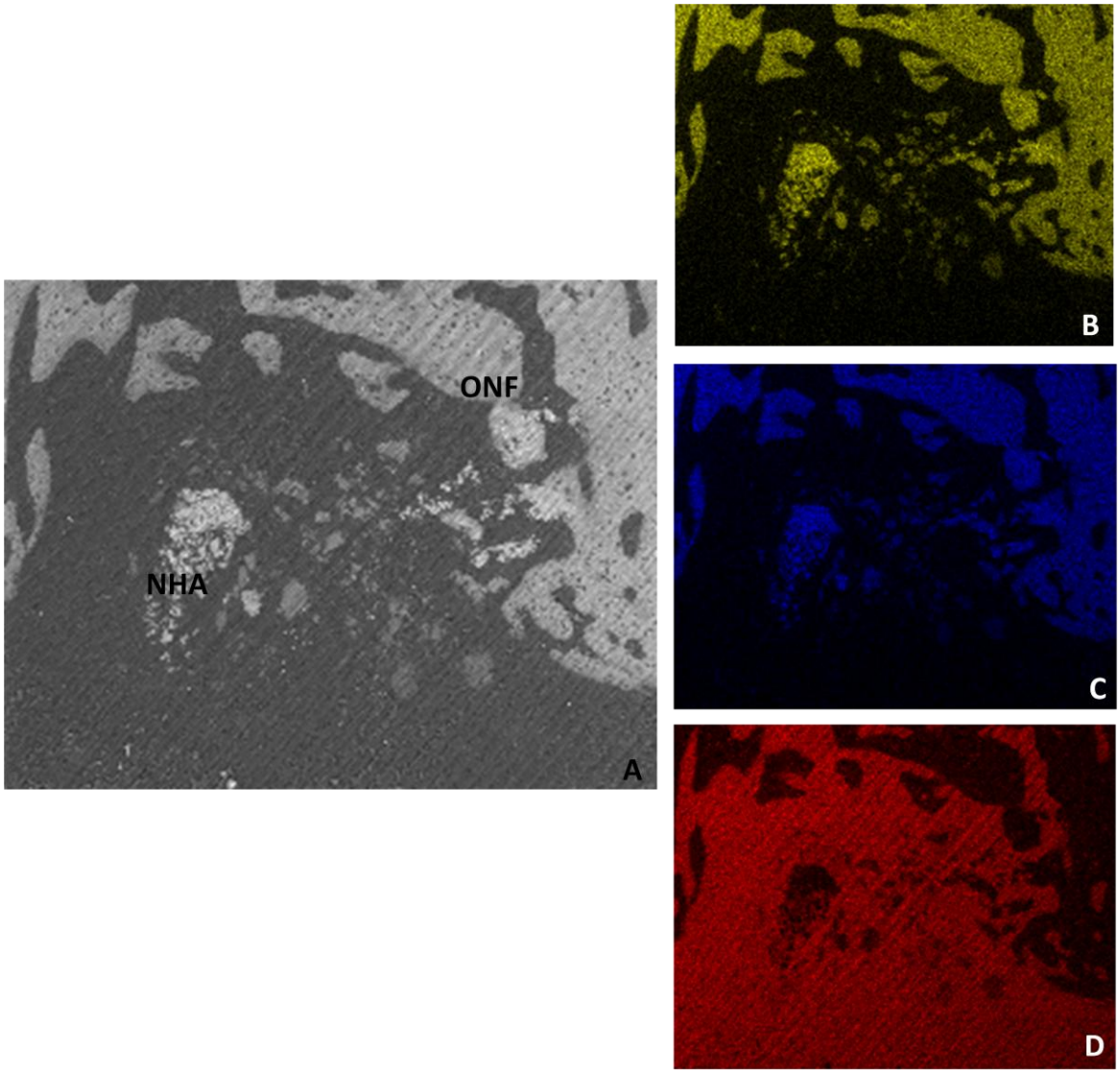


Figura 27. Micrografia (BEI-SEM e EDS-SEM) do grupo NanoHA Não-Sinterizada 28 dias. A. BEI-SEM mostra presença de osso neoformado (ONF) permeando as esferas de nanohidroxiapatita (HA) biodegradadas, com tons mais claros – nota-se o contato justaposto na interface osso-biomaterial, indicando osteocondução e biocompatibilidade. Mapeamento Elemental através de EDS-SEM, indicando em: B. Presença de Ca; C. Presença de P; e D. Presença de O.

6.1.2.2 Análise por Microfluorescência de Raios X com Radiação Síncrotron (µXRF-SR)

Esta técnica permitiu acompanhar, em tempo real, a imagem da amostra sendo analisada durante todo o processo, com centenas de pontos inspecionados por região delimitada. Em todos os períodos foram detectadas intensidades de cálcio para as esferas de HA e NanoHA e intensidade de zinco mais predominante aos 28 dias. A intensidade de cálcio é menor nas áreas de osso neoformado aos 7 dias, em relação à área correspondente ao osso pré-existente. Aos 28 dias o osso neoformado mostrou uma alta intensidade de cálcio e aumento da intensidade do zinco (Figuras 28 a 35). É possível observar a neoformação óssea de maneira centrípeta, em direção às microesferas enxertadas, permeando e envolvendo os biomateriais. A figura 34 mostra espectros de µXRF-SR característicos de osso cortical da tíbia do coelho, HA sinterizada e nanoHA não-sinterizada. Os maiores picos de µXRF-SR foram espectros de Ca, indicados na imagem, entretanto outros picos foram evidentes e corresponderam aos elementos P, Fe, Cu, Zn, As e Sr. A presença de P, Zn e Sr tem relação com a formação de tecido ósseo, porém é possível observar a presença de As no espectro do osso, fato um tanto quanto incomum.

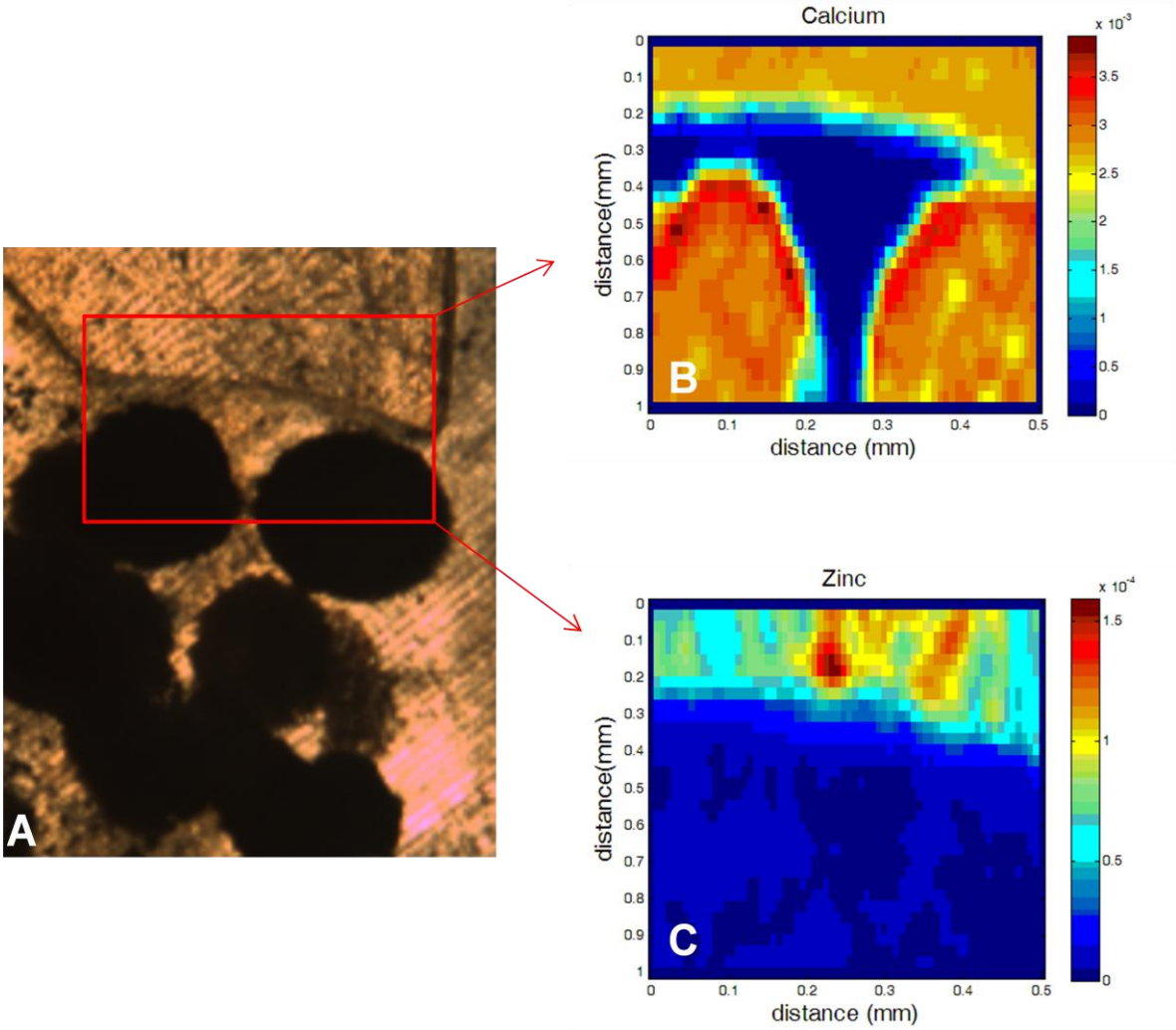


Figura 28. A. Imagem de HA Sinterizada após 7 dias de implantação durante a análise de µXRF-SR; B. Imagem do espectro de intensidade para o cálcio; e C. Imagem do espectro de intensidade para o Zinco.

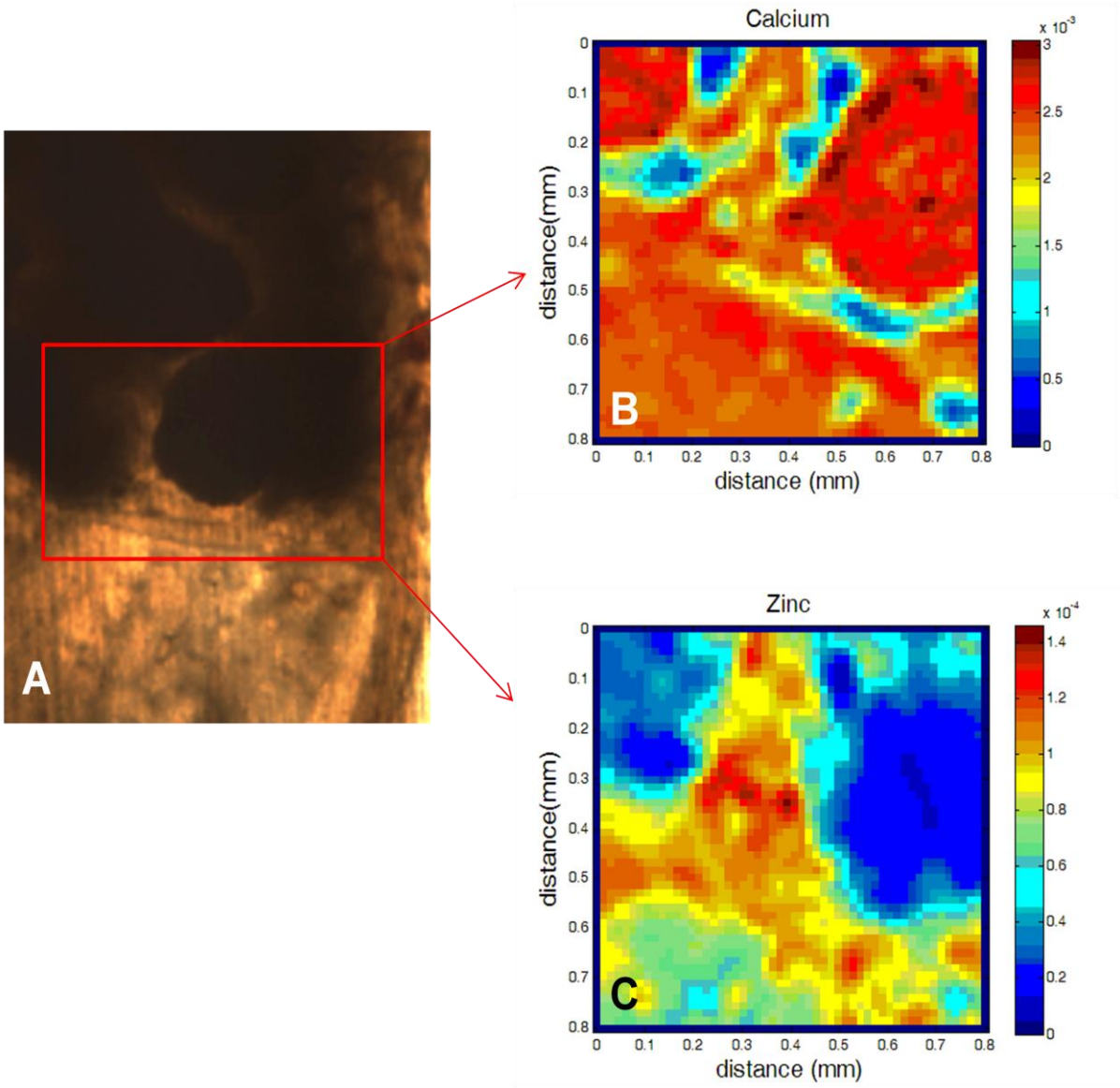


Figura 29. A. Imagem de HA Sinterizada após 28 dias de implantação durante a análise de µXRF-SR; B. Imagem do espectro de intensidade para o cálcio; e C. Imagem do espectro de intensidade para o Zinco.

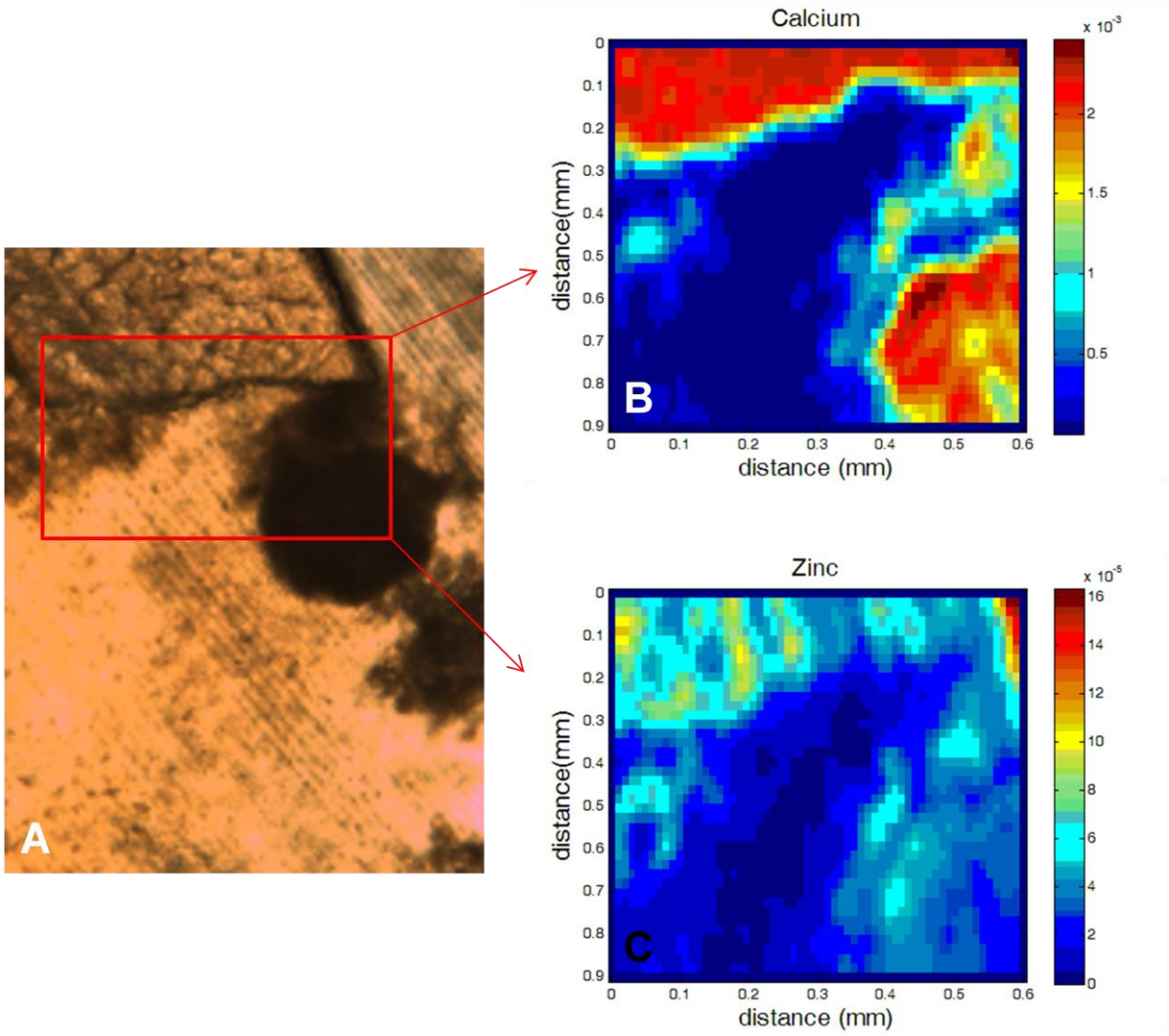


Figura 30. A. Imagem de HA Não-Sinterizada após 7 dias de implantação durante a análise de µXRF-SR; B. Imagem do espectro de intensidade para o cálcio; e C. Imagem do espectro de intensidade para o Zinco.

