



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

ANA EMÍLIA HOLANDA ROLIM

**AVALIAÇÃO DE MICROESFERAS DE HIDROXIAPATITA,
DOPADAS OU NÃO COM ESTRÔNCIO, NO REPARO DE DEFEITO
ÓSSEO CRÍTICO, EM CALVÁRIA DE RATO**

Salvador
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ANA EMÍLIA HOLANDA ROLIM

**AVALIAÇÃO DE MICROESFERAS DE HIDROXIAPATITA,
DOPADAS OU NÃO COM ESTRÔNCIO, NO REPARO DE DEFEITO
ÓSSEO CRÍTICO, EM CALVÁRIA DE RATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiana Paim Rosa

Salvador
2010

R748 Rolim, Ana Emília Holanda

Avaliação de microesferas de hidroxiapatita, dopadas ou não com estrôncio, no reparo de defeito ósseo crítico, em calvária de rato / Ana Emília Holanda Rolim. – Salvador, 2010.
91 f. : il.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fabiana Paim Rosa.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Faculdade de Odontologia, 2010.

1. Engenharia tecidual. 2. Materiais biocompatíveis. 3. Osso e Ossos. 4. Hidroxiapatita. 5. Estrôncio. 6. Alginato. I. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Odontologia. II. Rosa, Fabiana Paim. III. Título.

CDU 616.314.17-002



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

ANA EMÍLIA HOLANDA ROLIM

**“AVALIAÇÃO DE MICROESFERAS DE HIDROXIAPATITA,
DOPADAS OU NÃO COM ESTRÔNCIO, NO REPARO DE DEFEITO
ÓSSEO CRÍTICO, EM CALVÁRIA DE RATO”**

Salvador, 26 de fevereiro de 2010.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa (Orientador)
Professor da Universidade Federal da Bahia – ICS

Profa. Dra. Maria Isabela Guimarães Campos (Examinador Interno)
Professora da Universidade Federal da Bahia - ICS

Profa. Dra. Teresinha Costa de Santana- (Examinador Externo)
Professor da Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS

Aos meus familiares que me apoiaram durante esta caminhada, especialmente, meus dedicados pais Antônio e Inês pelo carinho, afeto, compreensão e pelas palavras de incentivo em todos os momentos importantes da minha vida.

Agradecimentos

A Deus, a grande força que ilumina minhas escolhas e minha vida tornando-a cheia de perspectivas inovadoras a cada dia.

Aos meus pais por todo o apoio e carinho, sempre foram minha fortaleza e porto seguro diante dos desafios, a força do amor e da dedicação importantes para superar todas as dificuldades.

Ao meu amado esposo Genildo pela paciência, incentivos em todos os momentos e pelo carinho dedicado, indispensáveis na minha vida.

A minha orientadora Prof^ª Dra Fabiana Paim Rosa pela atenção, honestidade, competência e profissionalismo no desempenho do trabalho.

Ao coordenador do mestrado Jean Nunes pela atenção e disponibilidade.

A vice-coordenadora e professora Maria Cristina Cangusso, "Tininha" pela sua visão ética e humanística, pelo carinho, dedicação e profissionalismo.

Aos professores da pós-graduação, a quem tenho respeito e admiração, meus sinceros agradecimentos pelo convívio e por contribuírem na minha formação.

Ao Dr. Fryon pela disponibilidade nos laboratórios do IPAC e do IIS, como também, pela leitura e fotografia das lâminas histológicas.

Ao Prof. Dr. Alexandre Malta Rossi, à Dra Maria Helena Leão, à Sílvia Santos e aos demais pesquisadores responsáveis pela confecção dos biomateriais.

A Prof^a Maria Eugênia Leite Duarte do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) pelo indispensável auxílio no protocolo de processamento histológico para inclusão em resina.

Ao Prof. Antonio Agredo, ao médico veterinário Florestes responsáveis pelo biotério da UFRJ, por viabilizar os animais e o espaço físico para o desenvolvimento da etapa experimental.

Aos meus queridos colegas e amigos da pós-graduação pela honra de conhecê-los e compartilhar momentos importantes no decorrer do curso e no qual espero manter o vínculo de amizade.

Aos meus queridos amigos Fábio, Isabela, Livia, pelo incentivo, carinho e auxílio durante as etapas experimentais. O nosso convívio nesse período me trouxe imensa alegria e o início de uma bela amizade.

Aos colegas do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais no ICB da UFRJ pela simpatia e apoio nos momentos de convívio compartilhados.

Ao Júnior, técnico do biotério, pela colaboração e dedicação no cuidado com os animais.

As técnicas, Cristina, Anna Clara e Beth, pela confecção das lâminas histológicas.

Aos membros do Comitê de Ética da UFRJ pela aprovação do projeto e a secretária Verônica pela atenção dedicada e receptividade.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado, que viabilizou a realização da pesquisa.

RESUMO

A bioengenharia tecidual tem possibilitado o desenvolvimento de biomateriais e técnicas inovadoras capazes de restituir a qualidade de vida aos pacientes com perdas ósseas, após a remoção de grandes tumores ósseos, traumas e em algumas doenças metabólicas. Dentre os biomateriais empregados nas terapias regenerativas destacam-se as biocerâmicas sintéticas, na forma de microesferas. Estas microesferas constituem um arcabouço que possibilita, no interstício formado entre as esferas, a difusão de fatores de crescimento e angiogênicos, a migração de células osteogênicas essenciais à regeneração deste tecido. Ainda, apresentam características físico-químicas semelhantes ao componente inorgânico do tecido ósseo e biocompatibilidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a regeneração de defeitos ósseos críticos, em calvária de rato. Para tanto, utilizou-se uma amostra composta de 60 animais, dividida em quatro grupos: GI – defeito sem biomaterial, preenchido por coágulo; GII – microesferas de hidroxiapatita e alginato (HA - Alg); GIII – microesferas de hidroxiapatita dopadas com estrôncio (HASr); GIV – microesferas de hidroxiapatita dopadas com estrôncio e alginato (HASr - Alg), avaliados aos 15, 45 e 120 dias de pós-operatório. As análises histológicas, por microscopia de luz, demonstraram neoformação óssea mais evidente no grupo GII em todos os pontos biológicos quando comparado aos demais grupos. As microesferas implantadas nos grupos III e IV apresentaram maior fragmentação quando comparadas com as do grupo II, provavelmente devido à adição de estrôncio à estrutura da HA. A neoformação óssea caracterizada pela osteocondução foi observada de permeio a esses fragmentos do biomaterial. No grupo III, a ausência do alginato tornou as microesferas mais porosas, com formação de septos de tecido conjuntivo e células fusiformes no interior das microesferas. Em conclusão, os biomateriais apresentaram potencial osteogênico e osteocondutor formando um arcabouço tridimensional que favoreceu a neoformação óssea. A HA associada ao alginato apresentou características histológicas mais evidentes quanto a biocompatibilidade e a osteogênese, quando comparada a HA dopada com estrôncio.

Palavras-chave: Bioengenharia tecidual, defeitos ósseos críticos, hidroxiapatita, estrôncio, alginato.

ROLIM, Ana Emília Holanda. Assessment of Hydroxyapatite Microspheres, Doped or not with Strontium, in Repair of Critical Bone Defect in Rat Calvaria. (Bahia, Brazil) 91pp. ill. Master Dissertation – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador 2010.

ABSTRACT

The bioengineering tissue has allowed the development of biomaterials and innovative techniques capable of restoring the quality of patient's life with loss bone after the removal of large tumors, trauma and some metabolic diseases. Among the biomaterials used in regenerative therapies highlight the synthetic bioceramics in the form of microspheres. These microspheres constitute a framework that allows, in interstice formed between the spheres, the diffusion of growth factors and angiogenic, migration of osteogenic cells essential for tissue regeneration. Still, have physical and chemical characteristics similar to the inorganic component of bone tissue and biocompatibility. The objective of this study was to evaluate the regeneration of critical bone defects in rat calvaria. We used a sample consisting of 60 animals, divided into four groups: GI - defect without biomaterial, filled with clot, GII - microspheres of hydroxyapatite and alginate (HA - Alg); GIII - hydroxyapatite microspheres doped with strontium (HASr); GIV - hydroxyapatite microspheres doped with strontium and alginate (HASr - Alg), evaluated at 15, 45 and 120 days of postoperative. Histological analysis by light microscopy showed bone neoformation more evident in GII for all organic parts when compared with other groups. The microspheres implanted in groups III and IV showed greater fragmentation when compared with group II, probably due to the addition of strontium into the HA structure. The bone neoformation characterized by osteoconduction was observed between these biomaterial fragments. In group III, the absence of alginate became the microspheres more porous, with septum formation of conjunctive tissue and fusiform cells within the microspheres. In conclusion, the biomaterials showed a potential osteogenic and osteoconductive to form a three-dimensional framework that promoted the bone formation. The HA associated associated with alginate showed histological features more evident as the biocompatibility and osteogenesis, when compared to HA doped with strontium.

Key- words: Bioengineered tissue, bone defects critics, hydroxyapatite, strontium, sodium alginate.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm	Micrometro
ACP	Fosfato de cálcio amorfo
<i>ad libitum</i>	Expressão latina que significa “à vontade”
Bm	Biomaterial
BMP	Proteína Óssea Morfogenética
Bo	Borda óssea
Cbfa1	Gene envolvido na osteogênese
CBPF	Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
Cf	Células fusiformes
DFDBA	Aloenxerto Ósseo Desmineralizado Liofilizado
EDTA	Ácido Etileno Diamina Tetra Acético
Fc	Fibras colágenas
FDDBA	Aloenxerto Ósseo Liofilizado
HA	Hidroxiapatita
HA - Alg	Hidroxiapatita associada ao alginato
HASr	Hidroxiapatita dopadas com estrôncio
HASr - Alg	Hidroxiapatita dopadas com estrôncio associada ao alginato
HCl	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilina e Eosina
ICS	Instituto de Ciências da Saúde

IGF-1	Fator do Crescimento do Tipo Insulina 1
LBTB	Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais
Ld	Linhas de deposição cíclica de osso
M	Microesferas
Me	Medula óssea
mL	Mililitro
mm	Milímetros
Mn	Células mononucleares
Mo	Matriz osteóide
Neo	Neoformação óssea
∅	Diâmetro
OH⁻	Hidroxila
Ob	Osteoblasto
Obj	Objetiva
Oc	Osteócito
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PGE	Prostaglandina E
PGF_{2α}	Prostaglandina F- 2α
PIFG	Picrosírius Red
Rc	Região cutânea
Rdm	Região da dura máter
Ri	Reação inflamatória
rpm	Rotações por minuto
Tcd	Tecido conjuntivo denso

Tcf	Tecido conjuntivo fibroso
Tcfx	Tecido conjuntivo frouxo
TG	Tricrômico de Goldner
TGF-β1	Fator de Crescimento Transformante Beta 1
Tm	Tecido mineralizado
TTCP	Tetra fosfato tricálcico
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
UFBA	Universidade Federal da Bahia
Vc	Veia central
Vcs	Vaso sanguíneo capilar
α-TCP	Alfa-fosfato tricálcio
β-TCP	Beta-Fosfato tricálcico

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Arranjo tridimensional da hidroxiapatita.	36
Figura 2	Estrutura molecular da hidroxiapatita.	36
Figura 3	Estrutura da hidroxiapatita dopada com estrôncio.	37
Figura 4	Estrutura polimérica do alginato.	44
Figura 5	Seqüência cirúrgica e implantação dos biomateriais.	54
Figura 6	Desenho esquemático de defeito crítico em calvária de rato.	57
Figura 7	Padronização dos espécimes e áreas de corte.	57
Figura 8	Preparação dos espécimes para inclusão em resina e parafina.	57
Fotomicrografia 1	GI-15 dias (a) Região central do defeito preenchido por fibras colágenas (Fc) do tecido conjuntivo frouxo (Tcf) – HE - Obj.1x; (b) Reparo ósseo restrito a borda óssea, com neoformação óssea (Neo) - Tricômico de Goldner – Obj.10x.	59
Fotomicrografia 2	GI-45 dias: Região central do defeito preenchido por tecido conjuntivo denso (Tcd) – HE – Obj.1x.	59
Fotomicrografia 3	GI-120 dias: (a) Neoformação óssea restrita as bordas ósseas (Bo). Tecido conjuntivo fibroso com espessura aquém a da borda óssea – PIFIG - Obj.1x; (b) Tecido conjuntivo bastante delgado (Tcd) nas demais áreas do defeito – PIFIG - Obj.1x.	59
Fotomicrografia 4	GII-15 dias: Região central do defeito próximo a veia central (Vc). Tecido mineralizado (Tm) envolvendo microesferas do biomaterial (Bm), mais evidente na região da dura máter (Rdm) – PIFIG - Obj.10x.	62
Fotomicrografia 5	GII-45dias: (a) Região da borda óssea (Bo). Neoformação óssea (Neo) com fragmentos do biomaterial – PIFIG - Obj.1x; (b) Região central do defeito com microesferas fragmentadas (Bm) e presença de tecido mineralizado (Tm) – PIFIG - Obj.1x; (c) Detalhe da fotomicrografia anterior, com fragmentação das microesferas e aposição de tecido mineralizado. Presença de células fusiformes	62

	(Cf), osteoblastos ativos (Ob) e osteócitos (Oc) – HE - Obj.20x.	
Fotomicrografia 6	GII-120 dias (a) Microesferas fragmentadas (Bm) e incorporadas ao tecido neomineralizado (Tm) – HE - Obj.1x; (b) Detalhe da fotomicrografia anterior. Presença de osteócitos (Oc) e tecido conjuntivo frouxo (Tcfx), delgado – HE - Obj.10x.	63
Fotomicrografia 7	GII-120dias: (a) Tecido conjuntivo frouxo (Tcfx) abundante na região do tecido cutâneo – PIFIG - Obj.1x. (b) Tecido ósseo neomineralizado (Neo) e fragmentos das microesferas incorporadas a esse tecido – PIFIG - Obj.1x; (c) Tecido ósseo mais compacto e adensado na região da dura máter (Rdm) e tecido conjuntivo frouxo na região do tecido cutâneo (Rc) – PIFIG - Obj.10x.	63
Fotomicrografia 8	GIII-15 dias: (a) Microesferas do biomaterial (M) preenchendo a região do defeito dispostas em duas a três camadas e tecido conjuntivo frouxo (Tcfx) de permeio, com abundante infiltrado mononuclear difuso; matriz osteóide (Mo) em torno de algumas microesferas – HE - Obj.10x; (b) Tecido conjuntivo fibroso (Tcf) – PIFIG - Obj.1x. (c) Neoformação óssea; osteocondução – Tricrômico de Goldner - Obj.1x.	65
Fotomicrografia 9	GIII-45 dias: (a) Discreto infiltrado inflamatório mononuclear difuso (Ri) entre os fragmentos das microesferas (M); células fusiformes (Cf) – HE - Obj.20x; (b) Capilares sanguíneos (Vcs); células fusiformes (Cf), células mononucleares (Mn) – HE - Obj.20x.	65
Fotomicrografia 10	GIII-120 dias: (a) Esferas parcialmente fragmentadas, delgados septos de tecido conjuntivo frouxo; microesferas circundadas por tecido mineralizado; osteócitos (Oc); Fibras de colágeno (Fc) – HE - Obj.10x; (b) Tecido mineralizado (Tm); medula óssea (Me) – HE - Obj.10x.	66
Fotomicrografia 11	GIII-120 dias: (a) Tecido conjuntivo frouxo de permeio as microesferas do biomaterial – Tricrômico de Goldner – Obj.1x; Corte em resina; (b) Fibras de colágeno (Fc), capilares sanguíneos (Vcs) - Tricrômico de Goldner - Obj.10x. Corte em resina; (c) Tecido mineralizado (Tm) em torno das microesferas - Tricrômico de Goldner - Obj.10x. Corte em resina.	66
Fotomicrografia 12	GIV-15dias: (a) Microesferas dispostas em duas ou três camadas, parcialmente fragmentadas em toda a extensão e espessura do defeito – HE - Obj.1x; (b) Tecido mineralizado de permeio as microesferas próximas às bordas ósseas – HE - Obj.1x.	68