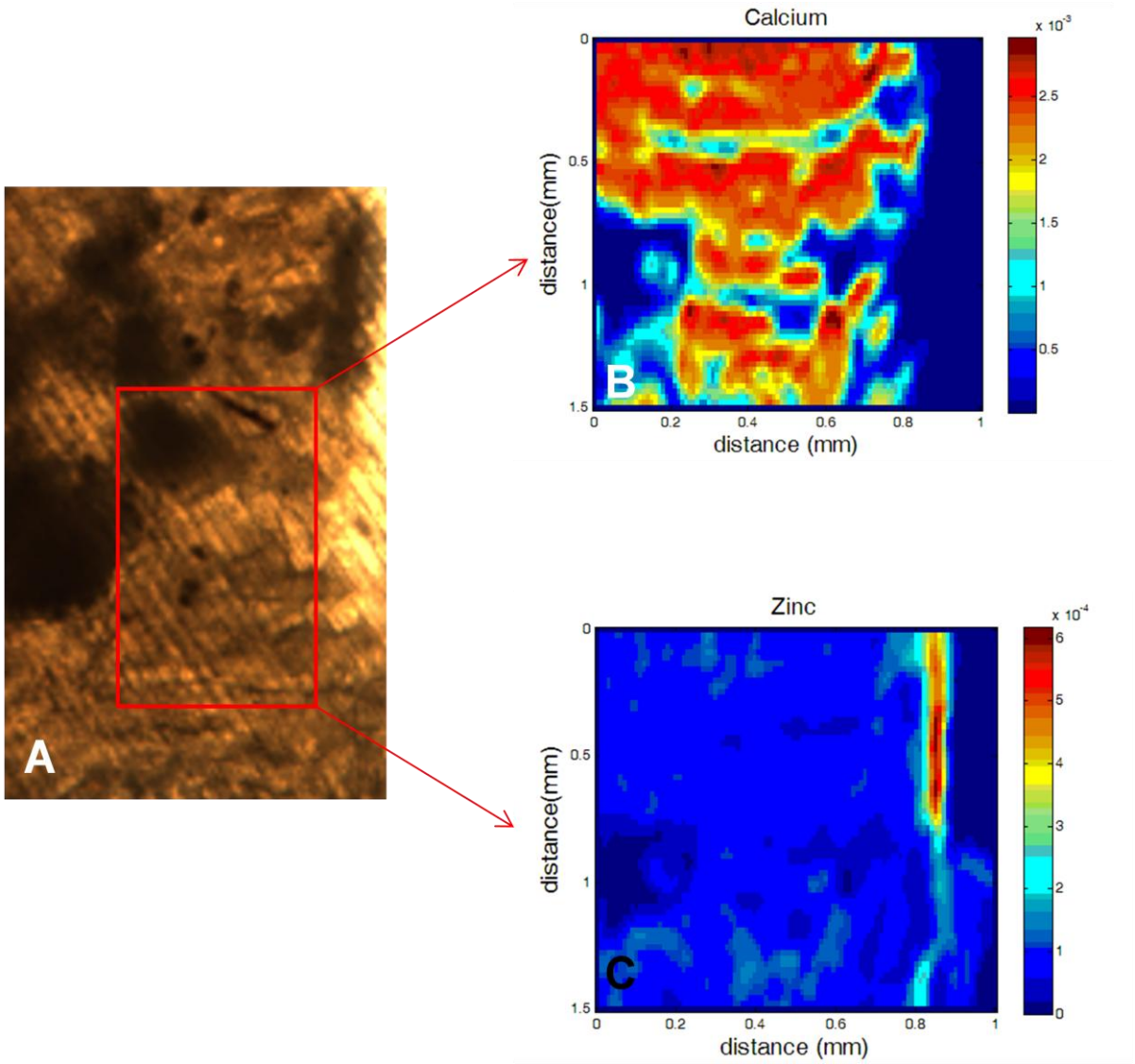


Figura 31. A. Imagem de HA Não-Sinterizada após 28 dias de implantação durante a análise de µXRF-SR; B. Imagem do espectro de intensidade para o cálcio; e C. Imagem do espectro de intensidade para o Zinco.

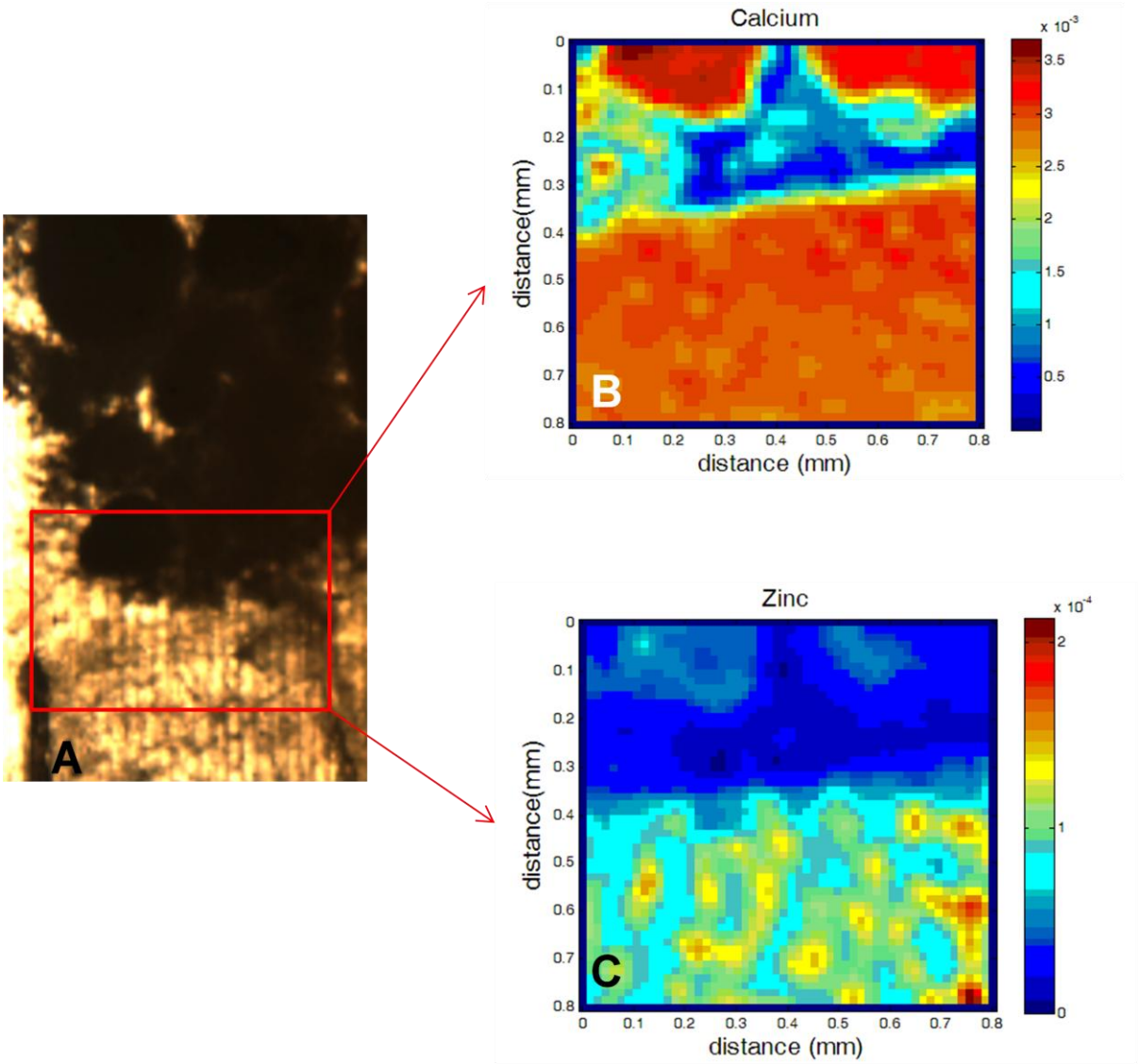


Figura 32. A. Imagem de NanoHA Sinterizada após 7 dias de implantação durante a análise de µXRF-SR; B. Imagem do espectro de intensidade para o cálcio; e C. Imagem do espectro de intensidade para o Zinco.

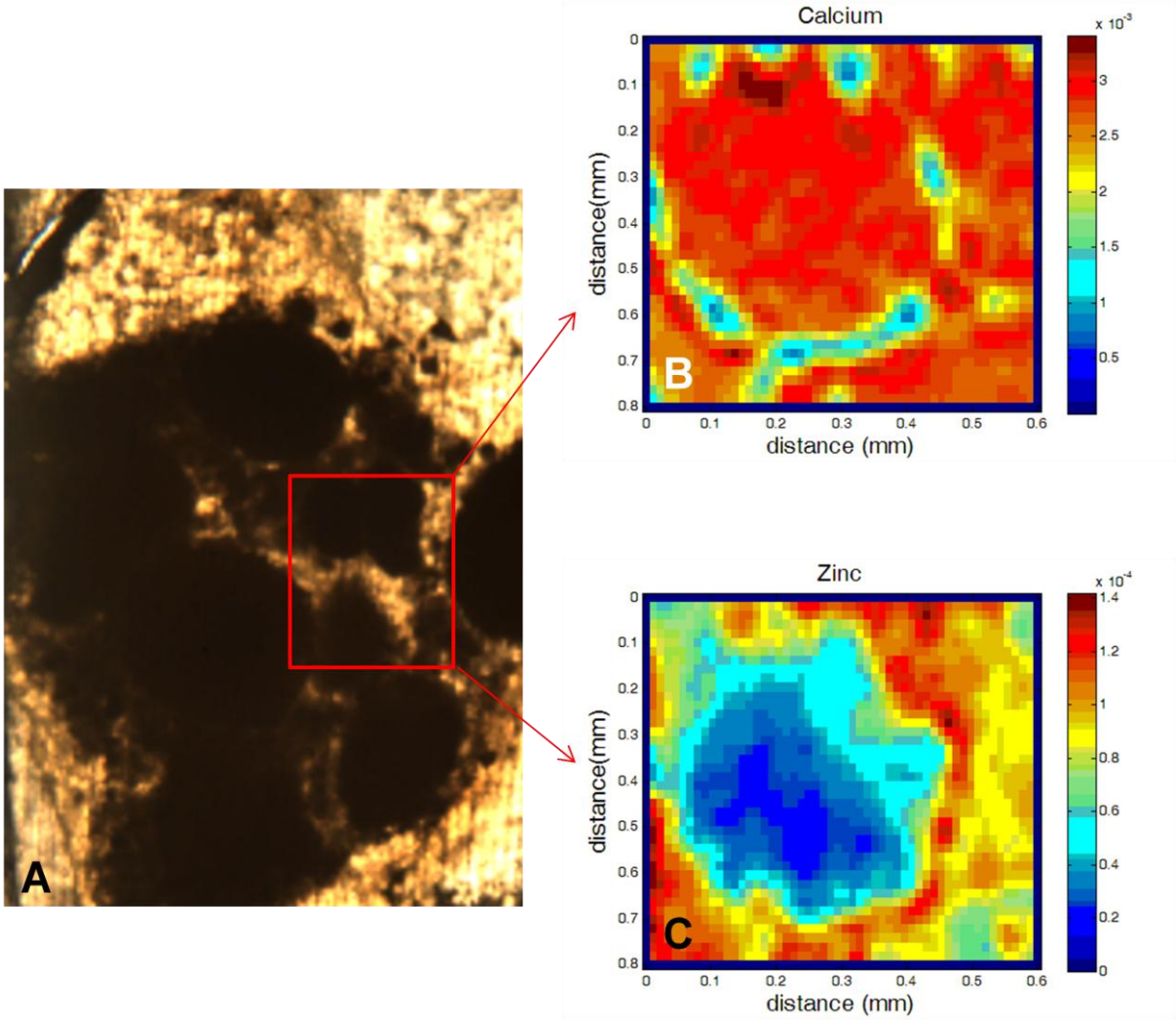


Figura 33. A. Imagem de NanoHA Sinterizada após 28 dias de implantação durante a análise de µXRF-SR; B. Imagem do espectro de intensidade para o cálcio; e C. Imagem do espectro de intensidade para o Zinco.

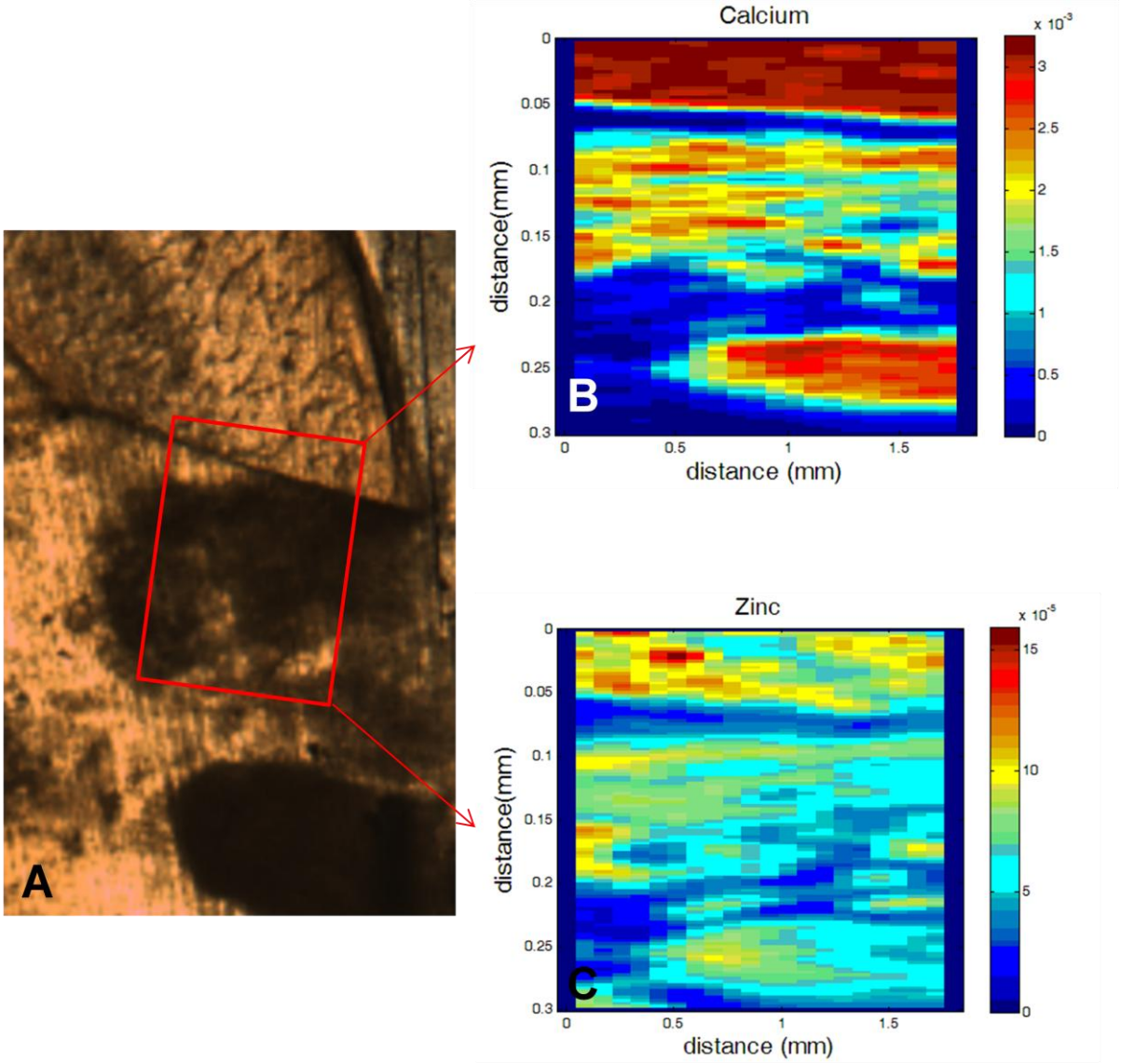


Figura 34. A. Imagem de NanoHA Não-Sinterizada após 7 dias de implantação durante a análise de µXRF-SR; B. Imagem do espectro de intensidade para o cálcio; e C. Imagem do espectro de intensidade para o Zinco.

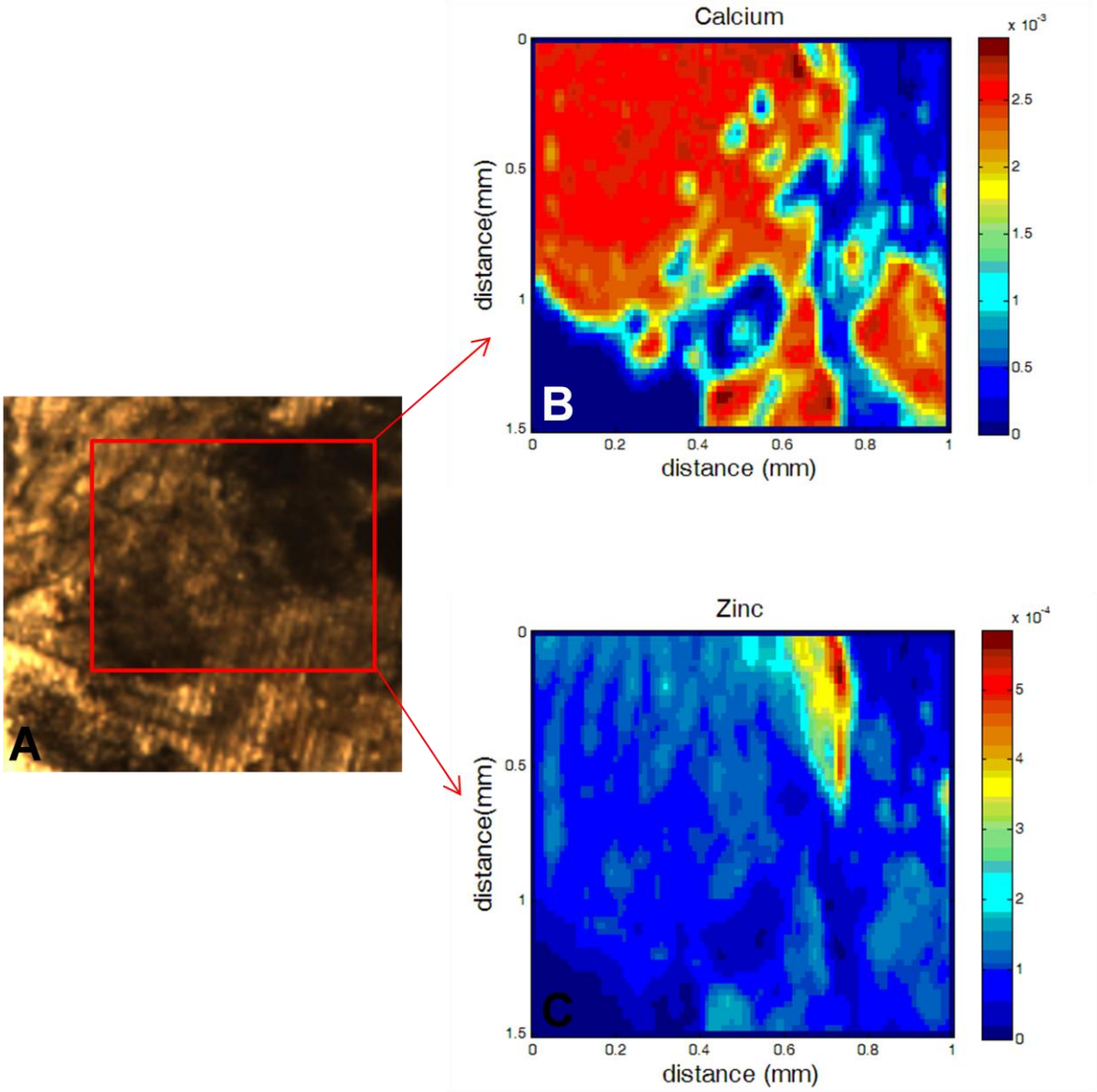


Figura 35. A. Imagem de NanoHA Não-Sinterizada após 28 dias de implantação durante a análise de µXRF-SR; B. Imagem do espectro de intensidade para o cálcio; e C. Imagem do espectro de intensidade para o Zinco.

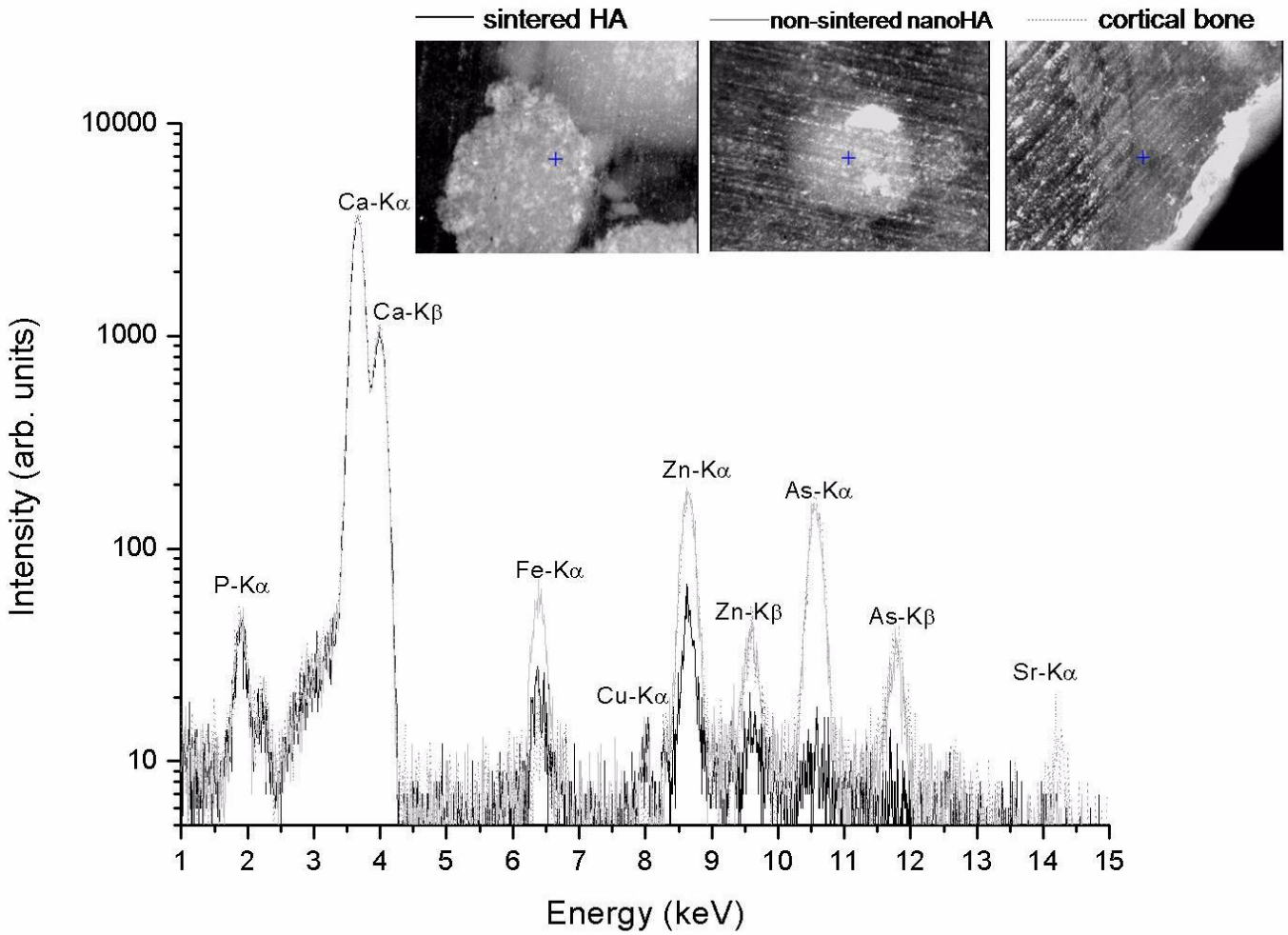


Figura 36. Espectros de μXRF-SR característicos de osso cortical da tíbia dos animais, HA sinterizada e NanoHA não-sinterizada. Os maiores picos do espectro de μXRF-SR para Ca estão indicados, bem como os menores picos de P, Fe, Cu, Zn, As e Sr.

6.2 O COELHO COMO MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL

Os animais toleraram satisfatoriamente os procedimentos anestésicos, pré e pós-cirúrgicos, não havendo complicações ou percalços. Os biomateriais foram conduzidos aos leitos cirúrgicos deforma adequada, onde foi notado que as nanoHAs apresentaram maior facilidade de acomodação. Tivemos o óbito de um coelho do grupo de 28 dias, que morreu aos 13 dias depois dos procedimentos cirúrgicos, devido à septicemia. Após os períodos experimentais, os animais foram eutanasiados e notou-se clinicamente a ausência de esferas residuais nas perfurações preenchidas com os materiais não-sinterizados e, em alguns animais, formação completa de tecido ósseo nestes locais, aos 28 dias.

6.3 MICROSCOPIA DE LUZ EM CAMPO CLARO E LUZ POLARIZADA

As amostras não-desmineralizadas foram avaliadas através da microscopia de luz em campo claro e da microscopia de polarização com e sem compensador. Podemos observar que houve crescente formação de tecido mineralizado de 7 até 28 dias, em todos os grupos pela orientação das fibras colágenas. Os materiais sinterizados apresentaram pequena biodegradação em relação aos não-sinterizados e, consequentemente, resultaram em pouca formação de tecido ósseo – grupos 2 e 4. Os grupos 3 e 5 (HA e NanoHA não-sinterizadas), respectivamente, mostraram-se mais solúveis no meio biológico, fato que evidenciou maior quantidade de tecido ósseo neoformado. Os grupos controle foram os que mostraram maior quantidade de tecido ósseo.

A microscopia com luz polarizada com compensador é indicada para analisar os eixos cristalográficos da hidroxiapatita. Observamos nessa técnica a presença de osso neoformado sobretudo nos grupos de HA e NanoHA, ambos não-sinterizados, em todos os períodos estudados e sempre na direção osso pré-existente/microesferas de forma centrípeta, além da presença de diferentes direções das fibras colágenas como mostrado nas figuras 37A, 39A e 43A. Nos grupos com materiais sinterizados, as esferas mantiveram seu formato, mesmo aos 28 dias, não favorecendo sua biodegradação (Figuras 40 e 44). Entretanto houve formação de

tecido ósseo permeando as microesferas, sejam elas biodegradadas em maior grau, como nos grupos 3 e 5, ou em menor intensidade, como nos grupos 2 e 4, o que denota osteocondução.

A microscopia de polarização é indicada para observação de estruturas birrefringentes (estruturas anisotrópicas como o osso). Quando a luz penetra no osso produz um tipo de vibração luminosa que passará, ficando brilhante, enquanto o restante do material (resina e tecido conjuntivo) permanece escuro. Observamos pequena quantidade de cristais organizados no período de 7 dias, aumentando aos 28 dias. Nota-se que a birrefringência do osso neoformado é similar à do osso pré-existente, em todos os grupos estudados.

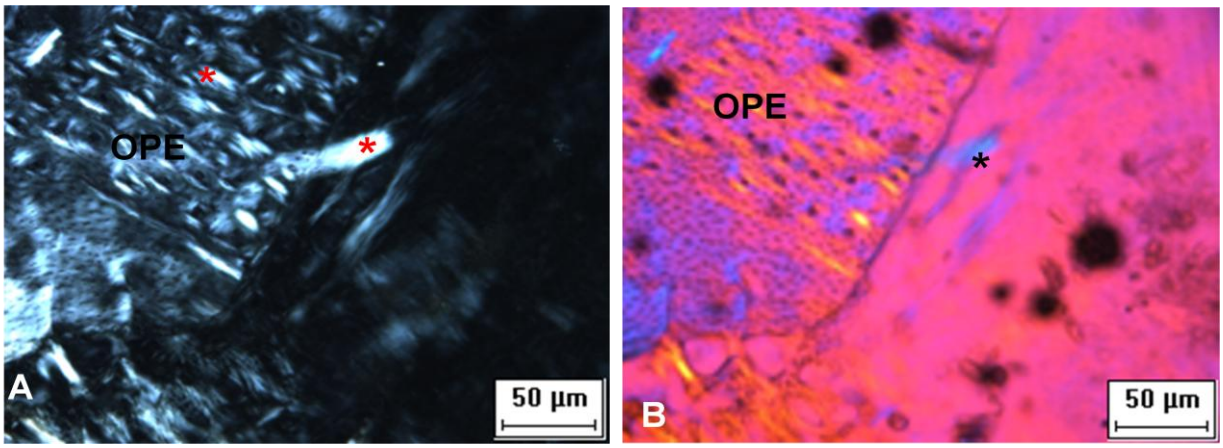


Figura 37. Fotomicrografias do grupo controle (G1 7 dias) sem material implantado. Imagens de microscopia de luz polarizada (A) e luz polarizada com compensador (B), que mostram a orientação dos cristais (*), indicando início de formação óssea centrípeta a partir das corticais (OPE). (Objetiva 10X).

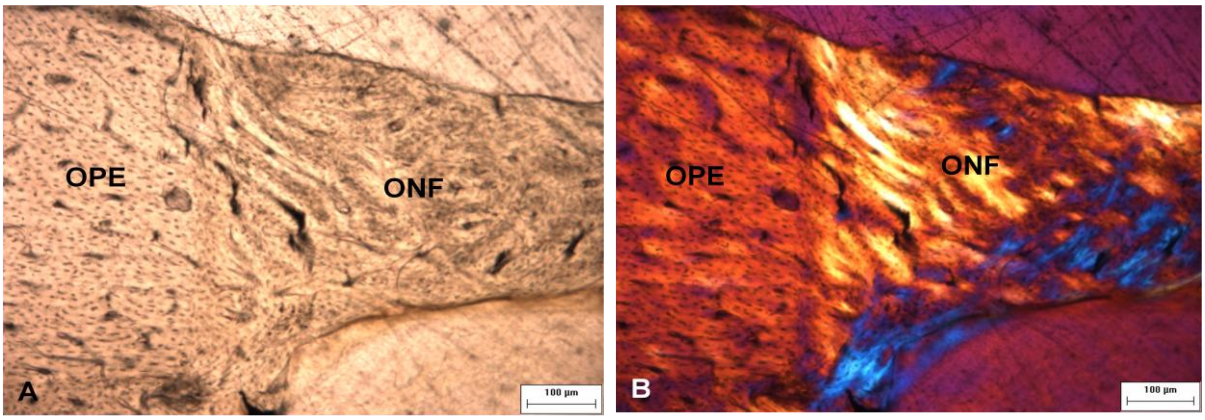


Figura 38. Fotomicrografias do grupo controle (G1 28 dias) sem material implantado. Imagens de microscopia em campo claro (A) e luz polarizada com compensador (B) mostram completa mineralização ocluindo o defeito com osso neoformado reticular (ONF) similar ao osso pré-existente (OPE). (Objetiva 10X).

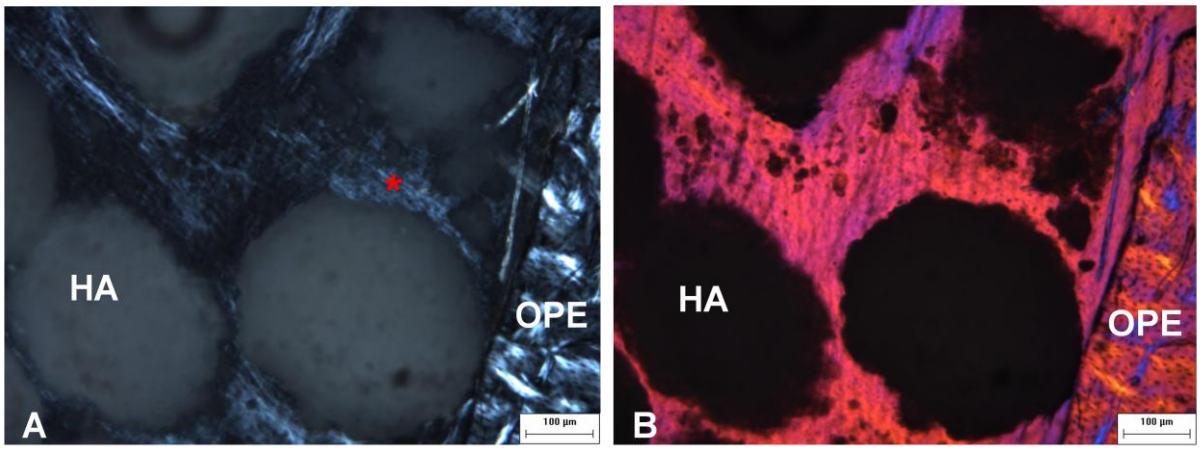


Figura 39. Fotomicrografias do grupo HA Sinterizada – G2 7 dias. Imagens de microscopia em luz polarizada (A) e luz polarizada com compensador (B) mostram início de organização dos cristais (*) entre as esferas de hidroxiapatita (HA) preservadas, partindo do osso pre-existente. (Objetiva 10X).

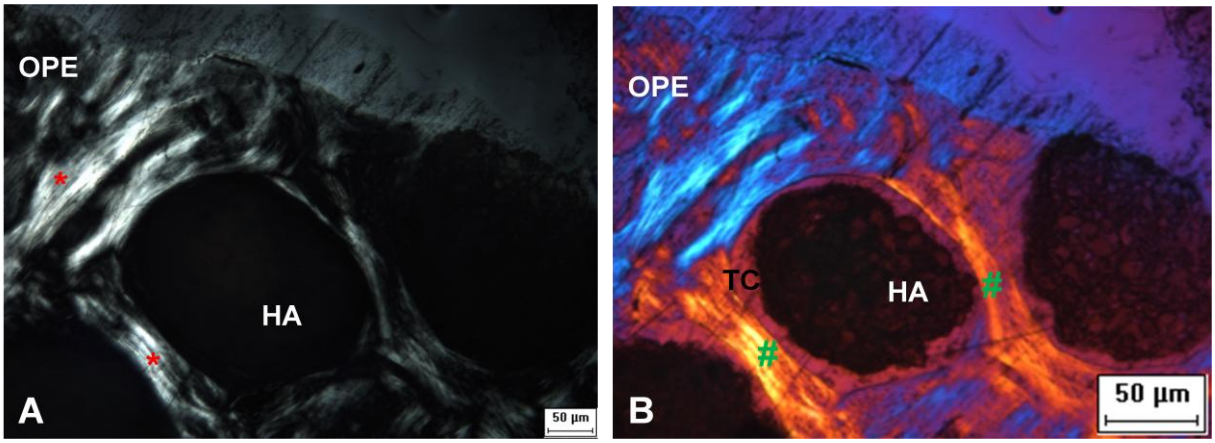


Figura 40. Fotomicrografias do grupo HA Sinterizada – G2 28 dias. A. Imagem de microscopia em luz polarizada evidenciando a birrefringência do osso neoformado, similar ao osso nativo (OPE). B. Imagem de microscopia em luz polarizada com compensador mostra a formação de tecido ósseo (#) permeando as microesferas (HA) pouco degradadas na superfície, circundadas por tecido conjuntivo (TC). (Objetiva 10X).

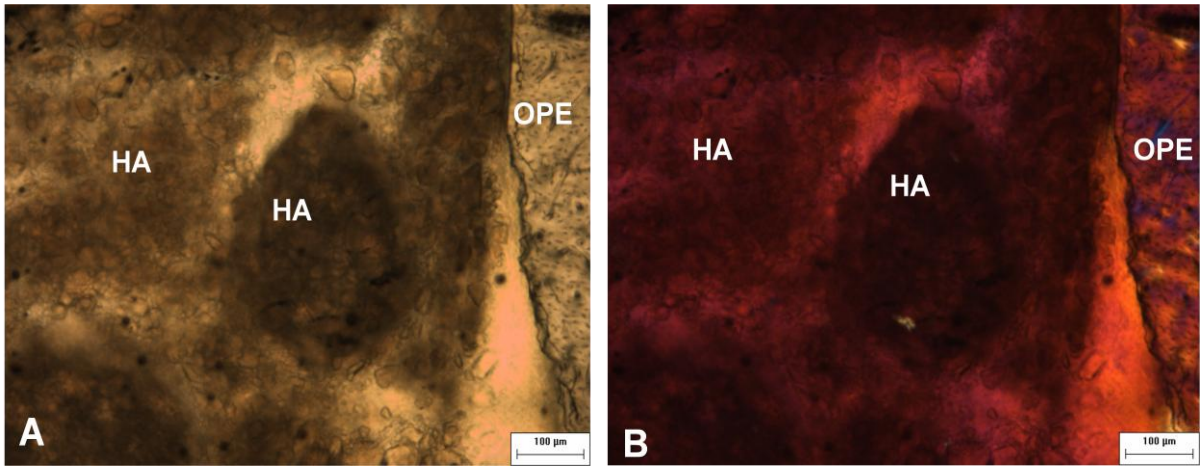


Figura 41. Fotomicrografias do grupo HA Não-Sinterizada – G3 7 dias. A. Imagem de microscopia em campo claro mostra o biomaterial (HA) parcialmente fragmentado em grande parte do defeito, a partir da cortical do osso pré-existente (OPE). B. Imagem de microscopia em luz polarizada com compensador revela pequena degradação das esferas (HA). (Objetiva 10X).