- Fotomicrografia 13** GIV-45 dias: **(a)** Borda óssea com ossificação reparativa estável, com osteócitos (Oc); microesferas (Bm) fragmentadas – HE - Obj.10x; **(b)** Tecido conjuntivo frouxo, com deposição de colágeno (Fc) e proliferação de vasos sanguíneos (Vcs) – PIFIG - Obj.10x. **68**
- Fotomicrografia 14** GIV-120 dias: Região próxima a borda óssea. **(a)** Biomaterial fragmentado em tamanhos diminutos – HE - Obj.1x; **(b)** Neoformação óssea e fibras de colágeno (Fc) circundando o tecido mineralizado – PIFIG - Obj.1x. **68**
- Fotomicrografia 15** GIV-120 dias: **(a)** Tecido ósseo neoformado, mineralizado e estável; tecido conjuntivo frouxo com áreas esparsas de fibras colágenas – PIFIG - Obj.10x; **(b)** Biomaterial fragmentado envolto por tecido ósseo neoformado, fibras colágenas – PIFIG - Obj.20x; **(c)** Tecido ósseo maduro com linhas de deposição cíclica de osso (Ld); lacunas de osteócitos; vasos capilares sanguíneos (Vcs) - PIFIG-Obj.20x. **69**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número de animais segundo grupo e pontos biológicos	51
Tabela 2	Processamento histológico para inclusão em resina	56

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 TECIDO ÓSSEO.....	21
2.2 REPARO ÓSSEO E BIOENGENHARIA TECIDUAL.....	24
2.2.1 Osteoindução.....	27
2.2.2 Osteocondução.....	27
2.2.3 Osteopromoção ou Osteoestimulação.....	28
2.3 BIOCERÂMICAS.....	29
2.3.1 Hidroxiapatita (HA).....	35
2.3.2 Hidroxiapatita dopada com estrôncio (HASr).....	39
2.3.3 Alginato (Alg).....	44
3. OBJETIVOS.....	49
3.1 OBJETIVO GERAL.....	49
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
4.1 AMOSTRA.....	50
4.2 BIOMATERIAIS.....	51
4.3 TÉCNICA CIRÚRGICA.....	52
4.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	55
5. RESULTADOS.....	58
5.1 GI - CONTROLE.....	58

5.2 GII - HIDROXIAPATITA ASSOCIADA AO ALGINATO (HA – Alg)..	60
5.3 GIII - HIDROXIAPATITA DOPADA COM ESTRÔNCIO (HASr).....	64
5.4 GIV - HIDROXIAPATITA DOPADA COM ESTRÔNCIO ASSOCIADA AO ALGINATO (HASr- Alg)	67
6. DISCUSSÃO	70
7. CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS	81
ANEXO	90

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A necessidade de desenvolvimento, por parte dos pesquisadores, de materiais que contribuam com o reparo do tecido ósseo, destruído por traumas, doenças metabólicas e degenerativas, nas anormalidades congênitas tem estimulado o aprimoramento técnico-científico de biomateriais, como substitutos ósseos.

Os enxertos ósseos autógenos são considerados os de primeira escolha na regeneração do tecido ósseo, devido às suas propriedades osteogênicas de osteoindução, osteocondução e osteoestimulação. Além disto, estes enxertos não transmitem doenças infecciosas e não desencadeiam reações imunológicas. No entanto, apresentam disponibilidade restrita, necessidade de dois procedimentos cirúrgicos, riscos de morbidade e infecção no sítio doador e receptor, e de reabsorções progressivas (ZEBEU e MERCADANTE, 2008).

Diante destes inconvenientes, o desenvolvimento de biomateriais que contemplem características de composição orgânica e mineral, biocompatibilidade, previsibilidade de regeneração, ausência de riscos trans-operatórios e/ou seqüelas, e boa aceitação por parte do paciente, tem sido objeto de estudos de diversas pesquisas (BEST e outros, 2008).

Dentre os substitutos ósseos empregados nas áreas da ortopedia, implantodontia, periodontia, cirurgia plástica reconstrutiva e bucomaxilofacial, as biocerâmicas são uma classe de biomateriais que têm apresentado resultados clínicos promissores (MANGANO, BARTOLUCCI, MAZZOCCO, 2003; JHON, WENZ, 2004; SHIMMING, SCHELZEISEN, 2004; SCHWARZ e outros, 2008).

Estas cerâmicas são indicadas para uso clínico quando a perda tecidual alcança dimensões que impossibilita o reparo espontâneo. Contudo, se a área lesionada for extensa e crítica ao reparo, suas características físico-químicas podem

contribuir de forma limitada com a regeneração dos defeitos, finalizando o reparo com a formação de tecido fibroso. Na tentativa de amenizar estas limitações, torna-se imperioso aperfeiçoar estes biomateriais (BEST e outros, 2008).

Estes biomateriais podem ser produzidos na forma de blocos, pós, discos, cilindros e microesferas. Estas últimas quando implantadas por sistemas injetáveis, o procedimento cirúrgico é minimamente invasivo e possibilita o preenchimento de cavidades ósseas (CHESMEL e outros, 1998; MARCACCI e outros, 2007). Além disto, favorecem a difusão de nutrientes e fatores de crescimento essenciais às atividades celulares, a migração celular, neovascularização e síntese de matriz extracelular (MEC) no interstício formado pela disposição espacial das microesferas. Em defeitos ósseos com dimensões críticas, a vascularização insuficiente pode resultar na formação de tecido fibroso (O'KEEFE e outros, 2006; KLENKE e outros, 2008).

Durante a preparação destas microesferas pode-se alterar sua topografia, porosidade e composição química, por meio da adição de íons metálicos e hidrocolóides, como por exemplo, o alginato em sua estrutura. Esta adição promove a quimiotaxia de macrófagos e fibroblastos, favorece a adesão celular e a adsorção de proteínas, o que dessa forma viabiliza a proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras. Este agente ligante é biodegradável, biocompatível, bacteriostático e possui propriedades hemostáticas (MANDELBAUM, DI SANTIS, MANDELBAUM, 2003; HSIONG, MOONE, 2006).

Dentre as biocerâmicas utilizadas na regeneração dos defeitos ósseos, a hidroxiapatita (HA) tem se destacado devido à sua semelhança com o principal componente da fase mineral do tecido ósseo, por não apresentar risco de transmissão de doenças, boa biocompatibilidade, união direta com o tecido ósseo, excelente osteocondutividade (KAWACHI e outros, 2000; DOURADO, 2006).

Esta cerâmica pode ser produzida com diferentes características físico-químicas, de acordo com sua aplicação clínica, haja vista sua habilidade em efetuar substituições isomórficas mantendo sua estrutura hexagonal. No entanto, a sua solubilidade, a estabilidade térmica e a reatividade superficial são modificadas, e consequentemente, o seu comportamento *in vivo* também (DOURADO, 2006).

Alguns estudos têm evidenciado que a substituição do cálcio presente na estrutura da HA por estrôncio estimula a regeneração óssea (GRYNPAS e MARIE, 1990; NI e outros 2006; XUE e outros 2006; DAGANG, KEWEI, YOUNG, 2008;

LANDI e outros 2008; WANG e outros, 2008). Acredita-se que o seu efeito seja dose dependente e que a administração de baixas doses (0,19%) é capaz de estimular a formação e a mineralização óssea (VERBECKMOES, De BROE, D'HAESE, 2003; WONG e outros, 2004; WANG e outros, 2008).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial osteogênico de três diferentes microesferas de hidroxiapatita, HA e alginato (HA - Alg), HA dopadas com estrôncio (HASr) e HA dopada com estrôncio e alginato (HASr - Alg), implantadas em defeitos ósseos críticos em calvária de ratos.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é dinâmico, capaz de remodelar-se dependendo da força a ele aplicada, sendo que a pressão leva à sua reabsorção, enquanto a tração aplicada resulta no desenvolvimento de osso novo. O esqueleto é uma estrutura básica de sustentação e proteção dos órgãos vitais do corpo, além de, permitir quando associados aos músculos e articulações, a realização dos movimentos. Além disso, é um reservatório para muitos minerais do corpo, dentre estes, 99% do cálcio do organismo (LIND e outros, 2000; PARK e outros, 2009).

Macroscopicamente, este tecido apresenta-se como osso cortical e osso medular, distintos não apenas na forma estrutural, mas nos aspectos funcionais. O osso cortical (compacto) possui uma matriz colagênica organizada em forma de lamelas concêntricas, geralmente ao redor de um canal vascular central, constituindo o sistema de Havers. Os canais centrais contêm vasos sanguíneos e nervos, se comunicam entre si e com a cavidade medular óssea. Esta intercomunicação são os canais de Volkmann. No osso esponjoso (medular), a matriz apresenta-se mais porosa e organizada em trabéculas (HING, 2004; MENDONÇA, 2005).

O osso cortical, é mais compacto, tem maior resistência mecânica que permite atuar na proteção dos órgãos internos do corpo, é encontrado nas diáfises dos ossos longos e na superfície externa dos ossos chatos. Enquanto que o osso esponjoso ou medular, atua nas funções metabólicas, delimita espaços intertrabeculares, a cavidade medular, que abriga a medula óssea, um órgão

hematopoiético, é também reservatório de gordura no organismo (SÁNDOR, 2003; SOLTAN, SMILER, CHOI, 2009).

Segundo Marx e Garg (1998), o tecido ósseo pode ser denominado histologicamente como: trabeculado, fasciculado, lamelar e composto. O osso trabeculado ou entrelaçado tem papel importante no reparo ósseo, sendo o primeiro tecido a ser formado, com velocidade de formação muito rápida (30-50µm ao dia ou mais), que caracteriza a primeira fase da regeneração óssea, sendo posteriormente reabsorvido e substituído por osso lamelar. Caracteriza-se por apresentar matriz de colágeno desorganizada sem a estrutura lamelar dos sistemas harvesianos, exibindo pouca resistência mecânica; é o tecido predominante durante a fase de desenvolvimento pré-natal, por isso denominado osso embrionário, um termo incorreto visto que os adultos têm habilidade de formar este tipo de osso.

O osso fasciculado é encontrado na inserção de ligamento das articulações e adjacente ao ligamento periodontal. Esse osso está presente na fase I da remodelação óssea sendo rapidamente depositado, reabsorvido e substituído, na fase II, pelo osso lamelar maduro. (MARX, GARG, 1998; MENDONÇA, 2005).

O osso lamelar maduro apresenta alta resistência mecânica, uma estrutura altamente organizada de fibras colágenas e cristais de minerais, porém, sua velocidade de formação é lenta, em torno de 0,6µm a 1µm ao dia. Este osso, também denominado como tecido ósseo secundário, é constituído pelos canais de Volkman, sistema de Harvers, sistemas intermediários, sistemas circunferenciais interno e externo (FLACH e outros, 2008; SOLTAN, SMILER, CHOI, 2009). O termo “tecido ósseo composto” define, na fase de remodelação, o período de transição entre o osso imaturo ou trabecular (osso primário) e o osso maduro ou lamelar (osso secundário).

No tecido ósseo há, na matriz extracelular, uma associação de componentes inorgânicos e orgânicos, o que o torna o tecido mais resistente do corpo, porém, com certo grau de elasticidade e resiliência. Os minerais, constituintes deste tecido, são principalmente cristais de hidroxapatita, cerca de 65%. Além destes, outros íons compõem a fase inorgânica do osso, tais como, bicarbonato, sódio, potássio, citrato, magnésio, carbonato, lactato, fluoreto, zinco, bário e estrôncio (TERRA e outros, 2009). A matriz orgânica, que corresponde a 25%, é tipicamente colagênica, especialmente constituída por colágeno tipo I, além de água, cerca de 10%. O colágeno tipo I associa-se a outras proteínas não colagênicas, como osteopontina,

sialoproteínas, osteonectina e osteocalcina, para que haja interação entre células, matriz e fatores de crescimento, na formação tridimensional do tecido ósseo (SÁNDOR, 2003; KNESER e outros, 2006; PARK e outros, 2009).

O osso é um tecido conjuntivo especializado, constituído de três tipos celulares: os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. As células mesenquimais se diferenciam em osteoblastos capazes de sintetizar a matriz extracelular rica em colágeno e proteínas colagênicas, denominada matriz osteóide. Esta matriz é mineralizada através da deposição de cristais de hidroxapatita (HA) e de outros íons. Os osteoblastos aprisionados nessa matriz após a mineralização tornam-se osteócitos. Estes osteócitos interagem entre si dentro da matriz mineralizada na manutenção da homeostase do tecido ósseo, seja através do fluxo de íons, nutrientes ou de hormônios. Os osteoclastos são derivados de células da linhagem monocítico-fagocitária, são células gigantes multinucleadas, responsáveis pela absorção da matriz extracelular e pela remodelação óssea (MANDELBAUM, Di SANTIS, MANDELBAUM, 2003; BARRÈRE, BLITTERSWISWIRK, GROOT, 2006; MIGUEL, 2008; PARK e outros, 2009).

Os osteoblastos secretam proteínas colagênicas especialmente, colágeno tipo I, que corresponde a 90 % da matriz orgânica e proteínas não colagênicas, tais como: sialoproteína óssea, osteopontina, osteonectina, osteocalcina, BMPs, proteoglicanas e outras. A diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos e a sua proliferação e regulação são mediadas por fatores locais, autócrinos e sistêmicos. Os osteoblastos possuem receptores para hormônios sistêmicos, tais como: o paratormônio, estrógeno, glicocorticóides, insulina, hormônios tiroideanos, vitamina D3 e para fatores locais como prostanóides (PGE, PGF_{2α}), citocinas (TGF-β, BMPs, FGFs, IGF-1, PDGF) e interleucinas (MENDONÇA, 2005).

Exceto nas articulações sinoviais, o osso é recoberto, na sua face externa, pelo perióstio, que consiste em uma camada externa de tecido conjuntivo denso e de uma camada interna, que contém células osteoprogenitoras (osteogênicas), importantes no reparo ou na neoformação óssea. As cavidades internas do osso são revestidas por endóstio, um tecido conjuntivo delgado, constituído de uma única camada de células osteoprogenitoras e de osteoblastos (HSIONG, MOONEY, 2006; MIGUEL, 2008).

2.2 REPARO ÓSSEO E BIOENGENHARIA TECIDUAL

O tecido ósseo, ao ser lesado, pode reparar-se retomando sua capacidade funcional sem cicatrizes ou deformidades. O mecanismo deste padrão de reparo é considerado uma recapitulação da osteogênese embrionária e do que ocorre no período de crescimento. Este mecanismo de reparo ósseo é influenciado pelo suplemento vascular, tensão de oxigênio, estabilidade dos fragmentos ósseos, ativação de fatores de crescimento, diferenciação e proliferação de células osteoprogenitoras (BUCKWALTER, GLIMCHER, COOPER, 1995). Durante o desenvolvimento embrionário, a ossificação pode ocorrer de duas maneiras: intramembranosa e endocondral. O primeiro osso formado é denominado primário, não lamelar, é depois reabsorvido e substituído por osso secundário, lamelar (SÁNDOR, 2003).

Em defeitos ósseos com dimensões pequenas, não crítico e, em casos de fratura, ocorre a regeneração completa sem deixar cicatriz fibrosa. Há o rompimento de vasos sanguíneos e formação do coágulo. Com isso a circulação sanguínea é interrompida, e as células ósseas no sítio do defeito necrosam. Em resposta às células ósseas necrosadas ocorrem edema e inflamação, o que produz restos celulares adicionais (LAMANO-CARVALHO, 2007). Os capilares sanguíneos crescem para dentro do coágulo; fagócitos (neutrófilos e macrófagos) e osteoclastos iniciam a remoção de tecido necrótico, dentro e em torno do hematoma. Há, em seguida, a formação do calo cartilaginoso. Dentro de 48 horas após o ferimento ocorre aumento da atividade mitótica da camada osteogênica do periósteo, do endósteo e das células indiferenciadas da medula óssea. Ocorrem então, sob influência de fatores de crescimento, a angiogênese, e a migração de células osteogênicas do endósteo (MACNEILL e outros, 1999; LIND e outros, 2000).

As células osteogênicas da camada mais profunda do periósteo se diferenciam em osteoblastos e começam a elaborar tecido ósseo ao redor do ferimento, semelhante a uma ossificação intramembranosa. Embora os capilares estejam crescendo, seu ritmo de proliferação é muito mais lento do que o das células osteogênicas. Assim, as células osteogênicas, no meio da massa em proliferação, estão agora sem um leito capilar abundante. Isto resulta numa baixa oxigenação, e estas células transformam-se em células condrogênicas, originando

condroblastos que formam cartilagem. A camada mais externa das células osteogênicas em proliferação, aquelas adjacentes à camada fibrosa do periósteo, que têm alguns capilares próximos, continua a proliferar como células osteogênicas. Os calos formados nas extremidades de cada fragmento se fundem, garantindo, assim, a união dos mesmos (SÁNDOR, 2003; SOLTAN, SMILER, CHOI, 2009).

As áreas mais próximas ao tecido ósseo saudável são bem vascularizadas. Nestas áreas, as células osteogênicas proliferam e se diferenciam em osteoblastos. Estes osteoblastos começam a produzir o tecido ósseo primário e há formação do calo ósseo. Esse osso primário será remodelado e substituído por osso secundário, ao mesmo tempo em que o calo é reabsorvido. A reparação óssea envolve a formação da cartilagem, ossificação intramembranosa, e por fim ocorre a ossificação endocondral (LIND e outros, 2000; SOLTAN, SMILER, CHOI, 2009).

A mineralização do tecido ósseo requer uma concentração adequada de íons cálcio e fosfato, presença de matriz a ser calcificada, agentes de nucleação e controle de agentes reguladores promotores ou inibidores (ALMEIDA e outros, 2000).

O reparo ósseo pode ser melhor compreendido usando como modelo o reparo através do uso de substitutos ósseos. Nesse sentido, é importante diferenciar termos como enxerto e implante. Um enxerto pode ser definido como um material transplantado que contém células mesenquimais indiferenciadas, células osteogênicas e fatores de crescimento importantes na regeneração. Em um implante há ausência de células vivas. Um enxerto ósseo autógeno, obtido de áreas doadoras do próprio indivíduo, tem células com capacidade de formar tecido ósseo, ou seja, células osteogênicas, que permitem também, a osteointegração deste ao tecido circunjacente. Os osteoblastos, provenientes do endósteo, e as células hematopoiéticas são capazes de sobreviverem por aproximadamente cinco dias após o transplante, devido a sua capacidade de absorver nutrientes (SÁNDOR, 2003; MENDONÇA, 2005; AUER e outros, 2007).

Em torno de algumas horas após a colocação do enxerto se iniciará o processo de regeneração. A degranulação das plaquetas possibilita a liberação de potentes fatores de crescimento denominados (PDGF) fatores de crescimento derivados de plaquetas, de seus grânulos alfa e que são posteriormente transformados em outro fator de crescimento TGF- β 1 (HISIONG, MOONEY, 2006). As células endoteliais orientadas pelos PDGF iniciam um crescimento de capilares

em direção ao centro da lesão, essenciais para a nutrição e oxigenação das células osteogênicas (KLENKE e outros, 2008). Depois disso, os osteoblastos provenientes do endóstio e as células hematopoiéticas são estimulados a iniciar mitoses aumentando dessa forma o número de células. Além disso, estas células começam a produzir matriz osteóide através de mediadores TGF- β 1 que atuam em seus receptores celulares (LIND e outros, 2000; SOLTAN, SMILER, CHOI, 2009).

A influência de fatores de crescimento provenientes do enxerto é substituída pela ação local dos macrófagos. Estes macrófagos eficientemente sintetizam fatores de crescimento que serão importantes na regulação do reparo ósseo. Em aproximadamente duas semanas o enxerto demonstra uma completa revascularização (SOLTAN, SMILER, CHOI, 2009). O tecido ósseo transplantado possui células-tronco, provenientes do endóstio, capazes de se diferenciarem em osteoblastos e estes formarão a matriz osteóide. Isto resultará na neoformação óssea por aposição na superfície do enxerto ou crescendo no interior do mesmo. Com a revascularização do enxerto, as células mesenquimais indiferenciadas são atraídas para o local da lesão, e poderão se diferenciar em osteoblastos, atuar como verdadeiras unidades formadoras de osso, acelerando o processo de regeneração óssea tecidual (SÁNDOR, 2003; SOLTAN, SMILER, CHOI, 2009).

O osso neoformado, sem a fase de deposição cartilaginosa inicial, servirá de referência para o tecido ósseo em formação. Este tecido é extremamente celular e desorganizado, constituído por uma matriz osteóide. O tecido ósseo neoformado passará por um fenômeno de remodelação, assumindo uma estrutura lamelar compacta. O osso lamelar resultante será menos celular, mais mineralizado e altamente organizado. Na medida em que ocorre maturação óssea, nova matriz será formada. Esta maturação é acompanhada como uma resposta às demandas físicas sobre o osso. A fase de remodelação é importante para que haja o retorno das atividades fisiológicas de todo o esqueleto (SÁNDOR, 2003; MENDONÇA, 2005; AUER e outros, 2007).

Portanto, a neoformação de osso compacto é obtida por mecanismos que ocorrem simultaneamente: consolidação de osso trabecular fino, formação, a partir do perióstio e da medula óssea, das lamelas concêntricas dos ósteons e de canais vasculares; remodelamento de osso compacto existente e formação de ósteons secundários (BOURNE, 1972 citado por PRADO da SILVA, 2007).

O reparo e a neoformação óssea promovida pelos substitutos ósseos ocorrem de acordo com três princípios osteogênicos: a osteoindução, a osteocondução e a osteoestimulação (LIND e outros, 2000).

2.2.1. Osteoindução

A osteoindução é um processo de neoformação óssea a partir da indução, por meio de fatores de crescimento, plasma rico em plaquetas entre outros agentes indutores de células osteoprogenitoras no leito receptor. Estes agentes indutores atuam na diferenciação e proliferação de osteoblastos, osteoclastos, e na angiogênese e estes são fatores importantes para o reparo e a remodelação óssea. Este fenômeno, primeiramente descrito em trabalhos clássicos de Urist (1965), em que matrizes ósseas foram capazes de osteoinduzir a formação de osso no interior do tecido muscular, nos estudos experimentais em diversas espécies de animais. Em estudos posteriores, com extratos específicos de osso, tanto cortical quanto esponjoso, descobriu-se que as BMPs (proteínas morfogenéticas ósseas), uma nova classe de glicoproteínas, atuam na osteoindução (URIST, DeLANGE, FINERMAN, 1983; LIND e outros, 2000; HISIONG, MOONEY, 2006).

2.2.2. Osteocondução

Na osteocondução, o enxerto ou o bioimplante são estruturas de suporte, arcabouço para a neoformação óssea, através dos quais o crescimento de capilares e células osteoprogenitoras ocorre para o interior de um leito ósseo, de permeio, ou através dos mesmos. A osteocondução ocorre, por exemplo, no uso de barreiras físicas, as membranas naturais ou sintéticas, empregadas na regeneração óssea guiada (BOSCH, MELSEN, VARGERVIK, 1995; HABIBBOVIC e outros, 2008).

2.2.3 Osteopromoção ou Osteoestimulação

Ocorre quando células osteogênicas transplantadas viáveis produzem novo osso no sítio do defeito. As células mesenquimais pluripotentes presentes no leito do defeito são estimuladas a se diferenciarem em osteoblastos e a se proliferarem. Em seguida, com a maturação dos osteoblastos, há formação da matriz óssea que será remineralizada e remodelada para constituir o novo osso. Este processo de diferenciação é mediado por BMPs, encontradas na matriz do enxerto ósseo, e por outros fatores de crescimento (LIND e outros, 2000). Embora algumas células do enxerto ósseo possam sobreviver ao transplante, as principais fontes de células para esta fase são as células osteogênicas e osteoprogenitoras do hospedeiro.

Os enxertos autógenos são considerados ideais por promoverem osteoindução e osteoestimulação, além de, serem bem tolerados pelo paciente. No entanto, o uso apenas dos enxertos autógenos não é viável em alguns casos, tais como, disponibilidade em pequena quantidade, necessidade de um procedimento cirúrgico cruento, período de convalescência, riscos de morbidade e de infecções do sítio doador, seqüelas (dor, alteração de sensibilidade e cicatrizes), riscos de reabsorções progressivas, dificuldade de armazenamento, necessita de um tempo cirúrgico maior, além de ter sua qualidade dependente da idade e das condições gerais do indivíduo (ZEBEU e MERCADANTE, 2008).

Em defeitos críticos, há grande perda de substância óssea, que ocorrem por exemplo, em lesões traumáticas, neoplasias, anomalias de desenvolvimento, fraturas extensas, doenças metabólicas e degenerativas. Nestes defeitos, o potencial regenerativo é restrito as bordas, há formação de tecido cicatricial fibroso nas demais áreas, acarretando em alterações fisiológicas, estéticas e funcionais (BOSCH, BOSCHMELSEN, VARGERVIK e outros, 1998; LIM, LEE, YEO, 2001; MEINEL e outros, 2005; CANCEDDA, GIANNONI, MASTROGIACOMO, 2007).

Na literatura, os defeitos em calvária de rato com diâmetro de 8 mm são considerados críticos devido a regeneração limitar-se as bordas ósseas do defeito, em média 3mm, sendo o remanescente preenchido por tecido fibroso (TAKAGI, URIST, 1982; SCHMITZ, HOLLINGER, 1986; CHESMEL e outros, 1998; FERREIRA e outros, 2004; MARINS e outros, 2004; MENDONÇA, 2005; BARRETO, 2006;

KNESER e outros, 2006; MIGUEL e outros, 2006; BARRETO, 2008). Alguns autores realizaram experimentos com defeitos com dimensões de 4mm (MULLIKEN, GLOWACKI, 1980; MEINEL et al 2008), 5mm (BOSCH, MELSEN, VARGERVIK, 1995; BOSCH, MELSEN, VARGERVIK, 1998; CACCIAFESTA e outros, 2001) e 6mm (BRUNEL e outros, 1996) no entanto, a área residual é pequena, podendo ocorrer a reparação completa do defeito. Nesses casos, o uso de biomateriais osteocondutores não seria avaliado de forma adequada, nem tampouco a capacidade de osteoindução destes ou das técnicas regenerativas (MIGUEL, 2008).

Se o processo de reparação óssea se tornará mais complexo ou não ocorrerá totalmente, um substituto ósseo será necessário para que haja neoformação óssea em toda a área do defeito (SCHMITZ, HÖLLINGER, 1986).

Os biomateriais utilizados no reparo de defeitos críticos devem ser biodegradáveis, osteocondutores e osteoindutores (YONEDA e outros, 2005). Dessa forma a HA tem demonstrado propriedades osteocondutoras importantes nesse tipo de defeito (PARK e outros, 2009).

Quando a reparação óssea não é totalmente alcançada, ocorre em 60% dos casos de insucesso, fraturas nas regiões do implante, associadas com a magnitude dos processos biológicos tais como: reabsorção osteoclástica, com a prevalência de microfraturas e a diminuição da densidade óssea mineral tanto no aloenxerto cortical quanto no medular (CANCEDDA, GIANNONI, MASTROGIACOMO, 2007).

Nesses casos pode ter ocorrido o deslocamento do biomaterial no sítio de defeito. A escolha provavelmente não foi a mais adequada ao caso clínico, ou ainda, a depender da localização do defeito, como em áreas pobres em suprimento sanguíneo, nutrientes e fatores de crescimento indispensáveis ao reparo não estiveram efetivamente presentes (HISING, MOONEY, 2006). Outros fatores relacionados às características do próprio biomaterial escolhido também influenciam nos resultados (LEGEROS, LEGEROS, 1996; LONG, 2008).

2.3 BIOCERÂMICAS

As pesquisas em bioengenharia tecidual com o uso de biomateriais, dentre estes as biocerâmicas, proporcionam novas perspectivas de tratamento nas perdas

de substância óssea. O investimento em pesquisas, nesta área de biotecnologia, cresce a cada dia a fim de possibilitar uma melhor qualidade de vida ao paciente que necessita de alternativas mais eficazes.

Segundo Helmus e Tweden (1995), citado por Prado da Silva (2007), a definição que melhor descreve um biomaterial é uma substância ou combinação de substâncias, sintética ou natural, que possa 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.

Alguns materiais permanecem funcionais por um período máximo de 10 anos, sendo indicadas as cirurgias de revisão destinadas a substituir os implantes danificados (KURELLA, DAHOTRE, 2005). No Brasil há uma crescente demanda interna de biomateriais substitutos ósseos, no entanto, novas pesquisas são necessárias para melhorar a eficácia e reduzir o custo.

Diante das limitações dos substitutos ósseos atuais faz-se necessário a pesquisa e o aprimoramento de biomateriais já existentes. Estes são classificados, quanto a sua origem, em: autógenos ou auto-enxertos, provenientes do mesmo indivíduo, ricos em células que compõem o tecido ósseo cortical ou medular e fatores de crescimento, importantes no reparo ósseo; alógenos, homogêneos ou homoenxertos, provenientes de indivíduos da mesma espécie, armazenados congelados em bancos de ossos, osso fresco, liofilizado – FDBA (Freeze-Dried Bone Allograft), ou ainda, desmineralizado e liofilizado – DFDBA (Demineralized Freeze-Dried Bone Allograft); aloplásticos ou aloenxertos, materiais sintéticos como biovidros, biocerâmicas, polímeros e materiais metálicos; xenógenos, xenoenxertos, heteroenxertos, ou heterólogos, provenientes de outra espécie, sendo o mais utilizado o de origem bovina (NACIONAL INSTITUTE OF HEALTH CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE STATEMENT ON DENTAL IMPLANTS, 1988; HSIONG, MOONEY, 2006).

Os biomateriais são classificados quanto ao tipo em: polímeros sintéticos, metais, cerâmicas e macromoléculas naturais (ex.: biopolímeros) que são manufacturados ou processados para se adequarem à utilização em meio biológico em contato íntimo com proteínas, células, tecidos, órgãos e sistemas orgânicos (KURELLA, DAHOTRE, 2005; CUTTER, MEHRARA, 2006).

Quanto à reação biológica, estes substitutos ósseos devem ser: biotoleráveis, isentos de produzir qualquer resposta biológica adversa local ou sistêmica, ou seja,

o material deve ser atóxico, não-carcinogênico, não-antigênico e não-mutagênico. Além disso, devem apresentar: biocompatibilidade - habilidade de um material desempenhar uma resposta tecidual apropriada em uma aplicação específica; bioatividade - participarem em reações biológicas específicas; apresentarem uma biodisponibilidade e bioestabilidade favorável ao reparo ou a regeneração tecidual através de uma biodegradação controlada, com taxa de reabsorção proporcional à taxa de crescimento ósseo (PRADO da SILVA, 2007; BEST e outros, 2008).

Um biomaterial ideal, de origem não autógena para implante ósseo, tais como as biocerâmicas, deve apresentar características como: ser esterilizável, ser disponível em quantidade suficiente, ser osteoindutor, permitir a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, ser osteocondutor e formar arcabouço capaz de fornecer suporte mecânico ao novo osso (CUTTER, MEHRARA, 2006). Este biomaterial pode ainda funcionar como uma barreira mecânica e impedir o crescimento de tecido fibroso ou invaginação de tecido muscular para dentro do defeito (AABOE, PINHOLT, HJØRTING-HANSEN, 1995).

A utilização de cerâmicas como biomateriais remonta a 1894, quando Dreesman relatou o uso de gesso ($\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$) como um possível substituto para ossos. Este material apresenta uma resistência mecânica muito baixa e é completamente reabsorvido pelo organismo, resultando em uma rápida fragmentação e degradação (KAWACHI e outros, 2000).

O uso de biocerâmicas como substitutos ósseos, reduz o tempo de cirurgia e anestesia, minimiza a perda sangüínea no transoperatório, reduz as potenciais complicações relativas ao local da doação de auto-enxertos como infecções, hematomas, lesões vasculares e nervosas, instabilidade da articulação sacro-ilíaca, deformidade cosmética e a dor crônica pós operatória (MEINEL e outros, 2005).

Nos implantes com biocerâmicas sintéticas a adsorção, de proteínas à sua superfície e de células, é um fator importante quanto a sua influência na biocompatibilidade, na modulação tecidual, na proliferação e na diferenciação celular (BEST e outros, 2008). Há interações entre a superfície do implante e os fluidos do meio biológico. Na interface, acontecem reações em escala molecular do tipo dissolução de íons do material, desorção, adsorção e desnaturação de proteínas (KLEIN e outros, 1993 citado por PRADO DA SILVA, 2007; KARLSSON, 2004). Dessa forma, é importante observar, além das características da microestrutura superficial dos biomateriais, a sua capacidade de osteointegração, isto é, o contato

direto entre o osso e o implante sem a intervenção de tecido mole (KURELLA, DAHOTRE, 2005).