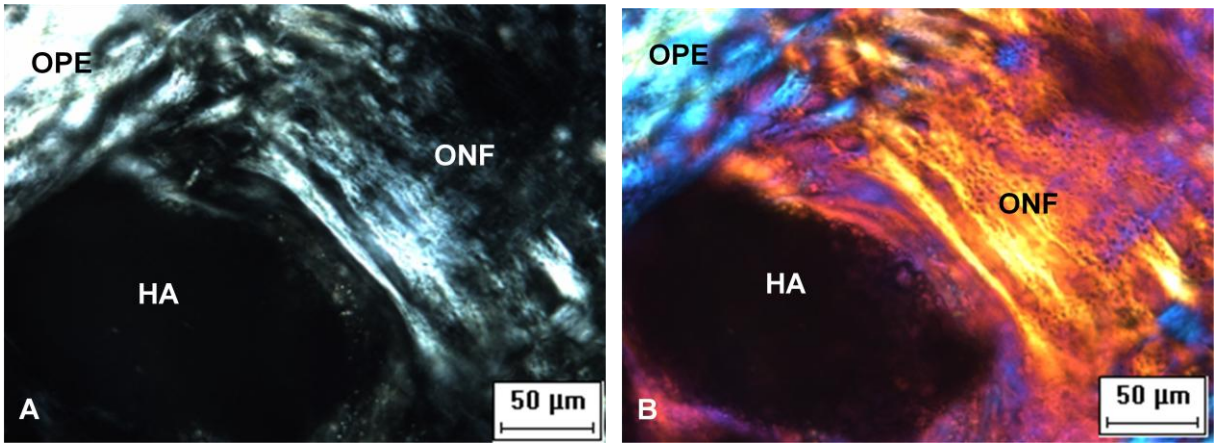


Figura 42. Fotomicrografias do grupo HA Não-Sinterizada – G3 28 dias. Imagens de microscopia em luz polarizada (A) e luz polarizada com compensador (B) mostram formação óssea ocluindo o defeito. Maior parte das microesferas foi degradada (HA) dando lugar ao osso neoformado (ONF), este com birrefringência semelhante ao osso pré-existente (OPE), indicando osteocondução. (Objetiva 10X).

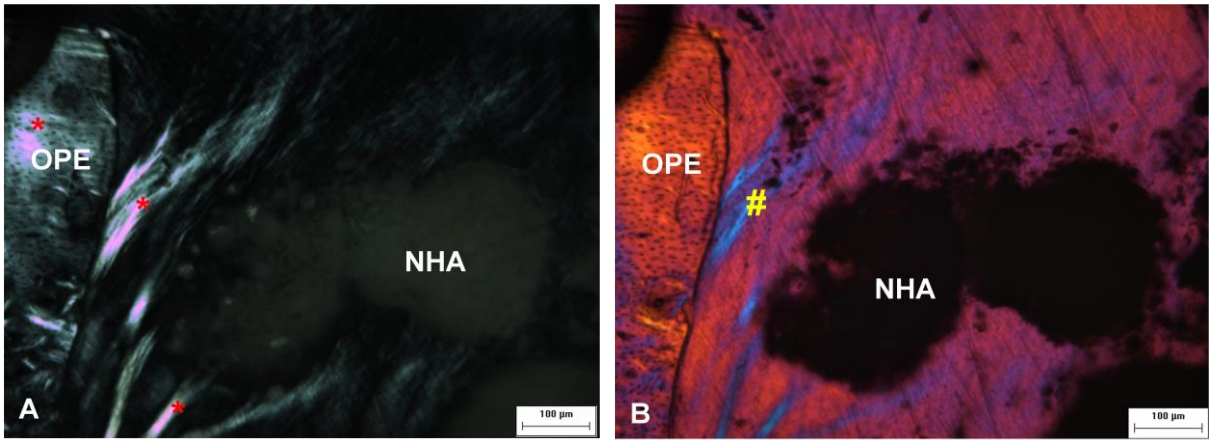


Figura 43. Fotomicrografias do grupo NanoHA Sinterizada – G4 7 dias. Imagens de microscopia em luz polarizada (A) e luz polarizada com compensador (B) mostrando início de organização dos cristais (#) de forma centrípeta a partir do osso pré-existente (OPE), evidenciando a birrefringência (*) semelhante. Esferas de nanoHA (NHA) preservadas, mas as fibras se dirigem a elas, sugerindo osteocondução. (Objetiva 10X).

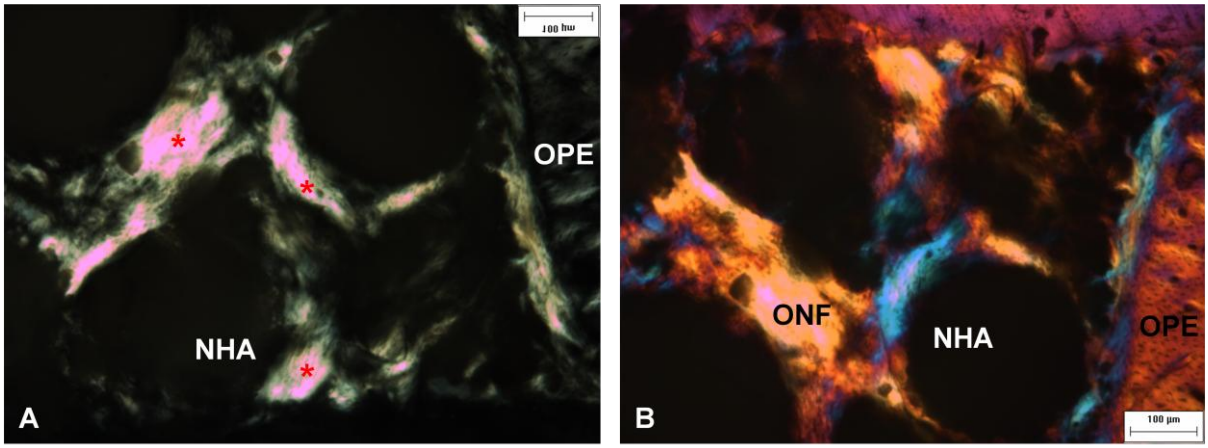


Figura 44. Fotomicrografias do grupo NanoHA Sinterizada – G4 28 dias. A. Imagem de microscopia em luz polarizada mostra a birrefringência (*) do osso neoformado, indicando sua mineralizaçao entre as esferas (NHA) ainda preservadas neste período, similar ao osso pré-existente (OPE). B. Imagem de microscopia em luz polarizada com compensador evidencia a formação de novo osso (ONF) permeando as esferas remanescentes (NHA) em íntimo contato, sugerindo osteocondução. (Objetiva 10X).

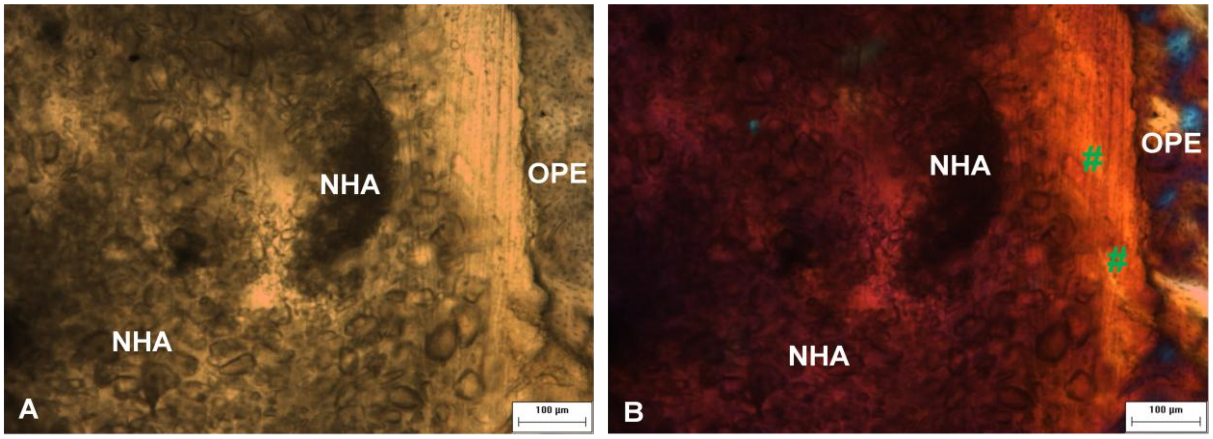


Figura 45. Fotomicrografias do grupos NanoHA Não-Sinterizada – G5 7 dias. A. Imagem de microscopia em campo claro mostra as esferas (NHA) multifragmentadas na região do defeito, próximo ao osso pré-existente (OPE). B. Imagem de microscopia em luz polarizada com compensador evidencia início de formação óssea (#) a partir da cortical (OPE), em direção ao biomaterial (NHA) fragmentado. (Objetiva 10X).

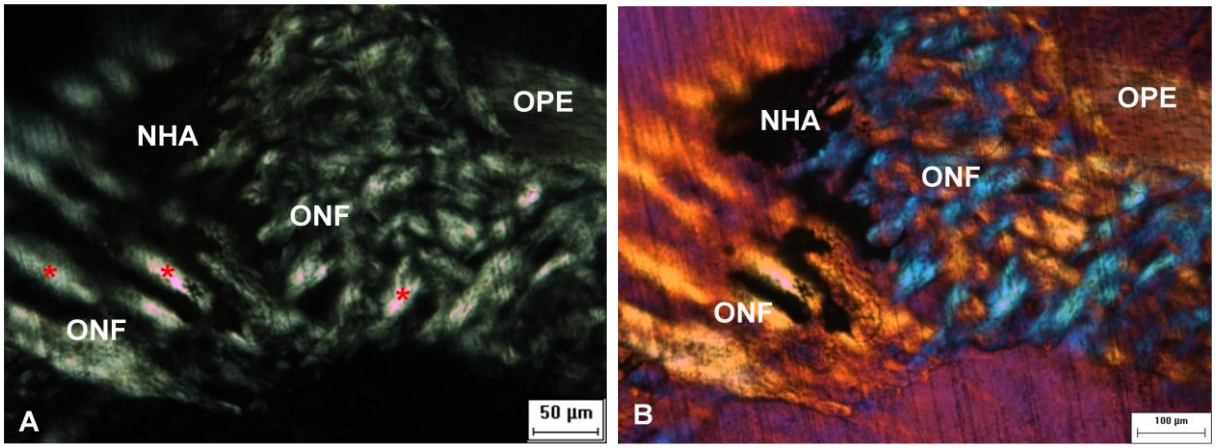


Figura 46. Fotomicrografias do grupo NanoHA Não-Sinterizada – G5 28 dias. A. Imagem de microscopia em luz polarizada mostra a birrefringência (*) do osso neoformado similar ao osso pré-existente (OPE), indicando sua mineralizaçao entre as esferas remanescentes fragmentadas (NHA). B. Imagem de microscopia em luz polarizada com compensador evidencia a formação de novo osso (ONF) ocluindo o defeito entre as corticais (OPE). Há presença de pouco remanescente do biomaterial (NHA), biodegradado em grande parte do defeito e substituído por osso neoformado (ONF). (Objetiva 10X).

6.4 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

A análise histomorfométrica foi realizada com o auxílio do programa Image Pro Plus®, no qual foi realizada a segmentação das imagens para obtenção do percentual de osso neoformado e tecido conjuntivo. As médias e desvios padrão obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA com pós-teste de Tukey (se $p<0,05$). Foram utilizados os programas GraphPad InStat versão 3.01 (GraphPad Software, San Diego, California, EUA) e GraphPad Prism versão 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, EUA).

Os resultados revelaram que a densidade por área de osso neoformado foi crescente do 1º ao 2º período experimental (7 aos 28 dias), com diferença estatística entre os períodos, nos grupos G1 e G3 ($p<0,001$) e G2 e G5 ($p<0,01$), exceto no grupo G4, sem diferença estatística. O grupo controle (G1) teve porcentagem de formação óssea maior do que todos os outros grupos no período de 7 dias, sendo estatisticamente significativo: G1 – G2, G3, G4 e G ($p<0,001$). Neste mesmo período, foi encontrado resultado significante entre G4-G5 ($p<0,01$). Aos 28 dias, encontrou-se diferença estatística entre o grupo controle e os demais grupos enxertados: G1 – G2 e G4 ($p<0,001$) e G1 – G3 e G5 ($p<0,01$). Entre os grupos G2-G4 ($p<0,05$). Diferenças também foram notadas entre os grupos G3-G4 e os grupos G4-G5 ($p<0,001$). Observou-se que os grupos com materiais não-sinterizados tiveram uma porcentagem de formação de tecido mineralizado acentuada em relação aos materiais sinterizados, ainda que significativamente aquém do grupo controle (Figura 47).

Ao contrário do tecido ósseo neoformado, a formação de tecido conjuntivo foi ligeiramente decrescente dos 7 aos 28 dias, exceto em relação ao grupo G2, porém sem diferença estatística entre os períodos. Aos 7 dias, a densidade por área de tecido conjuntivo foi estatisticamente significante em relação aos grupos G1-G2 ($p<0,05$), G1-G4 ($p<0,01$) e aos grupos G2-G3 e G3-G4 ($p<0,01$). Aos 28 dias, a porcentagem deste tecido entre os grupos G2-G4, G3-G4 e G4-G5 teve significância estatística ($p<0,05$) (Figura 48).

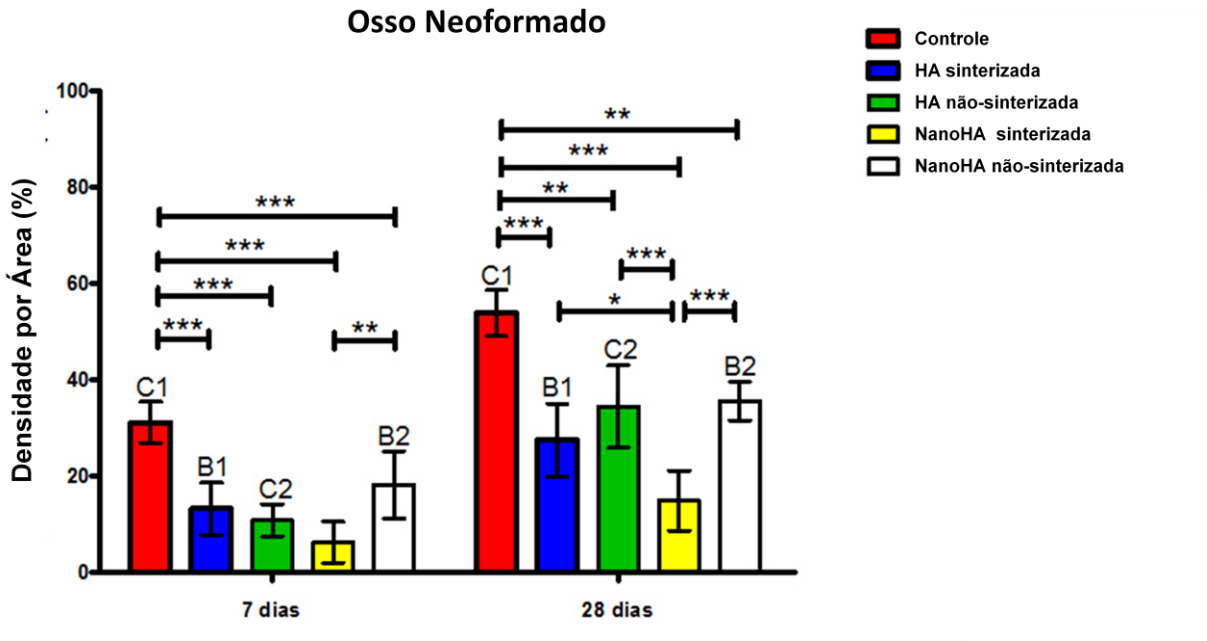


Figura 47. Densidade por área de tecido ósseo neoformado nos dois períodos experimentais. * corresponde ao valor de p<0,05; ** é o valor de p<0,01; e *** para p<0,001 – diferenças estatisticamente significativas (ANOVA e pós-teste de Tukey, para p<0,05). As barras indicam o desvio padrão.

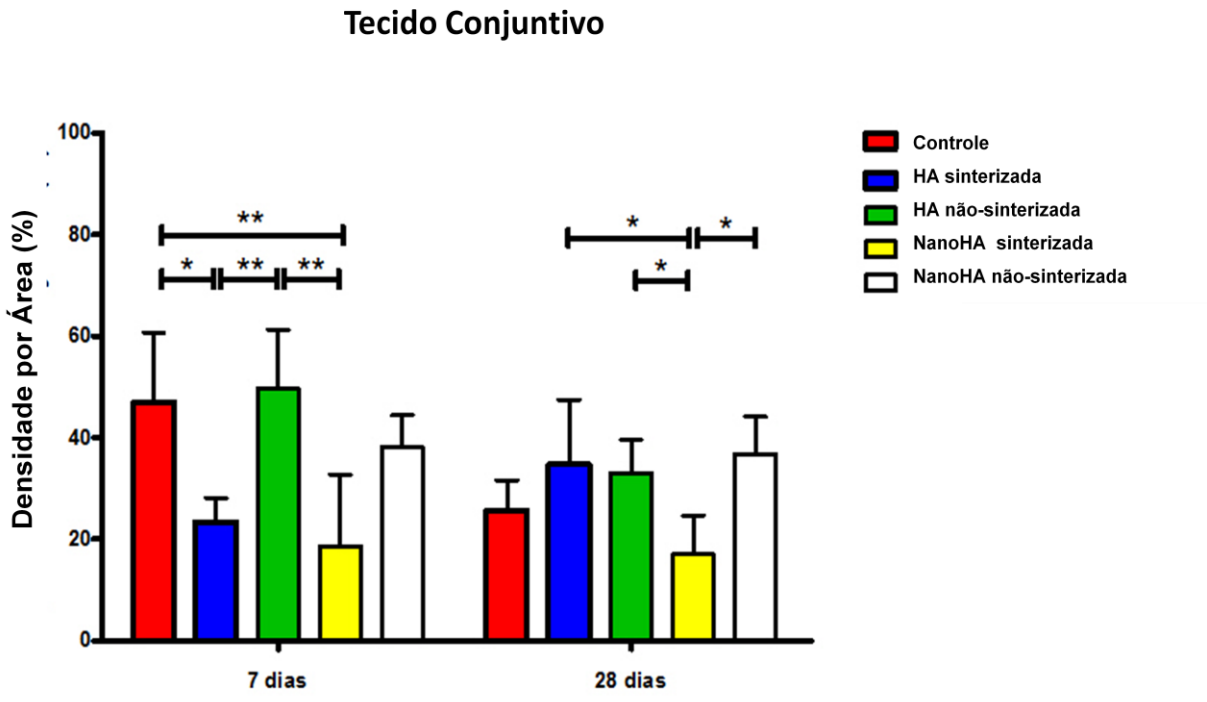


Figura 48. Densidade por área de tecido conjuntivo nos dois períodos experimentais. * corresponde ao valor de p<0,05; e ** é o valor de p<0,01 – diferenças estatisticamente significativas (ANOVA e pós-teste de Tukey, para p<0,05). As barras indicam o desvio padrão.