Quanto à interação com os tecidos as biocerâmicas são classificadas em: inertes – não há interações químicas nem biológicas (alumina); porosas - ocorre o crescimento dos tecidos por entre os poros (aluminatos e hidroxiapatitas porosas); bioativas - ocorre uma forte ligação do tipo dipolo entre o osso e o implante (biovidros, hidroxiapatitas e vitro-cerâmicas); reabsorvíveis ou biodegradáveis - as cerâmicas são degradadas e substituídas pelos tecidos neoformados (gesso e fosfato tricálcico) (KAWACHI e outros, 2000; KURELLA, DAHOTRE, 2005).

Segundo Hench (1991), a resposta biológica pode variar com a implantação do biomaterial: se o material for tóxico, os tecidos em torno do implante necrosam; se o implante é atóxico e biologicamente inativo (quase inerte), forma-se um tecido conjuntivo fibroso de densidade variável que encapsula o biomaterial; se este for atóxico e bioativo uma interface entre o biomaterial e o osso poderá ocorrer favorecendo uma osteointegração; se o material é atóxico e solúvel, um tecido em torno dele o substituirá.

As cerâmicas de fosfato de cálcio têm merecido lugar de destaque, entre as denominadas biocerâmicas, por apresentarem ausência de toxicidade local ou sistêmica, ausência de respostas a corpo estranho ou inflamações, e aparente habilidade em integrar-se ao tecido hospedeiro (LONG, 2008). Tais características positivas ao reparo ósseo podem ser explicadas pela natureza química destes materiais, os íons cálcio e fosfato, constituintes também do tecido ósseo, proporcionam o equilíbrio iônico entre o fluido biológico e a cerâmica (BEST e outros, 2008).

Em contato com os fluidos corporais, os fosfatos de cálcio, como por exemplo, a hidroxiapatita, reabsorvem ou transformam-se em outro fosfato de cálcio mais estável (HENCH e WILSON, 1993). A dissolução do biomaterial *in vitro* depende, dentre outros fatores, do pH, do tipo, da concentração e do grau de saturação da solução tampão, bem como, da composição e cristalinidade dos fosfatos de cálcio. A ordem de solubilidade de alguns dos fosfatos de cálcio é a seguinte: Tetracalcium Phosphate (TTCP) > Fosfato de cálcio amorfo (ACP) > alpha-Tricalcium Phosphate (α -TCP) > beta-Tricalcium Phosphate (β -TCP) > Hidroxiapatita (HA) (AZEVEDO e outros, 2007; HELMUS e TWEDEN, 1995 citado por PRADO DA SILVA, 2007). Essa

diferença reflete a influência da composição nas propriedades cristalográficas dos fosfatos de cálcio.

Uma forma conveniente de classificar os bioimplantes de fosfatos de cálcio é através de sua razão molar Ca/P. Os fosfatos de cálcio que possuem a razão molar variando de 0,5 a 2,0 podem ser sintetizados por precipitação a partir de soluções contendo íons cálcio e fosfato, sob condições alcalinas ou ácidas. Estes fosfatos podem ser transformados em cerâmicas biocompatíveis e osteocondutoras. Dentre as cerâmicas de fosfato de cálcio, a hidroxiapatita com razão molar Ca/P igual a 1.67, por ser o principal componente presente na fase mineral dos ossos é, sem dúvida, a mais estudada e a mais utilizada para as finalidades clínicas (BEST e outros, 2008).

As biocerâmicas podem ser encontradas na forma de microesferas, camadas ou coberturas finas em implantes metálicos, redes porosas, matrizes tridimensionais, arcabouços. Estas biocerâmicas apresentam um único biomaterial em sua constituição ou a associação de cerâmicas ou de outros componentes, como por exemplo, os polímeros, sendo denominados como compósitos. (AZEVEDO e outros, 2007).

As biocerâmicas podem apresentar-se densas ou porosas. Apesar do aumento da porosidade diminuir a resistência mecânica do material isoladamente, a existência de poros com dimensões adequadas pode favorecer o crescimento de tecido neoformado através dos mesmos, fazendo com que ocorra um forte entrelaçamento desse tecido com o implante e com o osso adjacente, aumentando, por conseguinte, a resistência do material *in vivo* (KAWACHI e outros, 2000).

As biocerâmicas sintéticas devem apresentar, além das propriedades físico-químicas, uma ultra-estrutura com propriedades mecânicas que são determinantes para o sucesso clínico no reparo de defeitos ósseos (HING, BEST, BONFIELD, 1999). Por isso, é importante, que as mesmas apresentem os parâmetros ideais, quanto ao tamanho das partículas, porosidade, tamanho dos poros, interconectividade e permeabilidade, além de adequada resistência as forças de tração e de compressão (KLENKE e outros, 2008).

O tamanho de partículas de pós de fosfato de cálcio considerado ideal é de 200 a 500µm. As partículas com dimensões inferiores a 50µm induzem a citotoxicidade (ROGERO, BRAGA, HIGA, 1999; BEST e outros, 2008).

O osso esponjoso possui porosidade de 70-90%, enquanto o osso compacto de 5-10%. Os biomateriais cerâmicos porosos, para regeneração óssea, tendem a mimetizar a anatomia óssea em sua porosidade, no entanto, possuem baixa resistência mecânica (FONSECA, 2007; BEST e outros, 2008).

Segundo o sub-comitê para a caracterização de sólidos porosos da IUPAC, materiais macroporos apresentam poros com dimensões maiores que 50 μm (KAWACHI e outros, 2000). Contudo, para que um biomaterial seja considerado macroporoso é necessário que ele apresente poros entre 50 a 250 μm , da ordem do diâmetro harvesiano (HENCH, ETHRIDGE, 1982).

Segundo Gauthier e outros (2001), as partículas das biocerâmicas com dimensões entre 100-300 μm e poros com no mínimo 100 μm de diâmetro já permitem passagem de células osteogênicas em seu interior que favorecem a neoformação óssea.

Volkmer e Santos (2007) citam que os poros com tamanhos entre 75 e 100 μm resultam na formação de tecido osteóide não mineralizado, e os poros menores ainda permitem apenas a formação de tecido fibroso e fixação mecânica do implante.

Os arcabouços devem apresentar poros com diâmetro médio superior a 100 μm , que permitam a interconectividade e a vascularização do implante e o crescimento ósseo através do biomaterial (HULBERT e outros, 1970; KLENKE e outros, 2008).

Porém, outros autores relatam que o tamanho dos poros deve ser entre 200 e 400 μm (HULBERT e outros, 1970; HOLMES, HAGLER, 1988), sendo o fator mais importante, a interconectividade dos poros internos com diâmetros entre 60-100 μm para permitir amplo crescimento ósseo no interior do defeito (FLAUTRE e outros, 2001).

Miño-Fariña e outros (2007) relataram em sua pesquisa, que a reduzida interconectividade dos poros entre 50-150 μm proporcionou um menor crescimento de tecido ósseo na parte central do implante em defeitos críticos. A neoformação ocorreu de forma centrípeta sendo mais evidente na região próxima as bordas ósseas.

As modificações na cristalinidade e no tamanho dos cristais induzidas no processo de sinterização podem desenvolver um papel importante na adesão celular, proliferação, diferenciação e metabolismo (FONSECA, 2007).

Os fosfatos de cálcio, na forma densa, têm força de compressão, que proporciona certa estabilidade durante o processo de reparo, pois a sua resistência a fratura é significativamente menor do que a do osso cortical. Porém, a aplicabilidade dos biomateriais densos é, em geral limitada aos sítios sem grandes cargas funcionais. Entretanto, as cerâmicas com superfície densa são menos solúveis em fluidos biológicos, e frequentemente para imitar a estrutura óssea trabecular, apresentam macroporos interconectados. A macro e a microporosidade aceleram a biodegradação do material por aumentar a área da superfície em contato com os fluidos corporais, permitem uma ampla vascularização do implante, aumentam o potencial osteoindutivo, adsorção de proteínas e fatores de crescimento, aumentam a ação dos osteoblastos e osteoclastos durante a fase de neoformação e remodelação óssea, além de permitir uma melhor osteointegração (HING, BEST, BONFIELD, 1999; HABIBOVIC e outros, 2008).

2.3.1 Hidroxiapatita (HA)

Os estudos de difração de raios-X e análise química, realizadas por De Jong (1926), identificaram a fase mineral da dentina, do esmalte e do osso tem estrutura de apatita de fosfato de cálcio cuja estequiometria é: $\text{Ca}_2\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ou $(\text{Ca})_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, ou seja, a hidroxiapatita (PRADO da SILVA, 2007).

A hidroxiapatita pura é um sal duplo de fosfato tricálcio e hidróxido de cálcio com cristalografia definida. Cada membro dessa estrutura pode fazer uma série de substituições isomórficas catiônicas ou aniônicas, levando à formação dos correspondentes isomorfos ou soluções sólidas (PRADO da SILVA, 2007).

A parte inorgânica do tecido ósseo consiste em uma fase amorfa e uma fase cristalina, a primeira sendo fosfato tricálcio enquanto que a última é hidroxiapatita. A fase amorfa predomina em ossos novos e é parcialmente transformada em fase cristalina com a idade. As cavidades na estrutura cristalina das apatitas afetarão na porosidade e conseqüentemente na atividade superficial das mesmas (BRÅNEMARK, ZARB, ALBREKTSSON, 1985).

A análise química da apatita biológica presente no esmalte, na dentina e no osso não é constituída de hidroxiapatita pura, mas contém traços de íons CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} , F^- , Cl^- , Mg^{2+} , Na^+ ou K^+ e de outros elementos como Sr e Zn. A sinterização da hidroxiapatita pura sintética foi na década de 1970 (ELLINGSEN, THOMSEN, LYGSTADAAS, 2006).

A hidroxiapatita de cálcio pertence ao sistema hexagonal, com grupo espacial $\text{P6}_3/\text{m}$, que é caracterizado por uma simetria perpendicular a três eixos equivalentes, formando ângulos de 120° entre si. O cristal de apatita contém grupos de íons Ca^{2+} , PO_4^{3-} e OH^- em um arranjo tridimensional (Figura 1).

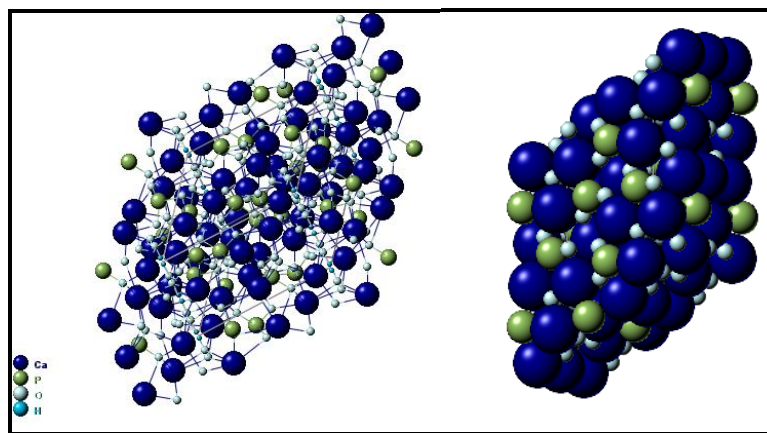


Figura 1 - Arranjo tridimensional da hidroxiapatita (HUGHES, CAMERON, CROWLEY, 1989).

Em cada célula unitária da hidroxiapatita encontram-se dois sítios de ligação ocupados por íons cálcio: Ca (1) e Ca (2) (Figura 2).

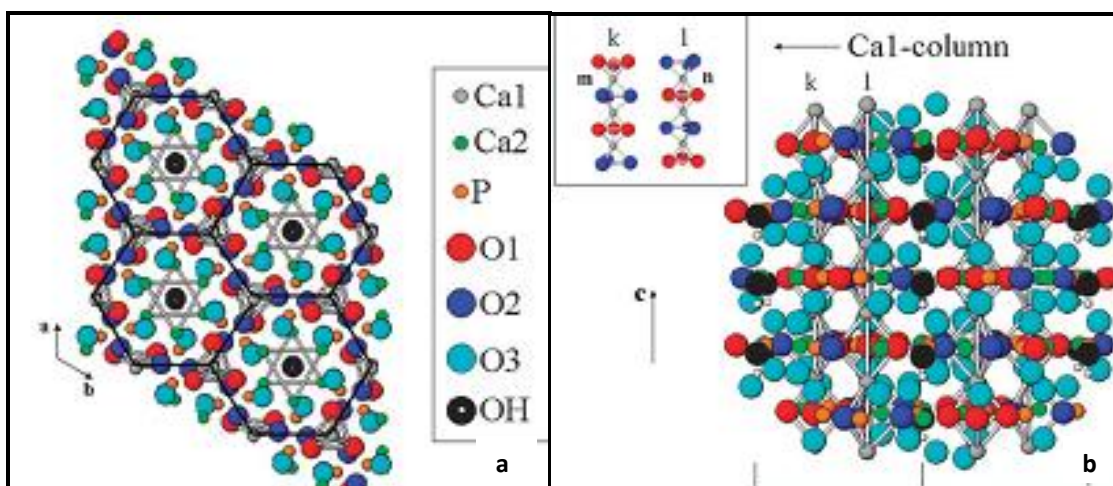


Figura 2 - Estrutura molecular da hidroxiapatita: **(a)** Estrutura hexagonal; **(b)** Vista frontal da estrutura da HA com os sítios de ligação Ca(1) e Ca(2) (TERRA e outros, 2009).

A estrutura da hidroxiapatita permite alterações catiônicas e aniônicas isomórficas que preservam sua estrutura hexagonal. O íon Ca^{2+} pode ser substituído

por cátions tais como o Sr^{2+} (Figura 3), Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Al^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{2+} , Mn^{2+} , Si^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} . O sítio da hidroxila OH^- , pode ser substituído por ânions tais como F^- , Cl^- ou CO_3^{2-} e o sítio de ligação do PO_4^{3-} , geralmente, é substituído por ânions tais como, VO_4^{3-} ou CO_3^{2-} .

As modificações na estrutura tridimensional da HA pela incorporação de íons alteram o comportamento biológico, a cristalinidade, a solubilidade, as propriedades físico-químicas e mecânicas (THORWARTH e outros 2005; DOURADO, 2006; TURHANI e outros, 2007). E, quando presentes simultaneamente, os substituintes podem ter efeitos sinérgicos ou antagônicos nas suas propriedades (PRADO da SILVA, 2007).

As substituições catiônicas de íons Ca^{2+} podem ter comportamentos diversificados: Sr^{2+} , Mg^{2+} , causam uma maior solubilidade nas apatitas, com alterações na estabilidade térmica e na reatividade superficial; por metais Pb^{2+} e o Cd^{2+} induzem ação tóxica no tecido, no entanto, por íons Zn^{2+} e Sr^{2+} estimulam a regeneração óssea, com diminuição da reabsorção óssea pelos osteoclastos e aumento na diferenciação de osteoblastos o que favorece a neoformação óssea (CHEN e outros, 2008).

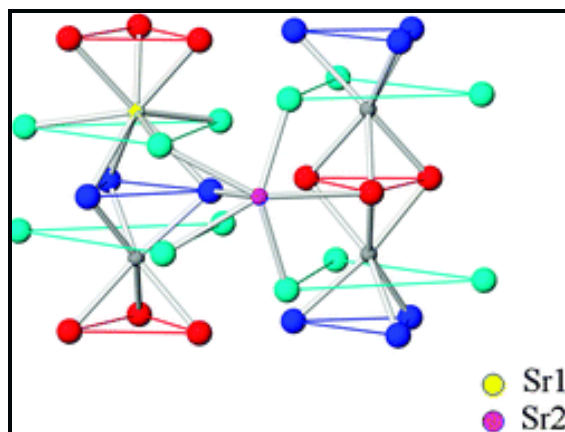


Figura 3 - Estrutura da hidroxiapatita dopada com estrôncio (TERRA e outros 2009).

O carbonato, CO_3^{2-} , pode fazer substituições tanto no grupo da hidroxila OH^- quanto no grupo fosfato PO_4^{3-} , designadas como substituições do tipo A ou B, respectivamente (LEGEROS e LEGEROS, 1996). As microesferas de hidroxiapatita sinterizadas com o alginato de sódio, formam uma hidroxiapatita carbonatada, na calcinação do alginato, acima de 200°C , há um aumento da quantidade de CO_2 ,

formando íons carbonatados que são incorporados a estrutura (RIBEIRO, BARRIAS, BARBOSA, 2006).