7. DISCUSSÃO

Com os avanços da bioengenharia, o tratamento de defeitos ósseos tem melhorado através de pesquisas experimentais *in vitro* e *in vivo* utilizando avaliações mais refinadas do comportamento dos biomateriais desenvolvidos. Neste estudo, fizemos a avaliação *in vitro* das propriedades físicas e químicas de quatro biomateriais sintéticos à base de hidroxiapatita (HA), bem como seu desempenho *in vivo* em perfurações circulares de tíbias de coelhos, em períodos experimentais distintos de 7 e 28 dias após a implantação.

Atualmente a hidroxiapatita é o biomaterial cerâmico à base de fosfato de cálcio mais estudado em pesquisas experimentais, e a mais utilizada para aplicações clínicas como substitutos ósseos. Tal fato se deve, entre outros fatores, principalmente por apresentarem ausência de toxicidade local ou sistêmica, ausência de respostas a corpo estranho ou inflamações, e aparente habilidade em se ligar ao tecido hospedeiro (KAWACHI *et al.*, 2000). Por ter características biocompatíveis, osteocondutoras e serem físico-quimicamente versáteis, sua utilização na cirurgia ortopédica reconstrutora é bem heterogêneo, sendo blocos, cimentos, grânulos, microesferas e recobrimentos de superfície as formas disponíveis mais comuns (KAWACHI *et al.*, 2000; LILJENSTEN *et al.*, 2003; BIGI *et al.*, 2005; MITRI *et al.*, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2006; CALASANS-MAIA *et al.*, 2008).

Novas tecnologias e o desenvolvimento científico da bioengenharia de tecidos e a ciência dos materiais favorecem o aperfeiçoamento de métodos de síntese e o surgimento de novos biomateriais, que necessitam ser exaustivamente avaliados

através de estudos *in vitro* e pesquisas experimentais pré-clínicas *in vivo*, antes da sua aplicação em humanos. A escolha do modelo animal ideal é fundamental para a adequada avaliação do material a ser estudado, pois quanto maior a semelhança das características fisiológicas, anatômicas e orgânicas com o ser humano, maior a aplicabilidade das conclusões obtidas (SCHANAIDER & SILVA, 2004).

Os materiais foram sintetizados em pH elevado - > 10 (OLIVEIRA *et al.*, 2003; NARAYAN *et al.*, 2004; KUMTA *et al.*, 2005), com a mistura feita sob aquecimento e agitação para a hidroxiapatita de cálcio a 90° C (SUVOROVA & BUFFAT, 1999; MAVROPOULOS *et al.*, 2002; ARAÚJO *et al.*, 2005; PEZZATINI *et al.*, 2006), apesar de outros estudos mencionarem o método hidrotérmico a 200° C (XIAO *et al.*, 2008). A síntese da hidroxiapatita nanocristalina ocorreu em baixa temperatura, apesar do pH elevado, configurando cristais de apatita menores e menos densas (BARRALET *et al.*, 2004), diferentemente de algumas metodologias que procederam a mistura em temperatura ambiente ou sob aquecimento (LILLEY *et al.*, 2005; PEZZATINI *et al.*, 2006; BALASUNDARAM *et al.*, 2006; NAYAR *et al.*, 2006; SATO *et al.*, 2006; ZHU *et al.*, 2006; WANG & SHAW, 2009; ZHANG *et al.*, 2009). Com o método de gotejamento, conseguimos definir a forma de esferas de tamanho micrométrico, onde partículas menores facilitam a manipulação e acomodação no leito cirúrgico, também de acordo com LILJENSTEN *et al.*, em 2003.

Para assegurar uma melhor resistência mecânica e organizar a rede cristalina dos materiais, o tratamento térmico dos precipitados secos é essencial. Neste estudo, os materiais sofreram processos de aquecimento distintos, onde uma parte foi calcinada sob temperaturas graduais não excedendo os 800° C, concordando com alguns relatos (RAGEL *et al.*, 2002; WANG & SHAW, 2009; ZHANG *et al.*, 2009), e a outra foi submetida à sinterização, onde a temperatura variou de 1000° C a 1200° C (DACULSI & LEGEROS, 1996; OONISH *et al.*, 1999; OONISH *et al.*, 2000; REDEY *et al.*, 2000; CHERN LIN *et al.*, 2001; TONG *et al.*, 2001; RAGEL *et al.*, 2002; BLOEMERS *et al.*, 2003; LU *et al.*, 2004; KUMTA *et al.*, 2005; MASTROGIACOMO *et al.*,2006; NAYAR *et al.*, 2006; SATO *et al.*, 2006; WANG & SHAW, 2009; ZHANG *et al.*, 2009; DOROZHKIN, 2010). Alguns estudos, no entanto, ponderam que a sinterização de materiais nanocristalinos pode ocorrer em temperaturas menores que as convencionadas, entre 400-600°C

(SURYANARAYANA & KOCH, 2000; ZHANG *et al.*, 2009). Evitou-se, dessa forma, tornar a HA instável sob temperaturas superiores a 1300° C (DOROZHKIN, 2010).

Após o processo de tratamento térmico, as microesferas foram dispostas em tubos eppendorf acondicionados numa estante e esterilizados por autoclavagem, numa temperatura com o ciclo não superior a 135° C sob 2,2 kgf/cm^2 de pressão. Tal preocupação com a assepsia na manipulação é condição *sine qua non* para que a resposta biológica do tecido hospedeiro aos biomateriais implantados aconteça apenas pela interação entre ambos (HOFMANN *et al.*, 2005). Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em condições assépticas, através de assepsia da mesa cirúrgica, campos esterilizados e degermação e anti-sepsia das regiões operadas, obedecendo então às regras de biossegurança.

No presente estudo, observamos na difração de Raios-X que os difratogramas para as apatitas não sinterizadas apresentam picos menores que as sinterizadas, sugerindo que estas biocerâmicas sejam mais solúveis (FULMER *et al.*, 2002; KUMTA *et al.*, 2005). A influência do tratamento térmico sobre as propriedades físicas e químicas dos biomateriais é inquestionável, sobretudo no que se refere à solubilidade e resistência mecânica (LeGEROS, 1988). Na difração de raios-X, a sinterização das esferas de HA e NanoHA utilizadas gerou picos espectrais mais intensos, assegurando boa resistência mecânica (TONG *et al.*, 2001; FULMER *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2003; WU & BOSE, 2005), ao passo que a calcinação também conferiu resistência, porém com espectros menores nos materiais análogos (KUMTA *et al.*, 2005; BALASUNDARAM *et al.*, 2006; NAYAR *et al.*, 2006). CELOTTI *et al.*, em 2006, relataram que HAs de natureza nanocristalina conseguem manter a estrutura cristalina característica, coincidindo com os difratogramas de nosso estudo, que mostraram similaridade das fases presentes independente do tamanho dos cristais, apesar da variação no grau de cristalidade, o que caracteriza todos os materiais analisados como hidroxiapatita. As bandas de absorção presentes na espectroscopia FT-IR das esferas foram características de grupamentos químicos de fosfato, carbonato e hidroxila típicos da estrutura química de cerâmicas à base de apatita (REDEY *et al.*, 2000; CHERN LIN *et al.*, 2001; KUMTA *et al.*, 2005; CELOTTI *et al.*, 2006; PEZZATINI *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2006).

A relação entre temperatura e cristalinidade afeta sobremaneira o comportamento de solubilidade ou biodegradaçao dos materiais no meio biológico, onde ligeira redução de pH, aumento da temperatura, interações celulares e organização tecidual estão presentes. Pode ser nitidamente observado que as microesferas com picos espectrais menores através da DRX foram mais solúveis *in vivo*, ainda que nos testes de dissolução *in vitro* a biodegradação da NanoHA sinterizada, mais cristalina, não tenha sido diferente de seu análogo não-sinterizado, denotando grande dissolução de cálcio e fósforo em relação à HA sinterizada, coincidindo com outros estudos (FULMER *et al.*, 2002; BALASUNDARAM *et al.*, 2006). Tais relatos, entretanto, utilizaram meios, pH e tempos diferentes de avaliação, em relação ao nosso estudo. As imagens de MEV dos materiais evidenciaram as esferas de HA e NanoHA não-sinterizadas mais irregulares, com presença de fendas e poros (LU *et al.*, 2004), o que pode ter facilitado sua biodegradação *in vivo*. As HAs sinterizadas mostraram uma superfície mais coesa e regular em relação aos outros materiais (RIBEIRO *et al.*, 2006). As interações existentes entre o tecido e os biomateriais são capazes de modificar a morfologia de superfície das esferas (RAGEL *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2003), característica observada neste estudo, nas imagens de MEV após os testes de dissolução em tampões MES e HEPES.

Clinicamente, as esferas não-sinterizadas se mostraram mais fáceis de ser acomodadas no leito cirúrgico, característica condicionada ao tamanho e à capacidade adsortiva dos materiais (LILJENSTEN *et al.*, 2000). Aos 28 dias, após a eutanásia dos animais, observaram-se esferas residuais em grande parte dos leitos cirúrgicos preenchidos com HA e NanoHA sinterizados, evidenciando uma interação diferente da encontrada com os materiais não-sinterizados, inclusive com formação óssea completa. As amostras foram fixadas em solução de Glutaraldeído e Cacodilato de Sódio, seguidas de processamento histológico para emblocamento em resina (PEZZATINI *et al.*, 2006).

A propriedade de osteocondução das hidroxiapatitas estudadas foi avaliada também através da microscopia eletrônica de varredura com elétrons retroespalhados (BEI-SEM), cujas imagens revelaram um íntimo contato do osso

neoformado à superfície dos materiais (OTTANI *et al.*, 2002). Independente do tipo de material, a microscopia eletrônica de varredura com elétrons retroespalhados evidenciou a biocompatibilidade da hidroxiapatita, caracterizada pela presença de tecido mineralizado ao redor das esferas (KUSAKABE *et al.*, 2004; WIERZCHOS *et al.*, 2008). De acordo com ZOEGER *et al.*, em 2008, as imagens retroespalhadas fornecem a distribuição espacial da densidade de mineralização na superfície de interface da amostra. Na análise de energia superficial dispersiva (EDS-SEM), as imagens de microscopia eletrônica revelaram basicamente cálcio e fósforo, presentes na interface osso-biomaterial e nos tecidos adjacentes. Tais observações coincidem com os resultados da análise de Microfluorescência de Raios X com Radiação Síncrotron (µXRF-SR), onde houve alta intensidade de cálcio nos dois tempos experimentais. Esta técnica é analítica e se baseia na excitação local de uma pequena área de interesse, evidenciando a concentração e a distribuição dos elementos químicos no material (LIMA *et al.*, 2008).

O advento da radiação síncrotron aprimorou o uso dos raios X, melhorando a resolução das imagens da distribuição dos elementos químicos, bem como a redução dos limites de detecção e a colimação do microfeixe (LIMA *et al.*, 2008; ZOEGER *et al.*, 2008). Com o aumento da sensibilidade desta técnica (ABRAHAM *et al.*, 2005), a µXRF-SR nos permitiu registrar a distribuição elemental das amostras, detectando e quantificando além do cálcio, a presença de fósforo, zinco e estrôncio, o que é condizente com os elementos do tecido ósseo (ZOEGER *et al.*, 2008). Evidenciamos principalmente Ca e Zn nos resultados de µXRF-SR, pelo fato de o primeiro ser o elemento mais importante quanto ao caráter estrutural do tecido ósseo, responsável pela precipitação dos cristais de apatita sobre as fibras colágenas, conferindo resistência ao tecido (FERREIRA *et al.*, 2000); o segundo elemento responde por funções biológicas primordiais, como atividade enzimática, síntese protéica e preservação das estruturas e funções das membranas (BARREA *et al.*, 2003), além de demonstrar um potente efeito estimulatório dos osteoblastos para a formação óssea, e um efeito inibitório dos osteoclastos na reabsorção deste tecido (MATSUNAGA *et al.*, 2009)

Com os baixos limites de detecção, a µXRF-SR foi capaz inclusive de registrar a presença de outros elementos químicos, que não estão diretamente

relacionados ao tecido ósseo, como Ferro e Cobre, e outro extremamente incomum e não menos tóxico, o Arsênio. Fe e Cu provavelmente se devem às reações químicas e de polimerização da resina presente no emblocamento das amostras O As é um elemento tóxico que pode ser encontrado como resultado de uma variedade de aplicações industriais. Algumas vezes, a presença do Arsênio no meio ambiente e na água potável devido a alguma manipulação inadequada ou a lixiviação de certos tipos de rocha (WARD, 1987; KALMAN *et al.*, 1990). Normalmente, ele é incorporado no organismo através de alimentos contaminados e água e, após a absorção, o arsênio pode ser acumulado nos ossos. Grupos de estudo de outros animais em diferentes protocolos biológicos não encontraram este elemento. Neste ponto, exames complementares estão em curso para a investigação da origem da contaminação, entretanto cabe ressaltar que a presença deste elemento não interferiu na resposta biológica dos tecidos, tampouco na formação de tecido ósseo.

Sendo as biocerâmicas conformadas em esferas micrométricas (425-600 µm), além da facilidade de acomodação no leito cirúrgico (LILJENSTEN *et al.*, 2003), o aumento da área de superfície pode ter favorecido a degradação dos biomateriais de maior solubilidade, pela grande interação das partículas com as células do tecido de granulação presentes no local das perfurações. A presença de carbonato na síntese das hidroxiapatitas difere da fração de carbonatos no osso nativo (VALLET-REGÍ & GONZÁLEZ-CALBET, 2004), tornando as esferas mais estáveis (KUMTA *et al.*, 2005). Entretanto, o tratamento térmico por sinterização pode remover esses grupamentos químicos como produtos gasosos (DOROZHKIN, 2010), tendo relação direta nas interações celulares com as partículas cerâmicas degradadas e o tecido ósseo neoformado neste estudo. O processo de sinterização permite o aumento da cristalinidade do material, culminando na diminuição da área de superfície e do volume da amostra, favorecendo o aumento das propriedades mecânicas e consequentemente maior resistência à biodegradação (ROSA *et al.*, 2000). Como os cristais nanométricos tendem a se aglutinar (BALASUNDARAM *et al.*, 2006), o processo de sinterização pode ter favorecido a integração das nanopartículas, fato que justificaria a menor porcentagem de osso neoformado entre os grupos avaliados, quando comparados aos não-sinterizados.

De acordo com os estudos de ALBREKTSSON & JOHANSSON (2001), biomateriais osteoindutores estimulariam a diferenciação celular para posterior formação de novo osso, através de proteínas e fatores de crescimento (URIST & STRATES, 1971). No presente estudo, entretanto, podemos observar microscopicamente que os defeitos preenchidos com HA sinterizada mostraram formação óssea discreta, com presença de tecido conjuntivo envolvendo as esferas na maioria dos casos, característico de osteocondução. As biocerâmicas não-sinterizadas evidenciaram biodegradação gradual progressiva entre os períodos de 7 a 28 dias, com presença de tecido ósseo entre as partículas (RIPAMONTI, 1996; RIPAMONTI *et al.*, 2009), refletindo numa porcentagem de tecido ósseo significativamente maior em relação aos materiais sinterizados, onde o tecido neoformado mantinha íntimo contato com as esferas, sugerindo osteocondução, apesar de o procedimento cirúrgico poder gerar condições de proliferação e recrutamento celular em adequado suprimento sanguíneo (ALBREKTSSON & JOHANSSON, 2001).

8. CONCLUSÃO

De acordo com nossos resultados, podemos concluir que:

- Os biomateriais sintetizados se mostraram biocompatíveis e osteocondutores;

- A avaliação das características físicas e químicas das biocerâmicas revelou que o tratamento térmico influencia diretamente o seu comportamento de solubilidade;

- A presença de nanopartículas nas hidroxiapatitas por si só não mostraram claramente maior evidência de biodegradação. Porém, HA e NanoHA, ambas não-sinterizadas, sofreram maior biodegradação de suas esferas e maior densidade por área de osso neoformado em relação aos materiais sinterizados;

- A técnica de mapeamento através μXRF-SR mostrou que a distribuição elemental de Ca e Zn no osso neoformado é semelhante ao osso cortical.

- Este estudo abre uma janela de possibilidades quanto ao uso de biocerâmicas sintéticas a base de hidroxipatita como substitutos ósseos, variando o tamanho dos cristais, as características cristalinas, estrutura química, bem como a forma dos materiais a serem utilizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAHAM, J.; GRENÓN, M.; SÁNCHEZ, H. J.; PÉREZ, C.; BARREA, R. A case study of elemental and structural composition of dental calculus during several stages of maturation using SRXRF. **J Biomed Mater Res.** 75A: 623-628, 2005.

2. AKKUS, O.; BELANEY, R. M. Sterilization by gamma radiation impairs the tensile fatigue life of cortical bone by two orders of magnitude. **J Orthop Res.** 23: 1054-1058, 2005.

3. ALBEE, F. H.; MORRISON, H. F. Studies in bone growth: Triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. **Ann Surg.** 71 (1): 32-38, 1920.

4. ALBERS, A. P. F.; MELCHIADES, F. G.; MACHADO, R.; BALDO, J. B.; BOSCHI, A. O. Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raios X. **Cerâmica.** 48 (305): 34-37, 2002.

5. ALBREKTSSON, T. The healing of autologous bone grafts after varying degrees of surgical trauma. **J Bone Joint Surg.** 62B: 403-410, 1980.

6. ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteocondution and osseointegration. **Eur Spine J** 10: S96-S101, 2001.

7. ALFORD, A. I.; HANKENSON, K. D. Matricellular proteins: extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. **Bone.** 38: 749-757, 2006.

8. ANDERSON, J. M. The future of biomedical materials. **J Mater Sci: Mater Med.** 17: 1025-1028, 2006.

9. APFEL, M. I. R.; ÉSBERARD, C. A.; RODRIGUES, F. K. P.; BAHAMAD Jr., F. M.; SILLERO, R. O. Stereologic study of the cerebellar Purkinje cells submitted to alcoholic intoxication in wistar rats. **Arq Neuropsiquiatr.** 60 (2-A): 258-263, 2002.

10. ARAÚJO, J. C.; BASTOS, I. N.; SENA, L.; SOARES, G. D. A. Caracterização do efeito de tamanho e microdeformação da hidroxiapatita. **Educ Tecnol.** 10 (2): 10-15, 2005.

11. ASAGIRI, M.; TAKAYANAGI, H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. **Bone.** 40: 251-264, 2007.

12. BALASUNDARAM, G.; SATO, M.; WEBSTER, T. J. Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD. **Biomaterials.** 27: 2798-2805, 2006.

13. BALOOCH, G.; BALOOCH, M.; NALLA, R. K.; SCHILLING, S.; FILVAROFF, E. H.; MARSHALL, G. W.; MARSHALL, S. J.; RITCHIE, R. O.; DERINCK, R.; ALLISTON, T. TGF-β regulates the mechanical properties and composition of bone matrix. **PNAS.** 102: 18813-18818, 2005.

14. BARRALET, J. E.; LILLEY, K. J.; GROVER, L. M.; FARRAR, D. F.; ANSELL, C.; GBURECK, U. Cements from nanocrystalline hydroxyapatite. **J Mater Sci Mater Med.** 15: 407-411, 2004.

15. BARREA, R. A.; PÉREZ, C. A.; RAMOS, A. Y.; SÁNCHEZ, H. J.; GRENÓN, M. Distribution and incorporation of zinc in biological calcium phosphates. **X-Ray Spectrom.** 32: 387-395, 2003.

16. BIGI, A.; BOANINI, E.; BRACCI, B.; FACCHINI, A.; PANZAVOLTA, S.; SEGATTI, F.; STURBA, L. Nanocrystalline hydroxyapatite coatings on titanium: a new fast biomimetic method. **Biomaterials.** 26: 4085-4089, 2005.

17. BILKAY, U.; ALPER, M.; CELIK, N.; ERDEM, O.; KEREM, H.; OZEK, C.; ZEKIOGLU, O.; DELEN, Y.; SONGUR, E. Comparing the osteogenic capacities of bone substitutes: hydroxyapatite, high-density porous polyethylene, and bone collagen: a biochemical and histological analysis. **J Craniofac Surg.** 15: 585-593, 2004.

18. BISH, D. L.; REYNOLDS, R. C. **Sample preparation for X-ray diffraction**. In: **Modern Powder Diffraction.** Whashington: Mineralogical Society of America, 1989, 73-97 p.

19. BLAIR, H. C.; ZAIDI, M. Osteoclastic differentiation and function regulated by old and new pathways. **Rev Endocr Metab Disord.** 7: 23-32, 2006.

20. BLOEMERS, F. W.; BLOKHUIS, T. J.; PATKA, P.; BAKKER, F. C.; WIPPERMANN, B. W.; HAARMAN, H. J. Th. M. Autologous bone versus calcium-phosphate ceramics in treatment of experimental bone defects. **J Biomed Mater Res** Part B**.** 66B: 526-531, 2003.

21. BOSKEY, A. Bone mineral crystal size. **Osteoporos Int.** 14 (Suppl 5): S16-S21, 2003.

22. BOSS, J. H. Biocompatibility: Review of the concept and its relevance to clinical practice. In: Wise DL, editor. **Biomaterials and Bioengineering Handbook**. New York: Marcel Dekker, 2000. 94 p.

23. BRUZZANITI, A.; BARON, R. Molecular regulation of osteoclast activity. **Rev Endocr Metab Disord.** 7: 123-139, 2006.

24. CALASANS-MAIA, M. D.; ROSSI, A. M.; DIAS, E. P.; SANTOS, S. R. A.; ÁSCOLI, F.; GRANJEIRO, J. M. Stimulatory Effect on Osseous Repair of Zinc-Substituted Hydroxyapatite: Histological Study in Rabbit's Tibia. **Key Eng Mater.** 361-363: 1269-1272, 2008.

25. CALASANS-MAIA, M. D.; FERNANDES, G. V. O.; ROSSI, A. M.; DIAS, E. P.; ALMEIDA, G. D. S.; MITRI, F. F.; GRANJEIRO, J. M. Effect of Hydroxyapatite and Zinc-containing Hydroxyapatite on Osseous Repair of Critical Size Defect in the Rat Calvaria. **Key Eng Mater.** 361-363:1273-1276, 2008.

26. CALASANS-MAIA, M. D.; MONTEIRO, M. L.; ÁSCOLI, F. O.; GRANJEIRO, J. M. The rabbit as an animal model for experimental surgery. **Acta Cir Bras.** 24 (4): 325-328, 2009.

27. CAO, L.; ZHANG, C.; HUANG, J. Synthesis of hydroxyapatite nanoparticles in ultrasonic precipitation. **Ceram Int.** 31: 1041-1044, 2005.

28. CAO, W.; HENCH, L. L. Bioactive Materials. **Ceram Int.** 22 (6): 493-507, 1996.

29. CAPORALI, E. H. G.; RAHAL, S. C.; MORCELI, J.; TAGA, R.; GRANJEIRO, J. M.; CESTARI, T. M.; MAMPRIM, M. J.; CORREA, M. A. Assessment of bovine biomaterials containing bone morphogenetic proteins bound to absorbable hydroxyapatite in rabbit segmental bone defects. **Acta Cir Bras.** 21 (6): 366-373, 2006.

30. CARDOSO, E. S.; CANÇADO, R. P.; HEITZ, C.; GERHARDT de OLIVEIRA, M. Estudo exploratório descritivo do emprego de coelhos brancos da Nova Zelândia (Orytolagus cuniculus) como modelo animal na avaliação dos padrões de crescimento craniofacial. **Revista Odonto ciência- Fac Odonto/PUC-RS** 22 (55): 66-71, 2007.

31. CASTAÑEDA, S.; LARGO, R.; CALVO, E.; RODRÍGUEZ-SALVANÉS, F.; MARCOS, M. E.; DÍAZ-CURIEL, M.; HERRERO-BEAUMONT, G. Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits. **Skeletal Radiol.** 35 (1): 34-41, 2006.

32. CASTNER, D. G.; RATNER, B. D. Biomedical Surface Science: foundations to frontiers. **Surf. Sci.** 500 (1-3): 28-60, 2002.

33. CEHRELI, M. C.; SAHIN, S.; KESENCI, K.; TUZLAKOGLU, K.; PISKIN, E.; ÖZTURK, S.; RUACAN, S.; CANER, B.; BOZKURT, M. F. Biological reactions to a Poly (L-lactide)- Hydroxyapatite composite: a study in canine mandible. **J Biomater Appl**, 17 (4): 265-276, 2003.

34. CELOTTI, G.; TAMPIERI, A.; SPRIO, S.; LANDI, E.; BERTINETTI, L.; MARTRA, G.; DUCATI, C. Crystallinity in apatites: how can a truly disordered fraction be distinguished from nanosize crystalline domains? **J Mater Sci: Mater Med.** 17: 1079-1087, 2006.

35. CHARALAMBIDES, C.; BEER, M.; COBB, A. G. Poor results after augmenting autograft with xenograft (Surgibone) in hip revision surgery. **Acta Orthop.** 76: 544-549, 2005.

36. CHERN LIN, J. H.; KUO, K. H.; DING, S. J.; JU, C. P. Surface reaction of stoichiometric and calcium-deficient hydroxyapatite in simulated body fluid. **J Mater Sci: Mater Med.** 12: 731-741, 2001.

37. CNPq – **A Iniciativa Brasileira em Nanociência e Nanotecnologia.** Brasília: CNPq/MCT, Novembro de 2002.

38. COHEN Jr., M. M. The new bone biology: Pathologic, molecular and clinical correlates. **Am J Med Genet** Part A 140A: 2646-2706, 2006.

39. DACULSI, G. Micro – macroporous calcium phosphate bioceramics. **Busin Brit Glob Surg.** 1-4, 2004.

40. DACULSI, G.; LeGEROS, J. P. Three-dimensional defects in hydroxyapatite of biological interest. **J Biomed Mater Res.** 31: 495-501, 1996.

41. DAHLIN, C.; LINDE, A.; GOTTLOW, J.; NYMAN, S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. **Plast Reconstr Surg.** 81 (5): 672–676, 1988.

42. DAI, K. R.; XU, X. L.; TANG, T. T.; ZHU, Z. A.; YU, C, F.; LOU, J. R.; ZHANG, X. L. Repairing of goat tibial bone defects with BMP-2 gene-modified tissue-engineered bone. **Calcif Tissue Int.** 77 (1): 55-61, 2005.

43. DEL FATTORE, A.; CAPPARIELLO, A.; TETI, A. Review: Genetics, pathogenesis and complications of osteopetrosis. **Bone.** 42: 19-29, 2008.

44. Den BOER, F. C.; WIPPERMANN, B. W.; BLOKHUIS, T. J.; PATKA, P.; BAKKER, F. C.; HAARMAN, H. J. T. M. Healing of segmental bone defects with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenic protein-1 or autologous bone marrow. **J Orthop Res.** 21: 521-528, 2003.

45. DEQUEKER, J. Bone and ageing. **Ann Rheum Dis.** 34: 100-115, 1975.

46. DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphate cements for biomedical application. **J Mater Sci.** 43: 3028-3057, 2008.

47. DOROZHKIN, S. V. Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates. **Acta Biomater.** 6 (3): 715-734, 2010.

48. DREXLER, E. K. **Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology.** Oxford: Oxford University Press, 1990.

49. DRY, M. E.; BEEBE, R. A. Adsorption studies on bone mineral and synthetic hydroxyapatite. **J Phys Chem.** 64 (9): 1300-1304, 1960.

50. DUCHEYNE, P. Bioactive ceramics. **J Bone Joint Surg.** 76B: 861-862, 1994.

51. DUCHEYNE, P.; QIU, Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. **Biomaterials.** 20: 2287-2303, 1999.

52. DUNSMUIR, R. A.; GALLACHER, G. Microwave sterilization of femoral head allograft. **J Clin Microbiol.** 41 (10): 4755-4757, 2003.

53. DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. **Nanotecnologia: Introdução, Preparação e Caracterização de Nanomateriais e Exemplos de Aplicação.** 1ª Ed. São Paulo: Artliber, 2006.

54. DURANT, W. **A História da Filosofia.** Coleção Os Pensadores. São Paulo: Nova Cultural, 2000.

55. DUTTA, J.; HOFMANN, H. **Nanomaterials.** Swiss Federal Institute of Technology, 2003.

56. EID, K.; ZELICOF, S.; PERONA, B. P.; SLEDGE, C. B.; GLOWACKI, J. Tissue reactions to particles of bone-substitute materials in intraosseous and heterotopic sites in rats: discrimination of osteoinduction, osteocompatibility, and inflammation. **J Orthop Res.** 19(5): 962-969, 2001.

57. EL-GHANNAM, A. Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering. **Exp Rev Med Dev.** 2 (1): 87-101, 2005.

58. ELLIOTT, J. C. Carbonate apatites from aqueous systems. In: Elliot, J.C. **Structure and chemistry of the apatites and other calcium phosphates**, Amsterdan: Elsevier Science Pub Co., 1994.

59. FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cir Bras.** 19 (1): 59-65, 2004.

60. FATHI, M. H.; HANIFI, A. Evaluation and characterization of nanostructure hydroxyapatite powder prepared by simple sol-gel method. **Mater Lett.** 61: 3978-3983, 2007.

61. FERNANDES, G. V. O.; CALASANS-MAIA, M. D.; MITRI, F. F.; BERNARDO, V. G.; ROSSI, A. M.; ALMEIDA, G. D. S.; GRANJEIRO, J. M. Histomorphometric Analysis of Bone Repair in Critical Size Defect in Rats Calvaria Treated with Hydroxyapatite and Zinc-Containing Hydroxyapatite 5%. **Key Eng Mater.** 396-398: 15-18, 2009.

62. FERRARI, S. L.; TRAIANEDES, K.; THORNE, M.; LAFAGE-PROUST, M. H.; GENEVER,P.; CECCHINI, M. G.; BEHAR, V.; BISELLO, A.; CHOREV, M.; ROSENBLATT, M.; SUVA, L. J. A role for N-cadherin in the development of the differentiated osteoblastic phenotype. **J Bone Miner Res.** 15: 198-208, 2000.

63. FERREIRA, C. P.; JARROUGE, M. G.; TUNDISI, M.; MARTIN, N. F. **Bioquímica Básica**, 4ª Ed. São Paulo: MNP, 2000. p. 341-355.

64. 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. **Braz Dent J.** 15 (3): 175-180, 2004.

65. FERREIRA, L. M.; FERREIRA, L. R. K. Experimental model historic and conceptual revision. **Acta Cir Bras.** 18 (spe): 1-3, 2003.

66. FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M. V. J. Modelos experimentais em pesquisa. **Acta Cir Bras.** 20 (Supl. 2): 28-34, 2005.

67. FEYNMAN, R. P. There's plenty of room at the bottom. **An Invitation to American Physical Society.** California/USA, December, 29 in 1959. Available in: http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html.

68. FLECKENSTEIN, K. B.; CUENIN, M. F.; PEACOCK, M. E.; BILLMAN, M. A.; SWIEC, G. D.; BUXTON, T. B.; SINGH, B. B.; McPHERSON III, J. C. Effect of a hydroxyapatite tricalcium phosphate alloplast on osseous repair in the rat calvarium. **J Periodontol.** 77 (1): 39-45, 2006.

69. FREI, H.; O'CONNELL, J.; MASRI, B. A.; DUNCAN, C. P.; OXLAND, T. R. Biological and mechanical changes of the bone graft–cement interface after impaction allografting. **J Orthop Res.** 23: 1271-1279, 2005.

70. FUJISHIRO, T.; NISHIKAWA, T.; NIIKURA, T.; TAKIKAWA, S.; NISHIYAMA, T.; MIZUNO, K.; YOSHIYA, S.; KUROSAKA, M. Impaction bone grafting with hydroxyapatite. Increased femoral component stability in experiments using sawbones. **Acta Orthop** 76: 550-554, 2005.

71. 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.** 23: 751-755, 2002.

72. GERBER, T.; HOLZHÜTER, G.; GÖTZ, W.; BIENENGRÄBER, V.; HENKEL, K-O.; RUMPEL, E. Nanostructuring of biomaterials – a pathway to bone grafting substitute. **Eur J Trauma** 32: 132-140, 2006.

73. GOLDENBERG, V.; STEVENSON, S. Natural history of autografts and allografts. **Clin Orthop Relat Res.** 225: 7-16, 1987.

74. GOODHEW, P. J.; HUMPHREYS, J.; BEAULAND, R. **Electron Microscopy and Analysis**. 3rd. Ed. London: Taylor & Francis, 2001.

75. 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 Hydroxyapatite-Derived Biomaterials in an Adult Sheep Model: III. Comparison with Autogenous Bone Graft for Facial Augmentation. **Plast Reconstr Surg.** 116 (4): 1044-1052, 2005.

76. GOSAIN, A. K.; RIORDAN, P.; SONG, L.; AMARANTE, M.; KALANTARIAN, B.; NAGY, P.; WILSON, C.; TOTH, J.; McINTYRE, B. A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part I. Bioengineering implants to optimize bone replacement in reconstruction of cranial defects. **Plast Reconst Surg.** 114 (5): 1155-1163, 2004.

77. GOSAIN, A. K.; SONG, L.; RIORDAN, P.; AMARANTE, M. T.; NAGY, P. G.; WILSON, C. R.; TOTH, J. M.; RICCI, J. L. A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part I. **Plast Reconst Surg.** 109 (2): 619-630, 2002.

78. GRANJEIRO, J. M.; OLIVEIRA, R. C.; BUSTOS-VALENZUELA, J. C.; SOGAYAR, M. C.; TAGA, R. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. **Braz J Med Biol Res.** 38 (10): 1463-1473, 2005.

79. GREEN, D.; WALSH, D.; MANN, S.; OREFFO, R. O. C. The potential of biomimesis in bone tissue engineering: lessons from the design and synthesis of invertebrate skeletons. **Bone.** 30: 810-815, 2002.

80. HABIBOVIC, P.; YUAN, H.; van del DOEL, M.; SEES, T. M.; van BLITERSWIJK, C. A.; de GROOT, K. Relevance of Osteoinductive Biomaterials in Critical-Sized Orthotopic Defect. **J Orthop Res.** 24 (5): 867-876, 2006.

81. HABIBOVIC, P.; KRUYT, M. C.; JUHL, M. V.; CLYENS, S.; MARTINETTI, R.; DOLCINI, L.; THEILGAARD, N.; van BLITTERSWIJK, C. A. Comparative In Vivo Study of Six Hydroxyapatite-Based Bone Graft Substitutes. **J Orthop Res.** 26 (10): 1363-1370, 2008.

82. HALDEMAN, K. O.; MOORE, J. M. Influence of a local excess of calcium and phosphorus on the healing of fractures: an experimental study. **Arch Surg.** 29(3):385-396, 1934.

83. HARCOURT-BROWN, F. **Textbook of rabbit medicine**. Oxford: Reed Educational and Professional Publishing Ltd., 2002. 302p.

84. HAROON, Z. A.; HETTASCH, J. M.; LAI, T-S.; DEWHIRST, M. W.; GREENBERG, C. S. Tissue transglutaminase is expressed, active, and directly involved in rat dermal wound healing and angiogenesis. **FASEB J** 13: 1787-1795, 1999.

85. HAWKING, S. W. **O Universo numa Casca de Noz.** 5ª Ed. São Paulo: Arx, 2001.

86. HELMUS, M. N.; TWEDEN, K. **Materials selection**. In: **Encyclopedic Handbook of biomaterial and bioengineering. Part A**. 1: 27-59, 1995.

87. HENCH, L. L. Bioceramics: from concept to clinic. **J Am Ceram Soc.** 74 (7): 1487-1510, 1991.

88. HENCH, L. L., WILSON, J. **An Introduction to Bioceramics**. Singapore: World Scientific Publishing Company, 1993.

89. HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Third-generation biomedical materials. **Science.** 295 (5557): 1014-1017, 2002.

90. HILL, P. A.; ORTH, M. Bone remodeling. **British J Orthod**. 25: 101-107, 1998.

91. HING, K. A. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? **Philos Transact Math Phys Eng Sci.** 362 (1825): 2821-2850, 2004.

92. HOBO, S.; ICHIDA, E.; GARCIA, L. T. **Osseointegração e Reabilitação Oclusal,** 1ª Ed. São Paulo: Quintessence / Santos, 1997. p. 33-40.