Em um estudo *in vitro* com cultura de osteoblastos da calvária de ratos, microesferas de HA e matriz colágena evidenciaram que osteoblastos, adsorvidos a estas estruturas, foram capazes de diferenciação, proliferação com posterior mineralização da matriz colagênica (WU e outros, 2004). O uso de HAs sintéticas pode evitar a morbidade de um sítio doador e quando associadas a enxertos autógenos mostram resultados favoráveis no preenchimento de defeitos críticos (THORWARTH e outros, 2005).

Em estudos *in vivo* e *in vitro*, a associação de biocerâmicas, em diferentes proporções, também obtiveram resultados promissores no reparo ósseo. Blom e outros (2009) fizeram um estudo prospectivo em 43 pacientes submetidos a artroplastia de quadril com substitutos ósseos cerâmicos mistos (80% β -TCP e 20% hidroxiapatita) e obtiveram resultados clínicos satisfatórios.

O deslocamento de enxertos, na forma de cimentos ou de microesferas, favorece a reabsorção incompleta dos mesmos, quando implantados. Dessa forma, o uso de barreiras biológicas pode evitar ou minimizar esse deslocamento das através da regeneração óssea guiada (ROG) (MACNEILL e outros 1999; PROUSAEFS e outros, 2002; RUPPRECHT e outros, 2003).

É possível também, a associação entre os componentes inorgânicos do osso, a hidroxiapatita (HA), com os componentes orgânicos, como o colágeno, seja como aglutinante ou na forma de matriz, associado ou não às proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). As BMPs de origem bovinas e as sintéticas ainda necessitam de maior investigação quanto à biocompatibilidade e imunogenicidade (CANCEDDA, GIANNONI, MASTROGIACONO, 2007). A associação de enxertos aloplásticos (HA) com o enxerto autógeno também tem ampla aplicabilidade clínica (SILVA e outros, 2005; EL- ADL e outros, 2009). É fato que o uso desses substitutos ósseos compostos ou mistos, embora com resultados satisfatórios *in vivo*, ainda não garante o melhor desempenho clínico (TORRONI, 2009; NGIAM e outros, 2009).

Há décadas o uso de arcabouços de HA, no preenchimento de defeitos críticos, é pesquisado em modelos experimentais. O tempo de reabsorção dos arcabouços pode variar de 12 a 18 meses, tempo necessário para que novo osso seja formado. No entanto, em defeitos críticos preenchidos por arcabouços cerâmicos reabsorvíveis ou não reabsorvíveis, constituídos apenas por HA pura,

podem ocorrer falhas que limitam a neoformação óssea à periferia do implante (CUTTER, MEHRARA, 2006; BEST e outros, 2008).

O uso clínico da hidroxiapatita sintética pura, por outro lado, é restrito devido a sua lenta biodegradação. Os estudos efetuados por longos períodos de tempo têm mostrado que a hidroxiapatita pura, após a implantação, começará a ser reabsorvida gradualmente após 4 ou 5 anos. A reabsorção é uma característica desejável à um biomaterial em alguns tipos de implantes, nos quais o processo de degradação deverá ser concomitante com a reposição do osso em formação (LEGEROS, LEGEROS, 1991).

A reabsorção do material, que representa esta biodegradação, é causada pela dissolução, que depende do produto de solubilidade do material e do pH local no meio fisiológico, pela desintegração física em partículas menores e, ainda, por fatores biológicos, como a fagocitose, a presença de leucócitos e de mediadores químicos que causam a redução do pH local (KAWACHI e outros, 2000).

O conhecimento dos fatores que determinam a biocompatibilidade de um material pode contribuir significativamente para desvendar os mecanismos de interação entre o tecido vivo e o implante. Isso possibilitará o desenvolvimento de novos biomateriais e o aumento da vida útil destes, como também, criará as bases para a escolha adequada em cada caso.

A superfície da hidroxiapatita tem a capacidade de trocar íons com o meio fisiológico, o que permite o equilíbrio entre o implante e o osso. Além disso, as interações químicas com ligações do tipo dipolo fazem com que as moléculas de água, proteínas e colágeno sejam adsorvidas nessa superfície e induzam a regeneração óssea tecidual (VOLKMER, SANTOS, 2007).

2.3.2 Hidroxiapatita dopada com estrôncio (HASr)

Os íons estrôncio são usados no tratamento da osteoporose, estimulam a formação de tecido ósseo, a replicação de pré-osteoblastos, a síntese de matriz osteóide, como também, inibem a diferenciação e a atividade de osteoclastos limitando a reabsorção óssea. Na regeneração óssea, estes íons atuam na angiogênese o que favorece a adesão, proliferação e migração de células

endoteliais (CHEN e outros, 2008) e o aumento da síntese de colágeno (CAVERZASIO, 2008).

A incorporação do estrôncio na estrutura das apatitas é um fenômeno que ocorre naturalmente (LANDI e outros, 2007). Porém, há inúmeras pesquisas *in vivo* e *in vitro* com estrôncio em fármacos, tais como, os bifosfonados (ranelato de estrôncio), no tratamento da osteoporose e em biomateriais substitutos ósseos na forma de cimentos de fosfato de cálcio e de arcabouços (*scaffolds*) tridimensionais (LANDI e outros, 2008).

O ranelato de estrôncio, droga antiosteoporótica, é constituída por uma molécula sintética, o ácido ranélico, ligada a dois íons de estrôncio e têm eficácia comprovada no tratamento da osteoporose (DAHL e outros, 2001; WU e outros, 2007; BONNELYE e outros, 2008). Esse fármaco, administrado oralmente, estimula a neoformação óssea e diminui a reabsorção óssea, resultando num aumento de volume e da densidade óssea, ao passo que a mineralização permanece normal (DOURADO, 2006).

Em estudos *in vivo*, a depender da dose de Sr administrada, haverá a promoção de diferentes efeitos biológicos. Em baixa dose (<4mmol Sr/kg/dia) o estrôncio reduz a reabsorção óssea e aumenta formação óssea resultando em aumento da densidade mineral. Esses achados foram comprovados através da administração de baixas doses de estrôncio, via oral, durante 8 semanas, (167,8mg/kg/dia em ratos e de 540mg/kg/dia em camundongos) com aumento de 5% da proporção Sr^{2+}/Ca^{2+} no soro sanguíneo, aumento dos sítios de neoformação óssea e de densidade óssea mineral (DOM) em fêmur e vértebras (GRYNPAS, MARIE, 1990; CHRISTOFFERSEN e outros, 1997; MARIE e outros, 2001).

A função renal em ratos é alterada com a administração de estrôncio na água (na forma de cloreto composto) e doses variando entre 0,19–0,34% durante 9 semanas foram capazes de aumentar o volume ósseo, no entanto, doses maiores ($\geq 0,40\%$) provocaram defeitos de mineralização e osteomalácia. O estrôncio presente na dieta de frangos com função renal normal demonstrou a interferência desse elemento na absorção do cálcio e na síntese de vitamina D (VERBERCKMOES e outros 2004).

O tratamento com estrôncio aumenta também a atividade de fosfatase alcalina (MARIE e outros, 2001; VERBERCKMOES e outros 2004). Alguns estudos *in vivo* e *in vitro* (SILA-ASNA e outros, 2007, WONG e outros, 2009) suportam o

conceito de que a administração de estrôncio em doses corretas promove indução osteogênica com a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos (aumenta a formação óssea), atua na reabsorção óssea, (inibe a ação de osteoclastos), reduz a perda óssea em modelos de animais com osteopenia, ovariectomizados, sugerindo que doses controladas de estrôncio podem também ter potencial benéfico em pacientes osteoporóticos.

A terapêutica de pacientes com osteoporose com baixas doses de ranelato ou cloreto estrôncio (316–634mg/kg/dia Sr^{2+}) durante 2 a 26 semanas estimula a neoformação óssea e diminui a reabsorção, isso resulta em aumento do volume de osso medular e mineralização das trabéculas. Em mulheres com osteoporose é observado após 1 ano do uso diário de ranelato de estrôncio de 2,0g/dia (517mg Sr^{2+} /dia) aumento relevante na DOM das vértebras lombares e, após dois anos há um incremento de 2,95 ao ano nessa densidade (DAHL e outros, 2001).

Os íons Sr^{2+} têm grande afinidade ao osso sendo incorporados através de dois mecanismos: adsorção dos íons Sr^{2+} à superfície do cristal de hidroxiapatita do osso, ou por substituição iônica com o cálcio presente no osso (WU e outros, 2007). Estes íons Sr^{2+} são depositados na estrutura mineral do osso, de forma mais rápida, em locais onde o metabolismo ósseo é mais acelerado. (WANG, YE, 2008).

Em outro estudo *in vitro* realizados por Kim e outros (2004) com meio de cultura contendo linhagens de células de osteosarcoma de ratos (UMR-106) mantidos, durante duas semanas em concentrações de íons Sr^{+2} (1, 5, 20 e 100 $\mu\text{g}/\text{mLSr}^{+2}$) foi observado a neoformação e mineralização óssea. Em altas concentrações de Sr^{+2} (20 e 100 $\mu\text{g}/\text{mLSr}^{+2}$) a mineralização foi reduzida, embora a fosfatase alcalina do meio estivesse normal, acredita-se que o estrôncio alterou a deposição e a incorporação de cálcio à estrutura da hidroxiapatita, comportamento semelhante também foi observado em cultura de osteoblastos em meio contendo estrôncio.

A substituição do Ca^{2+} pelo Sr^{2+} na hidroxiapatita sintética com concentração acima de 5% molar de Sr^{2+} leva a uma expansão dos parâmetros de rede com uma ocupação preferencial do Sr^{2+} pelo sítio do Ca (2). A ocupação do Sr^{2+} no sítio do Ca (1) satura em concentrações acima de 10% molar do metal. A preferência pela ocupação do sítio do Ca (2) é maior nas amostras nanoestruturadas do que aquelas sintetizadas em altas temperaturas (DOURADO, 2006; TERRA e outros, 2009).

O raio do íon Sr^{2+} ($1,13\text{\AA}$) é maior do que o do íon Ca^{2+} ($1,00\text{\AA}$), o que causa expansão na estrutura do cristal e dessa forma, a substituição iônica altera as propriedades físico-químicas da hidroxiapatita tais como, a cristalinidade, topografia e solubilidade (LIAO e outros, 2002; VERBERCKMOES e outros, 2004).

As hidroxiapatitas dopadas com estrôncio têm sua solubilidade modificada em diversos estudos *in vivo*. A velocidade de reabsorção dos biomateriais aumenta de acordo com área superficial ($A_{\text{pó}} > A_{\text{sólido poroso}} > A_{\text{sólido denso}}$), com o decréscimo da cristalinidade. Na hidroxiapatita, esse aumento na reabsorção ocorre pela substituição de CO_3^{2-} nos sítios de fosfato e por Mg^{2+} , Sr^{2+} nos sítios Ca (1) do cálcio (KAWACHI e outros, 2000).

O efeito biológico desses íons Sr^{2+} na estrutura cristalina da HA cerâmica é dependente do percentual de substituição (VERBERCKMOES e outros, 2003). Em altas percentagens de substituição de íons Sr^{2+} na HA há inibição no reparo ósseo, no entanto, baixas percentagens de estrôncio incorporado à estrutura da HA promovem aumento na atividade celular de osteoblastos e dos seus marcadores de diferenciação. Os estudos *in vitro* com HASr e íons Sr nas porcentagens molares de 2%, 4% e 8% constataram um aumento na proliferação e a diferenciação de osteoblastos (KIM e outros, 2004).

Em outro estudo que avaliou as alterações físico-químico da HA e seus efeitos biológicos em baixas concentrações de 0–10% de $\text{Sr}/(\text{Sr}+\text{Ca})$, encontraram maiores alterações na concentrações de 10% $\text{Sr}/(\text{Sr}+\text{Ca})$ da hidroxiapatita. (CHRISTOFFERSEN e outros, 1997; LIAO e outros, 2002). Estudos experimentais e em cultura de células com amostras de hidroxiapatita sintética dopadas com estrôncio em altas concentrações 12,7% e 60% $\text{Sr}/(\text{Sr}+\text{Ca})$ alteram a solubilidade, as propriedades físico-químicas e o crescimento dos cristais de hidroxiapatita (VERBERCKMOES e outros, 2004).

Landi e outros (2007) estudaram *in vitro* a HA dopada com 8,7% de íons Sr após imersão durante 7 dias em solução fisiológica, e encontraram a estimulação osteoblástica em diversas concentrações de íons Sr. As altas concentrações de Sr (20 e $100\mu\text{g}/\text{mL}$) inibiram a formação de HA. Em estudos anteriores em cultura de células osteoprogenitoras houve a proliferação celular em meio preparado apenas com HA sem estrôncio. E no meio com HASr 10% mol observou-se maior proliferação de células pre-osteoblásticas e aumento da síntese de colágeno (CAVERZASIO, 2008).

A biocompatibilidade *in vivo* de cimentos de HASr de implantes intramusculares e em fêmur de coelhos mostraram que aqueles com razão molar Sr/(Sr+Ca) de 5% foi mais biocompatível do que os com razão molar de 10%. A biodegradação do implante é maior no cimento contendo HASr do que no cimento livre de estrôncio, como também é influenciada por sua concentração sendo mais rapidamente reabsorvido aquele com maior concentração em sua composição (LIAO e outros, 2002; DAGANG, KEWEI, YOUNG, 2007). Segundo Alkhraisat e outros (2008), a adição de sais de estrôncio em cimentos cirúrgicos limita-se a concentrações menores do que 10mol%.

Os testes de biocompatibilidade provaram que biomateriais que contenham Sr são biocompatíveis e influenciam favoravelmente no crescimento e diferenciação de células osteogênicas e a síntese de colágeno (LIAO e outros, 2002). O efeito desses íons é dose-dependente, baixas doses de Sr (0,5 e 1µg/mL) prejudicam a diferenciação de osteoblastos. No entanto, os pesquisadores constataram que cimentos de HASr são tão bons quanto cimentos sem Sr na proliferação de osteoblastos, ambos apresentam potencial osteogênico.

A presença de íons Sr em cimentos biológicos (DAGANG, KEWEI, YOUNG, 2007; WANG, YE, 2008; WONG e outros, 2009) e em arcabouços (*scaffolds*) (TIAN e outros, 2009; TORRONI, 2009) tem trazido resultados promissores na reparação óssea. Os cimentos bioativos contendo HASr promovem neoformação óssea, mineralização e osteointegração do implante, tem excelente dureza e alto módulo de elasticidade (WONG e outros 2009).

A liberação de íons Sr^{2+} incorporados em biocerâmicas sintéticas de fosfato de cálcio promove a osteointegração através da estimulação de osteoblastos e a inibição de osteoclastos. Algumas hidroxiapatitas são solúveis em valores de pH fisiológico no qual a liberação de íons Sr^{2+} é baixa (WU e outros, 2007).

Alkhraisat e outros (2008) investigaram a substituição de Sr na estrutura do β -TCP avaliando sua dissolução e o efeito na diferenciação celular e no crescimento ósseo. A substituição iônica neste biomaterial cerâmico alterou as propriedades de cristalinidade, solubilidade e conseqüentemente o seu desempenho biológico.

Os íons Sr quando substituindo os íons cálcio na estrutura de α -TCP (SAINT-JEAN e outros, 2005) e β -TCP (ALKHRAISAT e outros, 2008), também modificam a solubilidade destes biomateriais em meio biológico. Nos estudos *in vivo* e em baixas concentrações de íons Sr^{2+} estes são também incorporados ao tecido ósseo em

formação (LIAO e outros, 2002). Em pesquisas *in vitro* em cultura de osteoblastos há aumento da fosfatase alcalina proporcional a presença de íons de Sr^{2+} e a citocompatibilidade desses biomateriais foi também constatada (KIM e outros, 2004).

2.3.3 Alginato (Alg)

Os alginatos são polissacarídeos naturais, extraídos de algas pardas ou de algas marrons, são biodegradáveis, biocompatíveis e atóxicos. Estes polissacarídeos são polímeros lineares do ácido (1,4) b-D-Manurônico (unidades M) e de ácido a-L-Gulurônico (unidades G) que apresentam variação na proporção e distribuição seqüencial ao longo da cadeia polimérica (Figura 4). As propriedades físicas destes polímeros são determinadas por sua composição, extensão das seqüências lineares e por seu peso molecular (BOONTHEEKUL, KONG, MOONEY, 2005, PAULA, 2008).

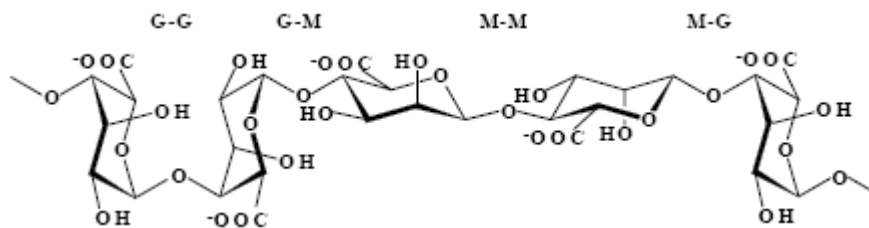


Figura 4. Estrutura polimérica do alginato. Ligações do tipo 1-4 (TORRES, 2004).

Alguns biomateriais, tais como, a hidroxiapatita, a apatita carbonatada, cimentos de fosfatos de cálcio, β -TCP e fluorapatita, podem estar associados a polímeros. Estes polímeros tem origem sintética (ácido poliglicólico, ácido polilático, PMMA, poliésteres, polianídros) ou natural (colágeno, alginato, condroitin sulfato, quitosano, fibrina, gelatina) (SENA, 2004; NEUMANN e EPPLE, 2006; SALEM, 2006).

A HA, quando implantada no tecido ósseo, está sujeita a tensões mecânicas inerentes a própria dinâmica da região. Sabe-se que a HA porosa tem menor resistência mecânica. Desse modo, para manter o implante de forma segura, com propriedades físico-químicas adequadas e características desejáveis ao reparo, pode-se fazer uso de vários tipos de biopolímeros, dentre eles o alginato (SENA,

2004; PAULA, 2008). O alginato promove um alinhamento no sentido *c* dos nanocristais de HA e uma quantidade elevada de alginato leva a formação de grandes cristais de HA após os compostos serem calcinados por 4 horas a 600°C (TENG e outros, 2006). A resistência mecânica a compressão do osso neoformado pelo HA-Alg é semelhante a do tecido ósseo esponjoso (ALVES, SANTOS, BERGMANN, 2005).

A adição de cátions divalentes (Ca^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+}) ao alginato, em soluções aquosas, permite estabelecer ligações cruzadas e formar hidrogéis, para formar pontes entre as cadeias poliméricas adjacentes e uma rede tridimensional com o objetivo de estabilizar, permanentemente, os polímeros. Este modelo de rede tridimensional, denominado de “*egg-box*”, é baseado nas propriedades físico-químicas dos hidrogéis de alginato e nas propriedades de adesão dos cátions. Esta rede é, comumente, formada a partir do gotejamento da solução de alginato de sódio ou de potássio, em solução aquosa de íons de cálcio, normalmente, composta por cloreto de cálcio (KUO, MA, 2001; PAULA, 2008).

Esses polímeros naturais, fabricados a partir de sais de algas marinhas são placas ou ramas de fibras absorventes, que quando empregados como filmes para revestimento dérmico, ou hidrogéis, melhoram a cicatrização, especialmente em queimadura de pele. Nesses casos, o alginato se transforma em gel à medida que absorve o exsudato. E, quando associado à quitosana ou ao colágeno, estes hidrogéis hidratam as feridas secas, amaciam os tecidos necróticos e auxiliam no debridamento autolítico. O componente alginato aumenta a sua consistência, o que facilita a sua aplicação e permanência na lesão. Quando associado ao colágeno, facilitam a hemostasia, estimulam o debridamento autolítico e atraem granulócitos e fibroblastos para o leito da ferida, promovendo proliferação celular (MANDELBAUM, Di SANTIS, MANDELBAUM, 2003).

O alginato de cálcio, ácido poliurônico natural, é usado como aditivo em alimentos. E, em pacientes que fazem hemodiálise, devido à capacidade de complexar fosfato (PASSLISCK e outros, 1989). Seu uso na remoção de metais pesados como o chumbo em soluções aquosas em qualquer faixa de pH, como, por exemplo, em reservatórios contaminados e *in vivo* através de sua ação nos fluidos gástricos e/ou entéricos também foram evidenciados.

Os aditivos poliméricos alginato de sódio à HA tem potencial capacidade de estabelecer interações iônicas com íons Ca^{+2} . O alginato de sódio inibe a conversão

do cimento de fosfato de cálcio (TTCP+DCPA) em HA devido ao aumento da viscosidade do meio, há diminuição da taxa de difusão dos íons cálcio e fósforo provenientes do TTCP e DCPA para a formação de cristais de HA (ISHIKAWA e outros, 1997).

O alginato de sódio tem a propriedade de formar um gel insolúvel na presença de íons de cálcio. Este hidrogel insolúvel pode inibir ou mesmo impedir totalmente a dissolução de cimento fosfato tricálcico em meio líquido (ALVES, SANTOS, BERGMANN, 2006). Segundo Ishikawa (1995), quando presente nesses cimentos com até baixos teores, o alginato de sódio promove uma boa dispersão das partículas. A adição de agentes poliméricos como o alginato em cimentos de fosfato de cálcio permite a obtenção de resistência mecânica similar ao tecido osso esponjoso (ALVES, SANTOS, BERGMANN, 2005).

O gel de alginato pode ser utilizado como veículo para melhorar a injetabilidade de cimentos cirúrgicos indicados para o preenchimento de alguns tipos de defeitos ósseos, como por exemplo, em vertebroplastias (MAZUMDER e outros, 2009).

A produção de estruturas biológicas, composta de células vivas em hidrogel de alginato podem ser obtidas através da reação de uma solução de alginato de sódio com uma solução de cloreto de cálcio. Estas estruturas podem ser membranas, microesferas, blocos porosos, entre outras estruturas bi e tridimensionais.

Os pós HA dispersos em uma solução de alginato de sódio obtêm partículas esféricas por extrusão em gota juntamente com geleificação ionotrópica na presença de íons Ca^{+2} . Estas partículas obtidas são posteriormente sinterizado para produzir HAs em formato de microesferas de tamanho uniforme e microporos interconectados. A superfície porosa destas microesferas de HA apresenta boa adesão celular, com formação de micro-aglomerados de células e proliferação de osteoblastos. As microesferas que têm em sua composição o alginato são resistentes a agentes químicos e ao estresse mecânico. Apesar dessas propriedades, pouco se sabe sobre a eficácia do cálcio em esferas de alginato (MAZUMDER e outros, 2009; NOTARA e outros, 2009).

O alginato de sódio é um polímero capaz de encapsular e imobilizar uma variedade de células na engenharia de tecidual, porque é biocompatível, biodegradável, quando reticulado com íons de cálcio e de rápida aplicação em

sistemas micro injetáveis. É capaz de promover um isolamento imunogênico em células transplantada através da técnica de bioengenharia tecidual até o local em que se deseja reparar (MAZUMDER e outros, 2009).

Um arcabouço de gel de alginato é biodegradável, pois há uma melhor captação de água. Este possibilita a construção de matrizes tridimensionais, capazes de formar tecido ósseo, por meio de uma cultura de células osteogênicas com proliferação e diferenciação em osteoblastos sobre os arcabouços porosos de alginato. As pesquisas com células osteogênicas desempenharão um papel importante no tratamento de doenças ósseas degenerativas e na reparação de lesões traumáticas do tecido ósseo. A aquisição de células-tronco em quantidade adequada é o maior desafio para a sua aplicação clínica. A cultura *in vitro* e expansão dessas linhagens de células é essencialmente importante e podem ser feitas em esferas de alginato de cálcio. Os resultados experimentais demonstram que isto é viável e oferece novas possibilidades de aplicação de grande relevância clínica (MAZUMDER e outros, 2009).

Os hidrogéis de alginato apresentam baixa citotoxicidade quando do cultivo de células mesenquimais, condrócitos primários, células osteoprogenitoras e células do tecido nervoso. Estas células permaneceram disponíveis e metabolicamente ativas. Dois sistemas de géis de quitosana-alginato na forma de membranas foram produzidos e avaliados. A citocompatibilidade e hemocompatibilidade foram examinadas através da viabilidade celular aos fibroblastos. Ambos apresentaram efeito mínimo sobre a hemólise do sangue heparinizado e a ativação plaquetária. Estes resultados indicam a necessidade de uma investigação mais aprofundada para aplicações desses biomateriais em contato com fluidos biológicos (NOTARA e outros, 2009).

Alginato é um polissacarídeo natural, que tem sido utilizado na distribuição de fármacos e na reconstrução tecidual. Entretanto, semelhante a outros biomateriais provoca inflamação por mecanismos desconhecidos. Supõe-se que o alginato estimularia respostas imunes inatas através de receptores de macrófagos, com indução de citocinas pró-inflamatórias, como IL-beta1, IL-6, IL-12, TNF-alfa, e, de acordo com a concentração e tempo de biodisponibilidade em meio biológico (YANG, JONES, 2009). A concentração de alginato é um parâmetro importante, pois influencia no comportamento celular do reparo tecidual. No entanto, a forma geométrica desses arcabouços não gera alterações significativas nos perfis de

diferenciação das células mesenquimais. Em um estudo com biomateriais compostos por alginatos de diferentes composições e purezas investigou-se a capacidade de proliferação e diferenciação de células da medula óssea de ratos. Observou-se que dependendo da composição, o alginato de cálcio reticulado pode atuar como substrato para a proliferação de celular, com potencial osteogênico e com adequadas propriedades mecânicas (MATEUS e outros, 2008).

É possível o desenvolvimento de um arcabouço de alginato, antibióticos e células-tronco mesenquimais, capaz de proporcionar uma terapêutica adequada à pacientes com defeitos ósseos infectados. Em estudo de Ueng e outros (2007), com esse tipo de arcabouço, os grânulos de alginato foram então cultivadas em meio osteogênico durante 14 dias. Os perfis de antibióticos liberados pelas esferas de alginato foram avaliados por cromatografia líquida de alta eficiência. A concentração de alginato influência na liberação do antibiótico. A análise da expressão de genes osteogênicos, incluindo *Cbfa1* e osteopontina, nas esferas de alginato foi determinada pela técnica da transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). As concentrações de antibiótico liberadas do arcabouço duraram 14 dias, bem acima da concentração inibitória mínima para o *Staphylococcus aureus*. Os resultados *in vitro* demonstraram um aumento da atividade da fosfatase alcalina e de cálcio acompanhados por boa diferenciação osteogênica de células tronco cultivadas na matriz de alginato transportadora e uma substancial deposição de minerais. Nas análises *in vivo*, foram identificadas trabéculas ósseas recém-formadas em todos os espécimes, 2 e 4 meses após o implante, porém, não houve deposição de minerais abundantes. Em outro estudo, pode-se concluir que o polímero (alginato) pode inibir a atividade enzimática da protease liberada pela *Candida albicans* (CALAMARI e outros, 2004).

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar histologicamente por microscopia de luz, o potencial osteogênico de microesferas biocerâmicas no reparo ósseo crítico em calvária de rato.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Avaliar o potencial osteogênico da associação entre microesferas de hidroxiapatita e alginato.
- B) Avaliar o potencial osteogênico da hidroxiapatita dopada com estrôncio.
- C) Avaliar o potencial osteogênico da hidroxiapatita dopada com estrôncio e associada com o alginato.

Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

Os procedimentos cirúrgicos deste estudo foram realizados no Biotério Central da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), após aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Instituição (PROTOCOLO Nº016/2008.) Durante esta etapa experimental, seguiram-se as Normas Éticas de Pesquisas em Animais e as Normas Nacionais de Biossegurança.

A amostra foi composta por 60 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar albinus*, adultos, machos, com peso entre 400 e 450g, e 3 a 4 meses de idade. Esta amostra foi distribuída para a composição de quatro grupos: grupo I (GI), controle – defeitos preenchidos apenas por coágulo sanguíneo; grupo II (GII) – defeitos preenchidos por microesferas de hidroxiapatita associadas ao alginato [HA- Alg]; grupo III (GIII) – defeitos preenchidos por microesferas de hidroxiapatita dopadas com estrôncio [HASr]; grupo IV (GIV) – defeitos preenchidos por microesferas de hidroxiapatita dopadas com estrôncio e alginato [HASr-Alg], avaliados nos pontos biológicos de 15, 45 e 120 dias, conforme observado na tabela 1:

Tabela 1. Número de animais de acordo com o grupo e ponto biológico (dias).

Grupo Ponto Biológico	GI	GII	GIII	G IV	Total
15	5	5	5	5	20
45	5	5	5	5	20
120	5	5	5	5	20
Total	15	15	15	15	60

4.2 BIOMATERIAIS

As biocerâmicas avaliadas neste estudo foram preparadas, caracterizadas e fornecidas pelo Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), sob orientação do Prof. Dr. Alexandre Malta Rossi.

As biocerâmicas de fosfato de cálcio foram obtidas a partir de uma suspensão aquosa de HA e alginato de sódio, na proporção de 15:1. Para a formação das microesferas, esta mistura foi gotejada em uma solução de cloreto de cálcio (CaCl_2 0,15M), em temperatura ambiente. Imediatamente, observou-se a formação de esferas com diâmetro entre 425 a 600 μm . Em seguida, as microesferas foram peneiradas, lavadas em água destilada e secadas em estufa a 37°C, durante 24 horas.

As microesferas de hidroxiapatita dopadas com estrôncio (1% molar), implantadas nos grupos III e IV, foram preparadas pela mesma rota descrita anteriormente. Contudo, as biocerâmicas implantadas nestes grupos, receberam a adição de nitrato de estrôncio $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. As esferas do grupo III, após a dopagem com estrôncio, foram calcinadas a 1000°C, o que possibilitou a evaporação do alginato e a formação uma rede interconectada de poros.

Previamente à implantação, as microesferas foram pesadas em balança de precisão¹, colocadas em frascos *ependorffs* rosqueáveis, com porções individualizadas de 0,2mg e esterilizadas em autoclave a 120°C durante 30 minutos.

4.3 TÉCNICA CIRÚRGICA

Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos em caixas plásticas identificadas conforme grupo e ponto biológico, autoclavadas, forradas com maravalha de pinus autoclavada e trocada diariamente. Na ficha de identificação, ainda constavam a massa corporal do animal, data da cirurgia e do sacrifício e o nome do pesquisador. Os animais foram alimentados com ração sólida² e água *ad libitum*, mantidos em condições ambientais adequadas de temperatura e luminosidade. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados conforme a técnica descrita em Miguel e outros (2006).

Anteriormente aos procedimentos cirúrgicos, os animais receberam anestesia e sedação por meio de injeção intramuscular de cloridrato de quetamina³ na proporção de 0,12mL/100g de peso, e cloridrato de xilazina⁴, na proporção de 0,06mL/100g de massa corpórea, respectivamente. Na seqüência, os animais foram tricotomizados na região superior da calvária, e em seguida realizou-se a anti-sepsia do campo operatório com solução de iodopovidine⁵ e o posicionamento dos animais em decúbito ventral.

Logo após, o acesso à região da calvária foi feito por meio de uma incisão cutânea bicoronal, semilunar, com extensão de aproximadamente 3cm, com lâmina de bisturi nº 15. (Figura 5a). Seguidamente, divulsionou-se com tesoura de ponta romba e elevou-se o retalho com pinças mosquito para ter acesso ao perióstio, o qual foi incisado e removido.

Para confecção do defeito ósseo crítico, com aproximadamente 8,5mm de diâmetro, na porção mediana da calvária, entre os vértices da sutura anterior e

¹ Balança Digital Ohaus Adventurer, TOLEDO®

² Labina®

³ Vetaset®

⁴ Coopazine 2%®

⁵ Iodopovidona 10%, BioTrat. L.M. Farma®

posterior, utilizou-se fresa trefina⁶, acoplada a um motor cirúrgico para implantes⁷ com rotação de 1500RPM, torque de 55 N.cm, sob constante irrigação com solução fisiológica estéril (Figura 5e). Na transfixação da calvária o fragmento foi removido, juntamente com dura-máter (Figuras 5f, 5g). Em seguida, irrigou-se abundantemente o defeito para remoção de espículas ósseas e implantação dos biomateriais nos seus respectivos grupos (Figura 5h, 5i), exceto no GI, no qual o defeito foi preenchido apenas por coágulo (Figura 5g). Por fim, os retalhos foram reposicionados e suturados com pontos interrompidos com fio seda 4.0⁸ (Figura 5j).