93. HOFBAUER, L. C.; KHOSLA, S.; DUNSTAN, C. R.; LACEY, D. L.; BOYLE, W. J.; RIGGS, B. L. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. **J Bone Miner Res.** 15 (1): 2-12, 2000.

94. HOFMANN, A.; KONRAD, L.; HESSMANN, M. H.; KÜCHLE, R.; KORNER, J.; ROMPE, J. D.; ROMMENS, P. M. The influence of bone allograft processing on osteoblast attachment and function. **J Orthop Res** 23: 846-854, 2005.

95. HUANG, Y-C.; KAIGLER, D.; RICE, K. G.; KREBSBACH, P. H.; MOONEY, D. J. Combined angiogenic and osteogenic factor delivery enhances bone marrow stromal cell-driven bone regeneration. **J Bone Miner Res.** 20: 848-857, 2005.

96. HUBER, F-X.; BELYAEV, O.; HILLMEIER, J.; KOCK, H-J.; HUBER, C.; MEEDER, P-J.; BERGER, I. First histological observations on the incorporation of a novel nanocrystalline hydroxyapatite paste OSTIM® in human cancellous bone. **BMC Musculoskeletal Disosders.** 7(50): 1-14, 2006.

97. HUBER, F-X.; HILLMEIER, J.; HERZOG, L.; MCARTHUR, N.; KOCK, H-J.; MEEDER, P. J. Open reduction and palmar plate-osteosynthesis in combination with a nanocrystalline hydroxyapatite spacer in the treatment of comminuted fractures of the distal radius. **J Hand Surg.** 31B(3): 298-303, 2006.

98. HUBER, F-X.; MCARTHUR, N.; HILLMEIER, J.; KOCK, H-J.; BAIER, M.; DIWO, M.; BERGER, I.; MEEDER, P-J. Void filling of tibia compression fracture zones using a novel resorbable nanocrystalline hydroxyapatite paste in combination with a hydroxyapatite ceramic core: first clinical results. **Arch Orthop Trauma Surg.** 126: 533-540, 2006.

99. JENSEN, T. B.; OVERGAARD, S.; LIND, M.; RAHBEK, O.; BÜNGER, C.; S∅BALLE, K. Osteogenic protein 1 device increases bone formation and bone graft resorption around cementless implants. **Acta Orthop Scand.** 73: 31-39, 2002.

100. JOOS, U.; WIESMANN, H. P.; SZUWART, T.; MEYER, U. Mineralization at the interface of implants. **Int J Oral Maxillofac Surg.** 35: 783-790, 2006.

101. JOVANOVIC, S. A.; NEVINS, M. Bone formation utilizing titanium-reinforced barrier membranes. **Int J Periodontics Restor Dent.** 15 (1): 56-69, 1995.

102. JOWSEY, J. **Metabolic Diseases of Bone.** Philadelphia: Saunders, 1977.

103. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 11ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

104. KALMAN, D. A.; HUGHES, J.; van BELLE, G.; BURBACHER, T.; BOLGIANO, D.; COBLE, K.; MOTTET, N. K.; POLISSAR, L. The effect of variable environmental arsenic contamination on urinary concentrations of arsenic species. **Environ Health Perspect.** 89: 145-151, 1990.

105. KANAAN, R. A.; KANAAN, L. A. Transforming growth factor β1, bone connection. **Med Sci Monit.** 12: 164-169, 2006.

106. KASAJ, A.; RÖHRIG, B.; ZAFIROPOULOS, G-G.; WILLERSHAUSEN, B. Clinical evaluation of nanocrystalline hydroxyapatite paste in the treatment of human periodontal bony defects – a randomized controlled clinical trial: 6-month results. **J Periodontol** 79: 394-400, 2008.

107. KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; REIS, R. R.; ALVES, O. L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Quim Nova.** 23 (4): 518-522, 2000.

108. KESTENBACH, H.; BOTTA, W. J. ; BOTTA, W. J. **Microscopia Eletrônica: Transmissão e Varredura**. São Paulo: Associação Brasileira de Metais, 1989. 104 p.

109. KILIAN, O.; ALT, V.; HEISS, C.; JONULEIT, T.; DINGELDEIN, E.; FLESCH, I.; FIDORRA, U.; WENISCH, S.; SCHNETTLER, R. New blood vessel formation and expression of VEGF receptors after implantation of platelet growth factor-enriched biodegradable nanocrystalline hydroxyapatite. **Growth Factors.** 23(2): 125-133, 2005.

110. KOHN, D. H.; DUCHEYNE, P. Materials for Bone and Joint Replacement **Mater Sci Technology- A Comprehensive Treatment***,* 14: 29-109, 1992.

111. KOKUBO, T.; KIM, H.; KAWASHITA, M.; NAKAMURA, T. "What kinds of materials exhibit bone-bonding?". In: Davies, J.E. **Bone Engineering***.* Toronto: 190-194, 2000.

112. KUMTA, P. N.; SFEIR, C.; LEE, D-H.; OLTON, D.; CHOI, D. Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: novel synthesis and characterization. **Acta Biomater.** 1 (1): 65-83, 2005.

113. KURASHINA, K.; KURITA, H.; WU, Q.; OHTSUKA, A.; KOBAYASHI, H. Ectopic osteogenesis with biphasic ceramics of hydroxyapatite and tricalcium phosphate in rabbits. **Biomaterials.** 23 (2): 407-412, 2002.

114. KURIAKOSE, T. A.; KALKURA, S. N.; PALANICHAMY, M.; ARIVUOLI, D.; DIERKS, K.; BOCELLI, G.; BETZEL, C. Synthesis of stoichiometric nano crystalline hydroxyapatite by ethanol-based sol-gel technique at low temperature. **J Cryst Growth.** 263: 517-523, 2004.

115. LECANDA, F.; TOWLER, D. A.; ZIAMBARAS, K.; CHENG, S. L.; KOVAL, M.; STEINBERG, T. H.; CIVITELLI, R. Gap junctional communication modulates gene expression in osteoblastic cells. **Mol Biol Cell.** 9: 2249-2258, 1998.

116. LeGEROS, R. Z. Calcium phosphate materials in restorative dentistry: A review. **Adv Dent Res.** 2 (1): 164-180, 1988.

117. LeGEROS, R. Z. *et al.* Calcium Phosphate Biomaterials: preparation, properties and biodegradations. In: **Encyclopedie Handbook of Biomaterials.** 1 (part A): 1429-1463, 1995.`

118. LeGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clin Orthop Relat Res***,* 395: 81-98, 2002.

119. LILJENSTEN, E. L.; ATTAELMANAN, A. G.; LARSSON, C.; LJUSBERG- H.; DANIELSEN,N.; HIRSCH, J-M.; THOMSEN, P. Hydroxyapatite granule/Carrier composites promote new bone formation in cortical defects. **Clin Implant Dent Rel Res.** 2 (1): 50-59, 2000.

120. LILJENSTEN, E. L.; ADOLFSSON, E.; STRID, K-G.; THOMSEN, P. Resorbable and nonresorbable hydroxyapatite granules as bone graft substitutes in rabbit cortical defects. **Clin Implant Dent Rel Res.** 5 (2): 95-102, 2003.

121. LILLEY, K. J.; GBURECK, U.; WRIGHT, A. J.; FARRAR, D. F.; BARRALET, J. E. Cement from nanocrystalline hydroxyapatite: effect of calcium phosphate ratio. **J Mater Sci Mater Med.** 16:1185-1190, 2005.

122. LIMA, I. C. B. *Caracterização de estruturas internas ósseas através das técnicas de microtomografia computadorizada tridimensional e fluorescência de Raios X*. Rio de Janeiro, 2006. 167f. Tese (Doutorado em Engenharia) – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

123. LIMA, I.; ANJOS, M. J.; FLEIUSS, M. L. F.; ROSENTHAL, D.; LOPES, R. T. Characterization of osteoporotic bone structures by bidimensional images through x-ray microfluorescence with synchrotron radiation. **X-Ray Spectrom.** 37: 249-254, 2008.

124. LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

125. LIU, H.; WEBSTER, T. J. Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools. **Biomaterials.** 28: 354-369, 2007.

126. LIU, Y.; LI, J. P.; HUNZIKER, E. B.; De GROOT, K. Incorporation of growth factors into medical devices via biomimetic coatings. **Phil Trans R Soc A** 364: 233-248, 2006.

127. LOGEART-AVRAMOGLOU, D.; ANAGNOSTOU, F.; BIZIOS, R.; PETITE, H. Engineering bone: challenges and obstacles. **J Cell Mol Med.** 9 (1): 72-84, 2005.

128. LORENZO, J. Interactions between immune and bone cells: new insight with many remaining questions. **J Clin Invest.** 106: 749-752, 2000.

129. LU, J.; BLARY, M-C.; VAVASSEUR, S.; DESCAMPS, M.; ANSELME, K.; HARDOUIN, P. Relationship between bioceramics sintering and micro-particles-induced cellular damages. **J Mater Sci: Mater Med.** 15: 361-365, 2004.

130. LUNDGREN, S.; SJÖSTRÖM, M.; NYSTRÖM, E.; SENNERBY, L. Strategies in reconstruction of the atrophic maxilla with autogenous bone grafts and endosseous implants. **Periodontol 2000.** 47 (1): 143-161, 2008.

131. MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **An Acad Bras Cienc.** 75 (4): 469-486, 2003.

132. 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. **J Appl Oral Sci.** 12: 62-69, 2004.

133. MASTROGIACOMO, M.; SCAGLIONE, S.; MARTINETTI, R.; DOLCINI, L.; BELTRAME, F.; CANCEDDA, R.; QUARTO, R. Role os scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. **Biomaterials.** 27: 3230-3237, 2006.

134. MATHIAS, M. V. R.; BASSANTA, A. D.; RAMALHO, S. A.; SABA-CHUJFI, E,; SIMONE, J. L. Autogenous graft with donors site in oral cavity. **RGO.** 51 (4): 249-256, 2003.

135. MATSUMOTO, T.; KAWAMOTO, A.; KURODA, R.; ISHIKAWA, M.; MIFUNE, Y.; IWASAKI, H.; MIWA, M.; HORII, M.; HAYASHI, S.; OYAMADA, A.; NISHIMURA, H.; MURASAWA, S.; DOITA, M.; KUROSAKA, M.; ASAHARA, T. Therapeutic potential of vasculogenesis and osteogenesis promoted by peripheral blood CD34-positive cells for functional bone healing. **Am J Pathol.** 169: 1440-1457, 2006.

136. MATSUNAGA, T.; ISHIZAKI, H.; TANABE, S.; HAYASHI, Y. Synchrotron radiation microbeam X-ray fluorescence analysis of zinc concentration in remineralized enamel *in situ*. **Arch Oral Biol.** 54: 420-423, 2009.

137. MAVROPOULOS, E.; ROSSI, A. M.; COSTA, A. M.; PEREZ, C. A. C.; MOREIRA, J. C.; SALDANHA, M. Studies on the mechanisms of lead immobilization by hydroxyapatite. **Environ Sci Technol.** 36: 1625-1629, 2002.

138. McMILLAN, J.; KINNEY, R. C.; RANLY, D. M.; FATEHI-SEDEH, S.; SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B. D. Osteoinductivity of demineralized bone matrix in immunocompromised mice and rats is decreased by ovariectomy and restored by estrogen replacement. **Bone.** 40: 111-121, 2007.

139. MEEJOO, S.; MANEEPRAKORN, W.; WINOTAI, P. Phase and thermal stability os nanocrystalline hydroxyapatite prepared via microwave heating. **Thermoch Act.** 447: 115-120, 2006.

140. MENDES, S. C.; REIS, R. L.; BOVELL, Y. P.; CUNHA, A. M.; van BLITTERSWIJK, C. A.; BRUIJN, J. D. Biocompatibility testing of novel starch-based materials with potential application in orthopaedic surgery: a preliminary study. **Biomaterials.** 22 (14): 2057-2064, 2001.

141. MIDY, V.; HOLLANDE, E.; REY, C.; DARD, M.; PLOUËT, J. Adsorption of vascular endothelial growth factor to two different apatitic materials and its release. **J Mater Sci Mater Med.** 12: 293-298, 2001.

142. MIRANDA, E. S.; CARDOSO, F. T. S.; MEDEIROS F°, J. F.; BARRETO, M. D. R.; TEIXEIRA, R. M. M.; WANDERLEY, A. L.; FERNANDES, K. E. Estudo experimental comparativo no uso de enxerto ósseo orgânico e inorgânico no reparo de fraturas cirúrgicas em radio de coelhos. **Acta Ortop Bras.** 13 (5): 245-248, 2005.

143. MIRANDA, E. S.; CARDOSO, F. T. S.; MEDEIROS FILHO, J. P.; BARRETO, M. D. R.; TEIXEIRA, R. M. M.; WANDERLEY, A. L.; FERNANDES, K. E. Estudo experimental comparativo no uso de enxerto ósseo orgânico e inorgânico no reparo de fraturas cirúrgicas em rádio de coelhos. **Acta Orthop Bras.** 13: 245-248, 2005.

144. MISCH, C. E.; DIETSH, F. D. Bone-Grafting materials in implant dentistry. **Implant Dent.** 2(3):158-167, 1993.

145. MITRI, F. F.; YOSHIMOTO, M.; ALLEGRINI Jr., S.; KOO, S.; CARBONARI, M. J.; KÖNIG Jr., B. Histological findings in titanium implants coated with calcium phosphate ceramics installed in rabbit's tibias. **Ann Anat.** 187: 93-98, 2005.

146. MOBASHERPOUR, I.; HESHAJIN, M. S.; KAZEMZADEH, A.; ZAKERI, M. Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by using precipitation method. **J Alloy Compd.** 430: 330-333, 2007.

147. NARAYAN, R. J. The next generation of biomaterial development. **Phil Trans R Soc A.** 368: 1831-1837, 2010.

148. NARAYAN, R. J.; KUMTA, P. N.; SFEIR, C.; LEE, D-H.; OLTON D.; CHOI, D. Nanostructured ceramics in medical devices: applications and prospects. **JOM.** 56 (10): 38-43, 2004.

149. NAVARRO, M.; MICHIARDI, A.; CASTAÑO, O.; PLANELL, J. A. Biomaterials in orthopaedics. **J R Soc Interface.** 5: 1137-1158, 2008.

150. NAYAR, S.; SINHA, M. K.; SINHA, A. Synthesis and sintering of biomimetic hydroxyapatite nanoparticles for biomedical applications. **J Mater Sci: Mater Med.** 17: 1063-1068, 2006.

151. NISHIKAWA, T.; MASUNO, K.; TOMINAGA, K.; KOYAMA, Y.; YAMADA, T.; TAKAKUDA, K.; KIKUCHI, M.; TANAKA, J.; TANAKA, A. Bone repair analysis in a novel biodegradable hydroxyapatite/collagen composite implanted in bone. **Brit J Oral Surg.** 2005.

152. NOVAES Jr., A. B.; QUEIROZ, A. C. The importance of pre-clinical studies in the selection of dental implants used in clinical practice. **Implant News.** 7: 11-19, 2010.

153. NYMAN, J.S.; REYES, M.; WANG, X. Effect of ultrastructural changes on the toughness of bone. **Micron.** 36: 566-582, 2005.

154. OLIVEIRA, J. F.; AGUIAR, P. F.; ROSSI, A. M.; SOARES, G. A. Effect of process parameters on the characteristics of porous calcium phosphate ceramics for boné tissue scaffolds. **Artif Organs.** 27 (5): 406-411, 2003.

155. OLIVEIRA, R. C.; OLIVEIRA, F. H. G.; CESTARI, T. M.; TAGA, R.; GRANJEIRO, J. M. Morphometric evaluation of the repair of critical-size defects using demineralized bovine bone and autogenous bone grafts in rat calvaria. **Clin Oral Impl Res.** 19 (8): 749–754, 2008.

156. OONISHI, H.; HENCH, L. L.; WILSON, J.; SUGIHARA, F.; TSUJI, E.; KUSHITANI, S.; IWAKI, H. Comparative bone growth behavior in granules of bioceramic materials of various sizes. **J Biomed Mater Res.** 44: 31-43, 1999.

157. OONISHI, H.; HENCH, L. L.; WILSON, J.; SUGIHARA, F.; TSUJI, E.; MATSUURA, M.; KIN, S.; YAMAMOTO, T.; MIZOKAWA, S. Quantitative comparison of bone growth behavior in granules of Bioglass®, A-W glass-ceramic, and hydroxyapatite. **J Biomed Mater Res.** 51: 37-46, 2000.

158. OTTANI, V.; RASPANTI, M.; MARTINI, D.; TRETOLA, G.; RUGGERI Jr., A.; FRANCHI, M.; PICCARI, G. G.; RUGGERI, A. Electromagnetic stimulation on the bone growth using backscattered electron imaging. **Micron.** 33: 121-125, 2002.

159. OWEN, M. Cellular dynamics of bone. In: Bourne G (ed) **The Biochemistry and Physiology of Bone**, 2nd Edn. New York: Academic, 1972. pp 271.

160. PARK, J. B. **Biomaterials Science and Engineering**. 1ª Ed. New York: Springer-Verlag, 1984.

161. PARK, Y-S.; LEE, J-Y.; YUN, S-H.; JUNG, M-W.; OH, I. Comparison of hydroxyapatite – and porous-coated stems in total hip replacement. 74: 259-263, 2003.

162. PATEL, N.; BROOKS, R. A.; CLARKE, M. T.; LEE, P. M. T.; 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. **J Mater Sci Mater Med.** 16 (5): 429-440, 2005.

163. PEARCE, A.; RICHARDS, R. G.; MILZ, S.; SCHNEIDER, E.; PEARCE, S. G. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. **Eur Cells Mater.** 13: 1-10, 2007.

164. PETROIANU, A. Aspectos éticos na pesquisa em animais. **Acta Cir Bras**. 11 (3): 157-64, 1996.

165. PEZZATINI, S.; SOLITO, R.; MORBIDELLI, L.; LAMPONI, S.; BOANINI, E.; BIGI, A.; ZICHE, M. The effect of hydroxyapatite nanocrystals on microvascular endothelial cell viability and functions. **J Biomed Mater Res.** 76A: 656-663, 2006.

166. PIZZO, R. C. A. *Ablação de biomateriais*: *resinas compostas, cerâmicas e metais*. São Paulo, 2007. Monografia de conclusão de curso (aperfeiçoamento em Terapias Fotônicas – uso de lasers e leds – nas áreas de saúde) – Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

167. PRADO DA SILVA, M. H.; LEMOS, A. F.; FERREIRA, J. M. F.; SANTOS, J. D. **Proceedings of the European Society for Biomaterials Conference**, 2001, T68.

168. RAGEL, C. V.; VALLET-REGÍ, M.; RODRÍGUEZ-LORENZO, L. M. Preparation and in vitro bioactivity of hydroxyapatite/solgel glass biphasic material. **Biomaterials.** 23: 1865-1872, 2002.

169. RAMMELT, S.; SCHULZE, E.; WITT, M.; PETSCH, E.; BIEWENER, A.; POMPE, W.; ZWIPP, H. Collagen type I increases bone remodeling around hydroxyapatite implants in the rat tibia. **Cells Tiss Org**. 178: 146-157, 2004.

170. RAMSHAW, J. A. M.; PENG, Y. Y.; GLATTAUER, V.; WERKMEISTER, J. A. Collagens as biomaterials. **J Mater Sci: Mater Med**. 20 (Suppl. 1): 3-8, 2009.

171. RATNER, B. D.; BRYANT, S. J. Biomaterials: where we have been and where we are going. **Annu Rev Biomed Eng.** 6: 41-75, 2004.

172. RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. **Biomaterials Science – an Introduction to Materials in Medicine,** 1ª Ed. California: Academic Press, 1996. p. 11-124; 165-280.

173. RAY, R. D.; DEGGE, J.; GLOYD, P.; MOONEY, G. Bone Regeneration: an experimental study of bone grafting materials. **J Bone Joint Surg.** 34 (3): 638-647, 1952.

174. REDEY, S. A.; NARDIN, M.; BERNACHE-ASSOLANT, D.; REY, C.; DELANNOY, P.; SEDEL, L.; MARIE, P. J. Behavior of human osteoblastic cells on stoichiometric hydroxyapatite and type A carbonate apatite: Role of surface energy. **J Biomed Mater Res.** 50: 353-364, 2000.

175. REIKERÅS, O.; GUNDERSON, R. B. Excellent results with femoral revision surgery using an extensively hydroxyapatite-coated stem. **Acta Orthop** 77: 98-103, 2006.

176. RIBEIRO, C. C.; BARRIAS, C. C.; BARBOSA, M. A. Preparation and characterisation of calcium-phosphate porous microspheres with a uniform size for biomedical applications. **J Mater Sci: Mater Med.** 17: 455-463, 2006.

177. RIPAMONTI, U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. **Biomaterials.** 17: 31-35, 1996.

178. RIPAMONTI, U.; CROOKS, J.; KHOALI, L.; RODEN, L. The induction of bone formation by coral-derived calcium carbonate/hydroxyapatite constructs. **Biomaterials.** 30: 1428-1439, 2009.

179. RIZZOLI, R.; BOONEN, S.; BRANDI, M. L.; BURLET, N.; DELMAS, P.; REGINSTER, J. Y. The role of calcium and vitamin D in the management of osteoporosis. **Bone.** 42: 246-249, 2008.

180. ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Bases Patológicas das Doenças,** 7ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 1331-1385.

181. ROSA, A. L.; SHAREEF, M. Y.; van NOORT, R. Efeito das condições de preparação e sinterização sobre a porosidade da hidroxiapatita. **Pesq Odontol Bras.** 14 (3): 273-277, 2000.

182. SANADA, J. T.; RODRIGUES, J. G. R.; CANOVA, G. C.; CESTARI, T. M.; TAGA, E. M.; TAGA, R.; BUZALAF, M. A. R.; GRANJEIRO, J. M. Análise histológica, radiográfica e do perfil de imunoglobulinas após a implantação de

enxerto de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco em músculo de ratos. **J Appl Oral Sci.** 11(3): 209-215, 2003.

183. SATO, M.; SAMBITO, M. A.; ASLANI, A.; KALKHORAN, N. M.; SLAMOVICH, E. B.; WEBSTER, T. J. Increased osteoblast functions on undoaped and yttrium-doped nanocrystalline hydroxyapatite coatings on titanium. **Biomaterials.** 27: 2358-2369, 2006.

184. SBOT – Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. **Casa Segura / Fraternidade do Idoso.** São Paulo/Brasil. Disponível em: http://www.sbot.org.br/portal/Campanhas/CasaSegura.asp

185. SCHANAIDER, A.; SILVA, P. C. Uso de animais em cirurgia experimental. **Acta Cir Bras.** 19 (4): 441-447, 2004.

186. SCHEPERS, E.; DE CLERCQ, M.; DUCHEYNE, P.; KEMPENEERS, R. Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions. **J Oral Rehab.** 18 (5): 439-452, 1991.

187. SCHLIEPHAKE, H.; WEICH, H. A.; DULLIN, C.; GRUBER, R.; FRAHSE, S. Mandibular bone repair by implantation of rhBMP-2 in a slow release carrier of polylactic acid – an experimental study in rats. **Biomaterials.** 29: 103-110, 2008.

188. SCHNEIDERS, W.; REINSTORF, A.; POMPE, W.; GRASS, R.; BIEWENER, A.; HOLCH, M.; ZWIPP, H.; RAMMELT, S. Effect of modification of hydroxyapatite/collagen composites with sodium citrate, phosphoserine, phosphoserine/RGD-peptide and calcium carbonate on bone remodeling. **Bone.** 40: 1048-1059, 2007.

189. SCHREIBER, R. E.; BLEASE, K.; AMBROSIO, A.; AMBURN, E.; SOSNOWSKI, B.; SAMPATH, T. K. Bone indution by AdBMP-2/Collagen implants. **J Bone Joint Surg Am** 87: 1059-1068, 2005.

190. SCHWARZ, F.; BIELING, K.; LATZ, T.; NUESRY, E.; BECKER, J. Healing of intrabony peri-implantitis defects following application of a nanocrystalline hydroxyapatite (Ostim™) or a bovine-derived xenograft (Bio-Oss™) in combination with a collagen membrane (Bio-Gide™). A case series. **J Clin Periodontol.** 33: 491-499, 2006.

191. SEEMAN, E. Bone quality: the material and structural basis of bone strength. **J Bone Miner Metab.** 26: 1-8, 2008.

192. SHAFER, W. G.; HINE, M. K.; LEVY, B. M. **Tratado de Patologia Bucal**, 4ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987. p. 624-664.

193. SHEPHERD, D.; BEST, S. M. Production and characterization of zinc substituted hydroxyapatite. **Key Eng Mater.** 361-363: 159-162, 2008.

194. SHIRLEY, D.; MARSH, D.; JORDAN, G.; McQUAID, S.; LI, G. Systematic recruitment of osteoblastic cells in fracture healing. **J Orthop Res.** 23: 1013-1021, 2005.

195. SHIRLEY, D.; MARSH, D.; JORDAN, G.; McQUAID, S.; LI, G. Systemic recruitment of osteoblastic cells in fracture healing. **J Orthop Res.** 23: 1013-1021, 2005.

196. SHOBACK, D. Update in osteoporosis and metabolic bone disorders. **J Clin Endocrinol Metab.** 92: 747-753, 2007.

197. SILVA, I. I. C.; PIMENTEL-SOARES, S.; BITTENCOURT, R. C.; GRANJEIRO, J. M. Natural bovine anorganic apatite and collagen presents osteoconductivity and contribute to bone repair of rat calvaria critical size defect. **Key Eng Mater.** 396-398: 249-252, 2009.

198. SILVA, O. L. *Avaliação de biocompatibilidade do nitreto de titânio usado como revestimento para biomateriais metálicos*. São Carlos, 1999. Tese (Livre Docência em Biomateriais) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1999.

199. SILVA, P. C. O Uso de animais de experimentação biomédica. **Rev Med Cir**. 1: 71-79, 1997.

200. SOLHEIM, E. Growth factors in bone. **Int Orthop.** 22: 410-416, 1998.

201. SOMMERFELDT, D. W.; RUBIN, C. T. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. **Eur Spine J**, 10(Suppl 2): S86–S95, 2001.

202. SOUZA, J. C. **Os Pensadores Pré-Socráticos: Fragmentos, Doxologia e Comentários.** Coleção Os Pensadores. São Paulo: Nova Cultural, 2000.

203. STADELMANN, V. A.; TERRIER, A.; PIOLETTI, D. P. Microstimulation at the bone-implant interface upregulates osteoclast activation pathways. **Bone** 42: 258-364, 2008.

204. STIPP, S. L.; HOCHELLA Jr., M. F. ; PARKS, G. A. ; LECKIE, J. O. Cd^{2+} uptake by calcite, solid-state diffusion and the formation of solid-solution: Interface processes observed with near-surface sensitive technique (XPS, LEED, and AES). **Geochim Cosmochim Acta.** 56 (5): 1941-1954, 1992.

205. SURYANARAYANA, C.; KOCH, C. C. Nanocrystalline materials – Current research and future directions. **Hyperfine Interact.** 130 (1-4): 5-44, 2000.

206. SUVOROVA, E. I.; BUFFAT, P. A. Electron diffraction from micro- and nanoparticles of hydroxyapatite. **J Microsc.**196 (1): 46-58, 1999.

207. TADIC, D.; BECKMANN, F.; SCHWARZ, K.; EPPLE, M. A novel method to produce hydroxyapatite objects porosity that avoids sintering. **Biomaterials.** 25: 3335-3340, 2004.

208. TADIC, D.; BECKMANN, F.; SCHWARZ, K.; EPPLE, M. A novel method to produce hydroxyapatite objects porosity that avoids sintering. **Biomaterials.** 25: 3335-3340, 2004.

209. TAGA, M. L. L.; GRANJEIRO, J. M.; CESTARI, T. M.; TAGA, R. Healing of critical-size cranial defects in guinea pigs using a bovine bone-derived resorbable membrane. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 23 (3): 427-436, 2008.

210. TEITELBAUM, S. L. Bone resorption by osteoclasts. **Science.** 289 (5484): 1504-1508, 2000.

211. TEIXEIRA, C. R.; RAHAL, S. C.; VOLPI, R. S.; TAGA, R.; CESTARI, T. M.; GRANJEIRO, J. M.; VULCANO, L. C.; CORREA, M. A. Tibial segmental bone defect treated with bone plate and cage filled with either xenogeneic composite or autologous cortical bone graft. An experimental study in sheep. **Vet Comp Orthop Traumatol.** 20 (4): 269-276, 2007.

212. THIAN, E. S.; HUANG, J.; BEST, S. M.; BARBER, Z. H.; BROOKS, R. A.; RUSHTON, N.; BONFIELD, W. The response of osteoblasts to nanocrystalline silicon-substituted hydroxyapatite thin films. **Biomaterials.** 27:2692-2698, 2006.

213. TONG, W.; LI, X.; FENG, J.; CHEN, J.; ZHANG, X. Phase transitions of hydroxyapatite coatings during post-heat treatment and their performances under ultrasonic tests. **J Biomed Mater Res.** 56: 49-55, 2001.

214. TORRENT-BURGUES, J.; RODRIGUEZ-CLEMENTE, R. Hydroxyapatite precipitation in a semibatch process. **Cryst Res Technol.** 36 (8-10): 1075-1082, 2001.

215. TORTORA, G. J.; GRABOWSKI, S. R. **Princípios de Anatomia e Fisiologia,** 9ª Ed. Rio e Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 1-165.

216. UNITED NATIONS – Life expectancy at birth by sex (years): medium variant 1950-2050. **World Population Prospects: The 2008 Revision – Department of Economic and Social Affairs. Population Division.** New York/USA, March, 11 in 2009. Available in: http://esa.un.org/unpp/

217. UNITED NATIONS – Population (thousands): medium variant 2000-2040. **World Population Prospects: The 2008 Revision – Department of Economic and Social Affairs. Population Division.** New York/USA, March, 11 in 2009. Available in: http://esa.un.org/unpp/

218. URIST, M. R. Bone: formation by autoinduction. **Science.** 150 (3698): 893-899, 1965.

219. URIST, M. R.; STRATES, B. S. Bone morphogenetic protein. **J Dent Res Supplement.** 50: 1392-1406, 1971.

220. VALLET-REGÍ, M.; GONZÁLEZ-CALBET, J. M. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. **Progress Solid State Chem** 32: 1-31, 2004.

221. WALSH, W. R.; CHAPMAN-SHEATH, P. J.; CAIN, S.; DEBES, J.; BRUCE, W. J. M.; SVEHLA, M. J.; GILLIES, R. M. A resorbable porous ceramic composite bone graft substitute in a rabbit metaphyseal defect model. **J Orthop Res** 21: 655-661, 2003.

222. WANG, H.; LEE, J-K.; MOURSI, A.; LANNUTTI, J. J. Ca/P ratio effects on the degradation of hydroxyapatite *in vitro.* **J Biomed Mater Res.** 67A: 599-608, 2003.

223. WANG, X.; MABREY, J. D.; AGRAWAL, C. M. An interspecies comparison of bone fracture properties. **Biomed Mater Eng.** 8 (1): 1-9, 1998.

224. WARD, J. Determination of arsenic in rocks and ores with a sequential X-ray spectrometer. **X-Ray Spectrom.** 16 (5): 223-228, 1987.

225. WEBSTER, T. J.; ERGUN, C.; DOREMUS, R. H.; BIZIOS, R. Hydroxyapatite with substituted magnesium, zinc, cadmium, and yttrium II: mechanisms of osteoblast adhesion. **J Biomed Mater Res Part A.** 59 (2): 312–317, 2002.

226. WEBSTER, T. J.; ERGUN, C.; DOREMUS, R. H.; SIEGEL, R. W.; BIZIOS, R. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. **Biomaterials.** 21: 1803-1810, 2000.

227. WEBSTER, T. J.; SCHLUETER, E. A. M.; SMITH, J. L.; SLAMOVICH, E. B. Osteoblast response to hydroxyapatite doped with divalent and trivalent cations. **Biomaterials.** 25 (11): 2111-2121, 2004.

228. WHANG, J.; SHAW, L. L. Nanocrystalline hydroxyapatite with simultaneous enhancements in hardness and toughness. **Biomaterials.** 30 (34): 6565-6572, 2009.

229. WILLIAMS, D. F. **Definitions in Biomaterials.** In: **Progress in Biomedical Engineering.** New York: Elsevier,1987.

230. WOO, K. M.; SEO, J.; ZHANG, R.; MA, P. X. Suppression of apoptosis by enhanced protein adsorption on polymer/hydroxyapatite composite scaffolds. **Biomaterials** 28: 2622-2630, 2007.

231. WU, Y.; BOSE, S. Nanocrystalline hydroxyapatite: micelle template synthesis and characterization. **Langmuir.** 21: 3232-3234, 2005.

232. XIAO, X.; LIU, R.; HUANG, Q. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds. **J Mater Sci: Mater Med.** 19 (11): 3429-3435, 2008.

233. YAEDÚ, R. F. Y.; BRIGHENTTI, F. L.; CESTARI, T. M.; GRANJEIRO, J. M.; TAGA, R. Heterotopic osteogenesis induced by implantation of allogenic bone matrix graft into mouse muscle perimysium. A morphometric study. **Cienc Odontol Bras**, 7(1):21-30, 2004.

234. YAMAMOTO, M. K.; LUZ, J. C. C.; ARAUJO, V. C. Resposta tecidual óssea frente a hidroxiapatita granular implantada em defeitos criados na mandíbula de ratos. **Rev Odontol USP.** 8 (4): 281-286, 1994.

235. YEONG, B.; JUNMIN, X.; WANG, J. Mechanochemical synthesis of hydroxyapatite from calcium oxide and brushite. **J Am Ceram Soc.** 84(2):645-467, 2001.

236. ZANER, D. J.; YUKNA, R. A. Particle size of periodontal bone grafting materials. **J. Periodontol.** 55 (7): 406-409, 1984.

237. ZARBIN, A. J. G. Química de (nano) materiais. **Quim Nova.** 30: 1469-1479, 2007.

238. ZHANG, L.; RODRIGUEZ, J.; RAEZ, J.; MYLES, A. J.; FENNIRI, H.; WEBSTER, T. J. Biologically inspired rosette nanotubes and nanocrystalline hydroxyapatite hydrogel nanocomposites as improved bone substitutes. **Nanotechnol.** 20: 175101, 12 pp., 2009.

239. ZHU, X.; EIBL, O.; SCHEIDELER, L.; GEIS-GERSTORFER, J. Characterization of nano hydroxyapatite/collagen surfaces and cellular behaviors. **J Biomed Mater Res** 79A: 114-127, 2006.

240. ZHU, X.; EIBL, O.; SCHEIDELER, L.; GEIS-GERSTORFER, J. Characterization of nano hydroxyapatite/collagen surfaces and cellular behaviors. **J Biomed Mater Res.** 79A: 114-127, 2006.

241. ZOEGER, N.; STRELI, C.; WOBRAUSCHEK, P.; JOKUBONIS, C.; PEPPONI, G.; ROSCHGER, P.; HOFSTAETTER, J.; BERZLANOVICH, A.; WEGRZYNEK, D.; CHINEA-CANO, E.; MARKOWICZ, A.; SIMON, R.; FALKENBERG, G. Determination of the elemental distribution in human joint bones by SR micro XRF. **X-Ray Spectrom.** 37: 3-11, 2008.

APÊNDICE 1

Artigo submetido para X-Ray Spectrometry em 15/07/2010.

X-RAY Spectrometry

X-Ray Spectrometry

Bone-NanoHydroxyapatite Spheres Interface Evaluation by Synchrotron Radiation X-Ray Microfluorescence

Journal:	*X-Ray Spectrometry*
Manuscript ID:	XRS-10-0069
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	15-Jul-2010
Complete List of Authors:	Gasperini, Flavio; Fluminense Federal University, Post-Graduation Program on Medical Sciences Calasans-Maia, Monica; Fluminense Federal University, Oral Surgery Department Resende, Rodrigo; Fluminense Federal University, Post-Graduation Program on Medical Sciences Granjeiro, Jose; Fluminense Federal University, Cell Therapy Center – HUAP, IB Rossi, Alexandre; Brazilian Physics Research Center, Biomaterials Laboratory- LABIOMAT/MCT Lopes, Ricardo; Federal University of Rio de Janeiro, Nuclear Engineering Lima, Inaya; State University of Rio de Janeiro, Mechanical Eng. and Energy; Federal University of Rio de Janeiro, Nuclear Eng.
Keywords:	X-Ray , bone, synchrotron, hydroxyapatite, zinc

scholarONE™ Manuscript Central

John Wiley & Sons

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