Após os pontos biológicos de 15, 45 e 120 dias, os animais foram mortos com a dose letal do anestésico e a toda porção superior da calvária foi removida em bloco, incluindo tecidos moles e duros.

Em seguida, a calvária foi recortada em duas metades, com discos de *carborundum*, granulação fina acoplados a um motor elétrico⁹. A porção anterior (maior) foi destinada a inclusão em parafina e a porção posterior (menor) destinada a inclusão em resina (Figura 6), de modo que após a planificação dos blocos fossem obtidos os cortes histológicos no maior diâmetro (Figuras 7a, 7b e 8a). Os espécimes obtidos foram fixados em formol tamponado a 4%¹⁰, durante 3 dias.

⁶ Dentoflex®

⁷ Driller BML 600 Plus®

⁸ Ethicon, Johnson & Johnson®

⁹ Dremel®

¹⁰ Formol tamponado 4%: Formaldeído 40% -100mL; Tampão Fosfato de Sódio- 900mL (fosfato de sódio monobásico-4g; fosfato de sódio dibásico- 6,5g)

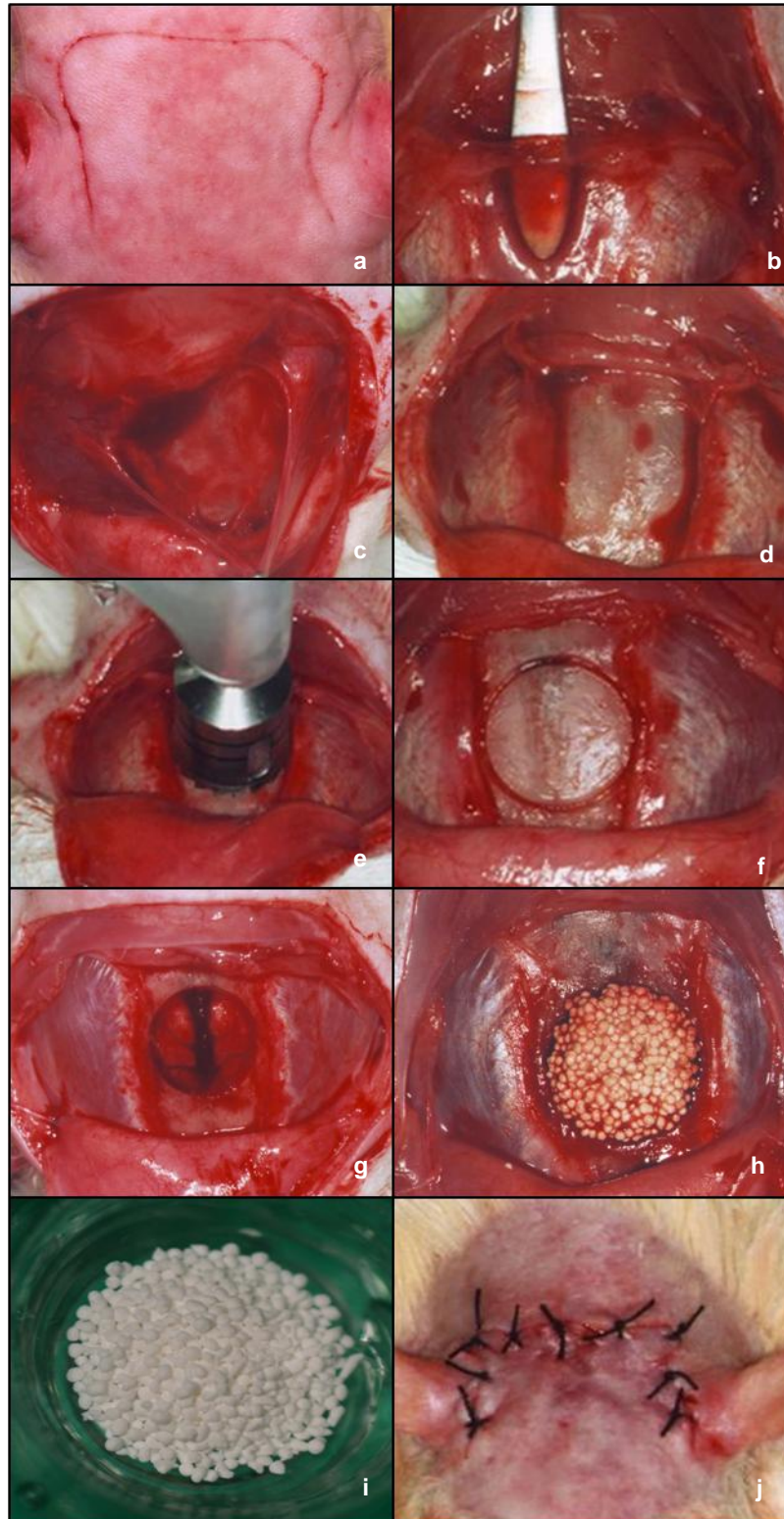


Figura 5 - Seqüência cirúrgica e implantação dos biomateriais¹¹: (a) Tricotomia e assepsia; Incisão cutânea bicoronal semilunar; (b) e (c) Incisão, divulsão, descolamento e remoção do periosteio; (d) Exposição da calvária; (e) Transfixação do dorso da calvária com fresa trefina; (f) Remoção do osso e periosteio na porção mediana da calvária; (g) Defeito crítico (8,5mm) confeccionado; (h) Microesferas cerâmicas preenchendo o defeito, (i) Microesferas cerâmicas em maior aumento; (j) Retalho reposicionado e suturado com pontos interrompidos.

¹¹ Fotos gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Fúlvio Miguel (b, c, d, e, j) e pela doutoranda Isabela Barreto (a)

4.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

O processamento histológico e a confecção das lâminas histológicas foram realizadas no Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais (LBTB), no Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da UFBA. Após fixação, os espécimes tissulares obtidos em formato retangular, de aproximadamente 5mm de altura, 15mm de comprimento e 15mm de largura, compreendendo a porção anterior do defeito (Figuras 6 e 7), foram descalcificados em EDTA 5%¹², durante 7 dias, e em seguida, processados em processador automático de tecido¹³, seguindo o protocolo de rotina. E, após a inclusão em parafina, os blocos foram cortados em cortes seriados em micrótomo com 7 μ m de espessura, e foram corados por Hematoxilina-eosina, Picrossírius-vermelho para evidenciar fibras de colágeno, Tricrômico de Goldner, para evidenciar a deposição de matriz osteóide. Os cortes histológicos foram examinados em microscópio de luz comum¹⁴.

Os espécimes obtidos da porção posterior da calvária nas dimensões de aproximadamente 5mm de altura, 13mm de comprimento e 15mm de largura (Figura 7 e 8) foram processados manualmente e incluídos em resina polimetilmetacrilato (Tabela 2), segundo modificação e adaptação, validado pela mestrandia, a partir de um protocolo previamente cedido pela Prof^a Maria Eugênia Leite Duarte¹⁵, do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Para isso, confeccionou-se uma base de inclusão com 2mL de solução III (Tabela 2), colocada em frascos de vidro com tampa plástica rosqueável (26mm de diâmetro e 45mm de altura), e levados a estufa previamente aquecida à 39°C, onde permaneceu por dois dias. Após esse período a porção posterior da calvária foi incluída de modo que a área do defeito ficasse voltada para a base do frasco. E, após estabilizar o espécime no frasco, o mesmo foi submerso com o acréscimo de aproximadamente 6mL da solução III em temperatura ambiente. O frasco, devidamente vedado, permaneceu por mais três dias na estufa à 39°C. Os vidros

¹² EDTA 5%: EDTA P.A -50g; Solução Salina (Cloreto de sódio-8,5g; Água destilada-1000mL)

¹³ Leica AST 300®

¹⁴ Nikon®

¹⁵ Comunicação pessoal

foram quebrados e os blocos obtidos (Figura 8c), após a polimerização da resina, foram lixados com uma ponta polidora de óxido de alumínio (8193) acoplado na peça reta do motor elétrico rotativo¹⁶.

O excesso de resina foi removido e a confecção de chanfros favoreceu a fixação desses blocos no micrótomo¹⁷ de alto impacto, para tecidos duros. As lâminas histológicas foram previamente lavadas com detergente neutro¹⁸ enxaguadas em água corrente, e em água destilada. Em seguida, foram colocadas durante 20 minutos na água clorídrica (880mL de água destilada + 80mL de ácido clorídrico- HCl 12N), lavadas em três passagens de água destilada, seguida por uma passagem de 20 minutos na solução acética (900mL de álcool absoluto + 300mL de ácido acético), com secagem em temperatura ambiente. Os cortes histológicos seriados de 7 μ m de espessura foram corados por Tricrômico de Goldner e examinados pela microscopia de luz.

Tabela 2 – Processamento histológico para inclusão em resina

SOLUÇÃO ¹⁹	TEMPO (min)
Álcool 70%	45
Álcool 80%	45
Álcool 90%	45
Álcool 95%	45
Xilol I (xilol P.A)	30
Xilol II (xilol P.A)	30
Solução I	60
Solução II	60
Solução III	60

¹⁶ Dremel®

¹⁷ Leica® RM2255

¹⁸ Extran®

¹⁹ Todas em temperatura ambiente, cerca de 22°C; Solução I (75ml metil-metacrilato+25ml de di-butil-ftalato); Solução II (Solução I + 1g de peróxido de benzoíla); Solução III (Solução I + 2.5g de peróxido de benzoíla)

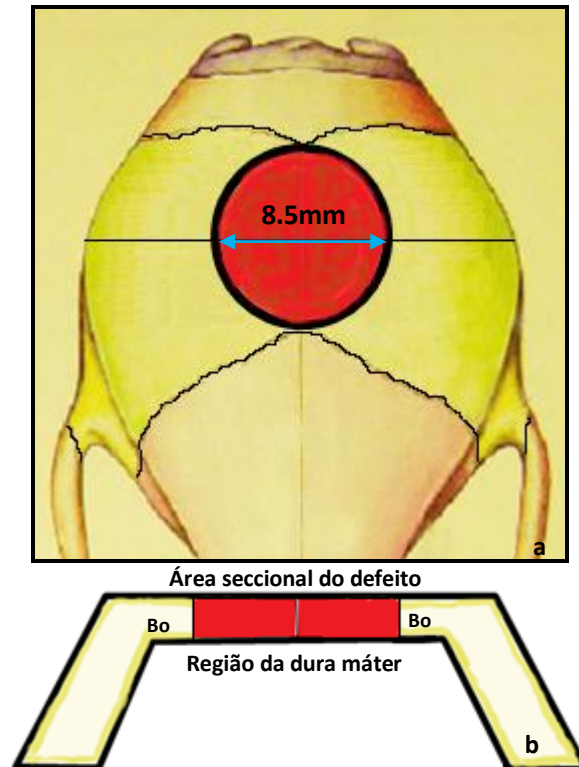


Figura 6 Desenho esquemático de defeito crítico em calvária de rato **(a)** Linha de referência para o corte transversal dos espécimes (Adaptado de MEINEL e outros, 2005). **(b)**. Corte transversal da extensão linear e da área seccional; borda óssea (Bo).

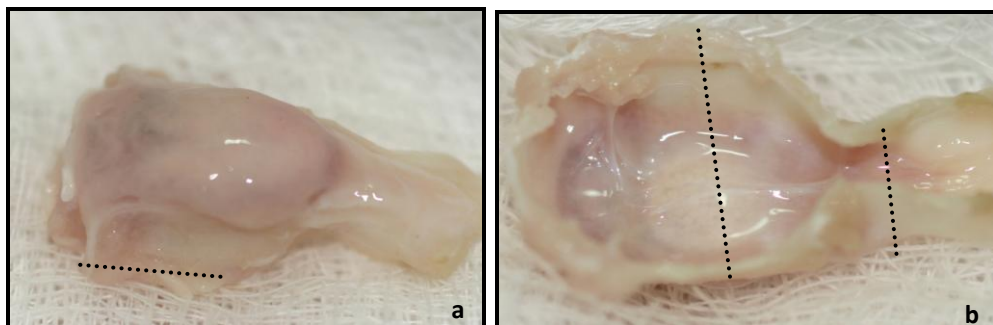


Figura 7 Padronização dos espécimes e áreas de corte - **(a)** Vista dorsal do espécime com biomaterial preenchendo a região do defeito; área de corte (tracejado) e **(b)** Vista ventral do espécime, com as linhas de referência para o corte (tracejado) no ponto biológico 45 dias.

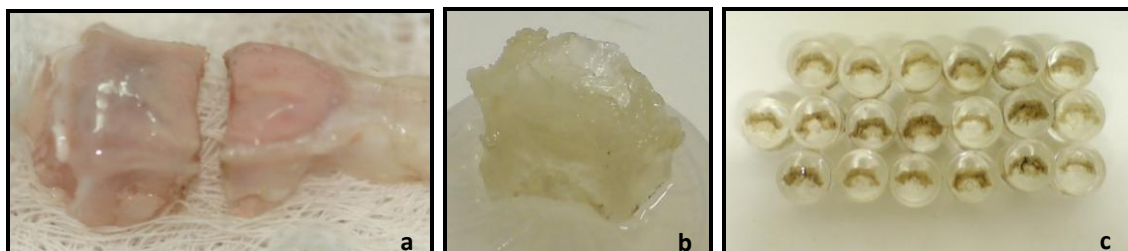


Figura 8 Preparação dos espécimes para inclusão em resina e parafina **(a)** Seção transversal porção posterior para inclusão em resina e a anterior para inclusão em parafina. **(b)** Porção posterior da calvária. **(c)** Blocos de resina

Resultados

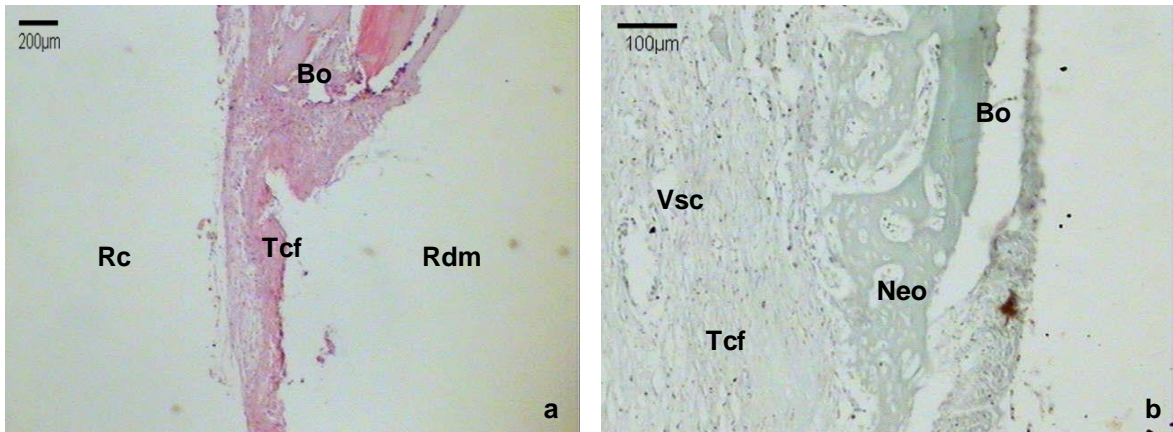
5 RESULTADOS

5.1 GI - CONTROLE

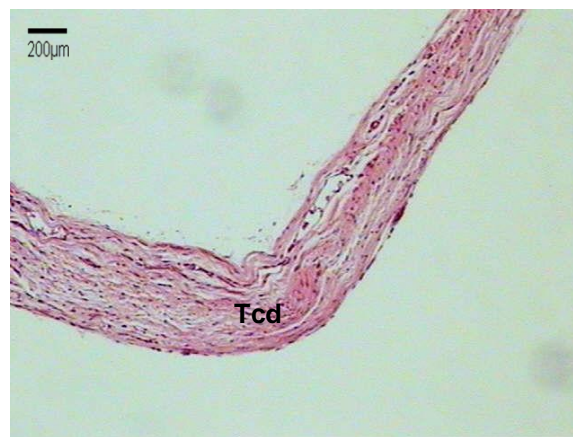
Nas bordas ósseas do defeito, aos 15 dias, houve neoformação óssea reparativa e restrita a estas, com presença de osteoblastos ativos. Nestas áreas, aos 45 dias, a neoformação óssea apresentava-se em maior extensão do que o ponto biológico anterior, com osteoblastos ativos e alguns osteócitos. Aos 120 dias, este tecido neoformado estava estável, sem características de proliferação, com presença de osteócitos (Fotomicrografia1 e 3a).

A outra região reparativa, correspondente ao defeito produzido, estava preenchida, aos 15 dias, por tecido conjuntivo frouxo, com uma espessura reduzida em relação à morfologia do defeito. Este tecido estava bem vascularizado por capilares sanguíneos, com proliferação de células fusiformes mesenquimais, mais acentuadas na região voltada para a dura máter. O tecido conjuntivo, nesta área, estava mais adensado. Esta região reparativa, aos 45 dias, encontrava-se preenchida por tecido conjuntivo denso e bem delgado em espessura, com vascularização capilar sanguínea reduzida. Aos 120 dias, este tecido conjuntivo estava ainda mais delgado que o ponto biológico anterior, preenchendo toda a área reparativa do defeito (Fotomicrografia1, 2 e 3).

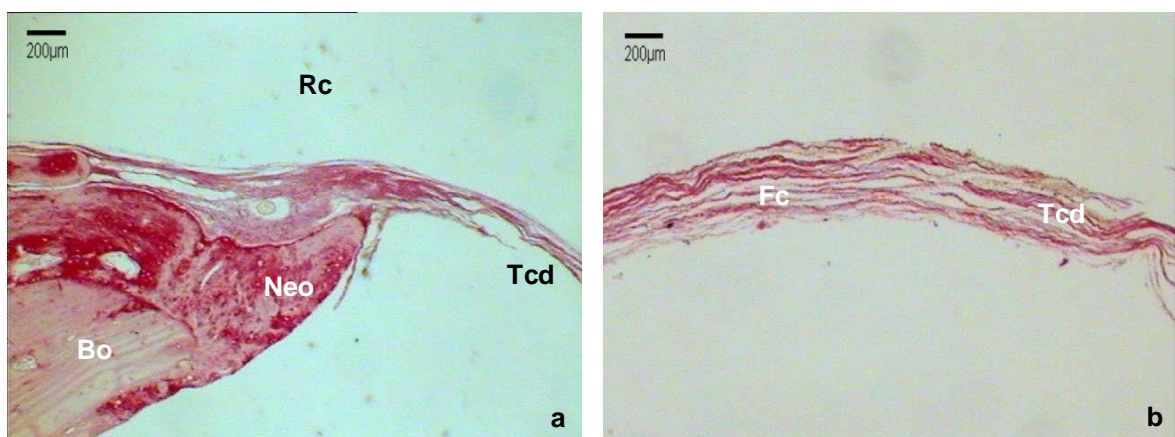
Aos 15 dias, houve um discreto infiltrado inflamatório mononuclear difuso, entretanto, aos 45 dias e 120 dias, este achado não mais foi observado.



Fotomicrografia 1 - GI 15 dias: **(a)** Região central do defeito preenchido por fibras colágenas (Fc) do tecido conjuntivo fibroso (Tcf) – HE – Obj.1x; **(b)** Reparo ósseo restrito a borda óssea, com neoformação óssea (Neo) – Tricômico de Goldner – Obj.10x.



Fotomicrografia 2 - GI-45 dias: Região central do defeito preenchido por tecido conjuntivo denso (Tcd) – HE – Obj.1x.



Fotomicrografia 3 – GI-120 dias: **(a)** Neoformação óssea restrita às bordas ósseas (Bo). Tecido conjuntivo fibroso com espessura aquém a da borda óssea – PIFIG – Obj.1x; **(b)** Tecido conjuntivo bastante delgado (Tcd) nas demais áreas do defeito – PIFIG – Obj.1x.

5.2 GII - HIDROXIAPATITA ASSOCIADA AO ALGINATO (HA – Alg)

As bordas ósseas, aos 15 dias, apresentavam-se com neoformação óssea reparativa discreta e em pequena extensão, com osteoblastos ativos e poucos osteócitos. Esta neoformação óssea, aos 45 dias, possuía uma extensão estável, em relação aos 15 dias, com poucos osteoblastos e vários osteócitos. As bordas, aos 120 dias, apresentavam-se estáveis sem características de proliferação óssea reparativa, com presença de osteócitos.

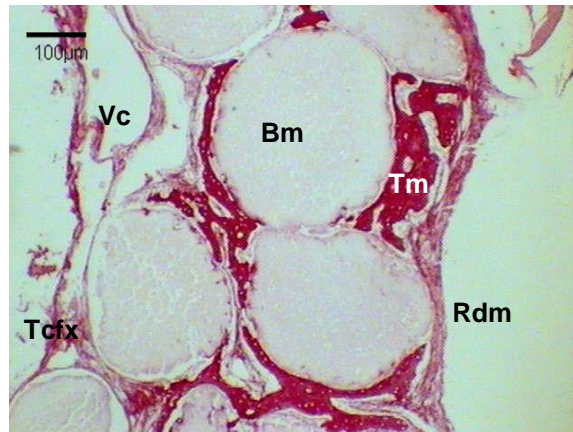
Na outra região reparativa do defeito, preenchida pelas microesferas, aos 15 dias, havia um tecido conjuntivo frouxo localizado de permeio ao biomaterial, com acentuada proliferação de células fusiformes e muitos capilares sanguíneos, bem como, poucas células inflamatórias mononucleares, em acúmulos focais. Este tecido conjuntivo, aos 45 dias, estava denso, com células fusiformes de permeio, porém, com moderada quantidade de células inflamatórias mononucleares e vários capilares sanguíneos. O tecido conjuntivo, aos 120 dias, estava frouxo, muito delgado e bem vascularizado localizado somente na região superior do defeito voltada para o tecido cutâneo. Havia escassas células inflamatórias mononucleares, associadas somente às áreas de mineralização, na região central do defeito, neste mesmo ponto biológico.

O biomaterial, aos 15 dias, estava disposto, na maioria dos casos, em duas ou três camadas de microesferas, na maioria das vezes estavam íntegras e, ocupando toda a extensão do defeito. Observou-se áreas de mineralização na região voltada para a dura máter, e contíguas às bordas do defeito, mas também, em pequena quantidade, de permeio e em contato com algumas microesferas, mesmo na região central do defeito (Fotomicrografia 4).

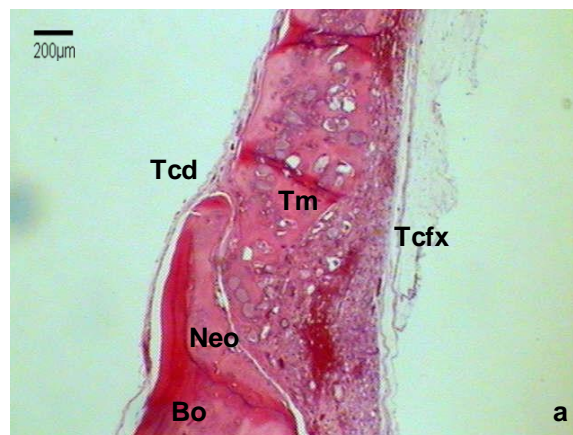
As microesferas, aos 45 dias, estavam fragmentadas em variados tamanhos e estes fragmentos apresentavam-se dispostos em toda a extensão e espessura do defeito. Estavam circundados por abundante tecido mineralizado, exceto na área central do defeito, correspondente à veia central. A maioria destes fragmentos estava aprisionada no tecido neomineralizado, com presença de osteoblastos ativos e osteócitos (Fotomicrografias 5a e 5b).

Os fragmentos das microesferas, aos 120 dias, apresentavam-se incorporados ao tecido neomineralizado. Este tecido se estendia por todo o defeito,

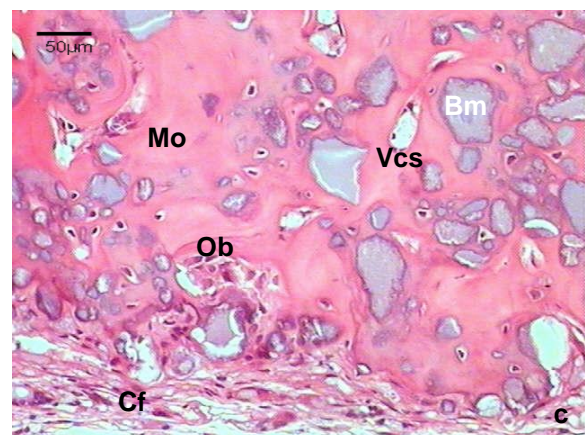
e ocupava quase toda a extensão e espessura deste, exceto na sua área central correspondente a veia central. O tecido estava mais adensado e compacto, em relação à mineralização, com maior quantidade de osteócitos e sem formação de medula óssea (Fotomicrografias 6 e 7).



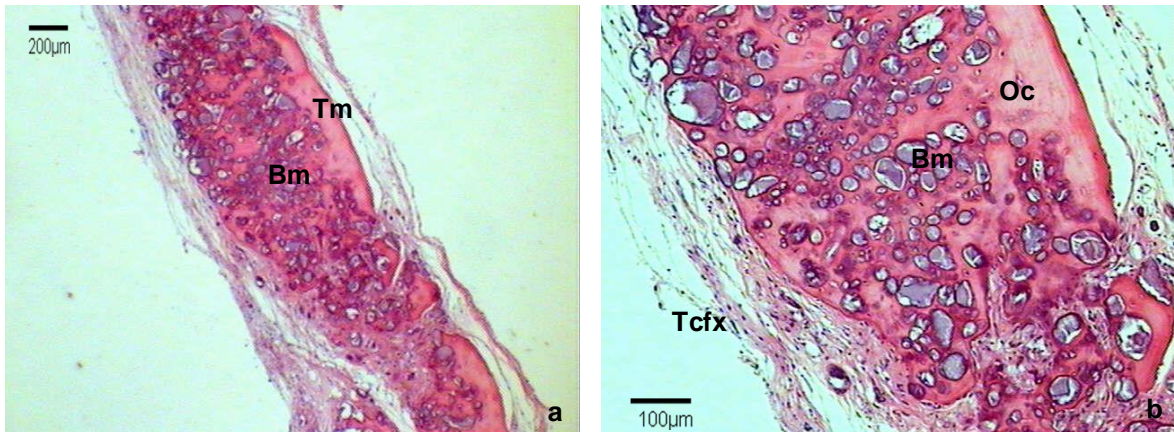
Fotomicrografia 4 - GII-15dias: Região central do defeito próximo a veia central (Vc). Tecido mineralizado (Tm) envolvendo microesferas do biomaterial (Bm), mais evidente na região da dura-máter (Rdm) – PIFIG – Obj.10x.



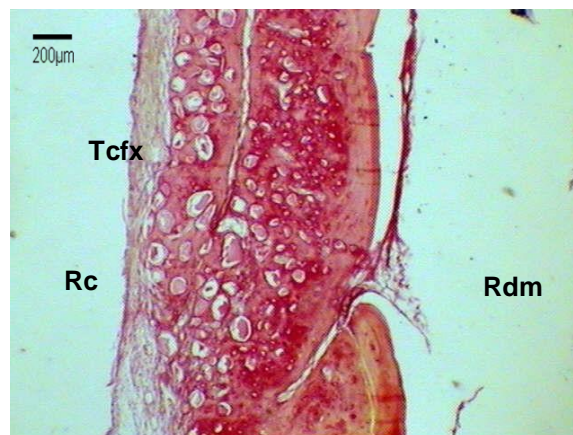
Fotomicrografia 5 – GII-45dias: **(a)** Região da borda óssea (Bo). Neoformação óssea (Neo) com fragmentos do biomaterial – PIFIG – Obj.1x;



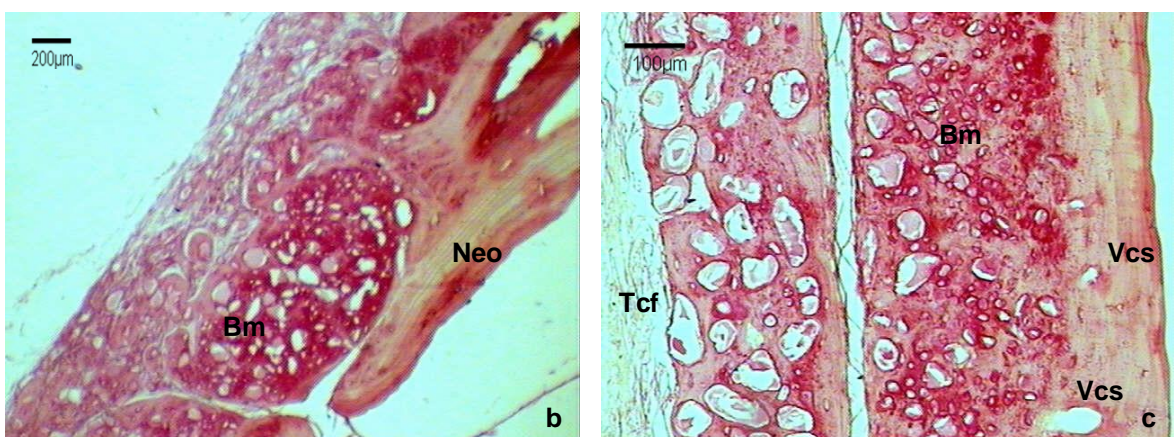
(b) Região central do defeito com microesferas fragmentadas (Bm) e presença de tecido mineralizado (Tm) – PIFIG – Obj.1x; **(c)** Detalhe da fotomicrografia anterior, com fragmentação das microesferas e aposição de tecido mineralizado. Presença de células fusiformes (Cf), osteoblastos ativos (Ob) e osteócitos (Oc) – HE – Obj.20x.



Fotomicrografia 6 - GII-120 dias **(a)** Microesferas fragmentadas (Bm) e incorporadas ao tecido neomineralizado (Tm) – HE – Obj.1x; **(b)** Detalhe da figura anterior. Presença de osteócitos (Oc) e tecido conjuntivo frouxo (Tcfx), delgado – HE – Obj.10x.



Fotomicrografia 7 - GII-120dias: **(a)** Tecido conjuntivo frouxo (Tcfx) na região do tecido cutâneo (Rc) – PIFIG – Obj.1x;



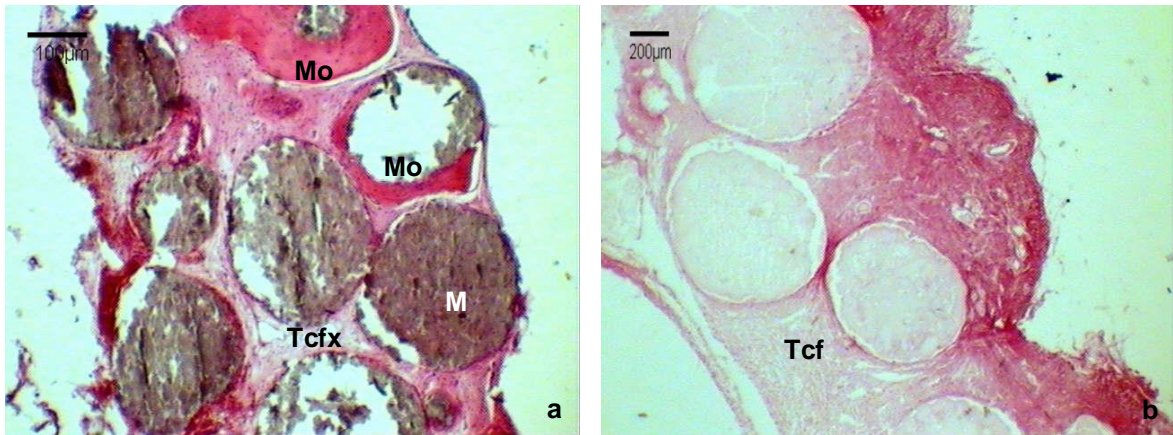
(b) Tecido ósseo neomineralizado (Neo) e fragmentos das microesferas incorporadas a esse tecido – PIFIG – Obj.1x; **(c)** Tecido ósseo mais compacto e adensado na região da dura mater (Rdm) e tecido conjuntivo frouxo na região do tecido cutâneo (Rc) – PIFIG – Obj.10x.

5.3 GIII - HIDROXIPATITA DOPADA COM ESTRÔNCIO (HASr)

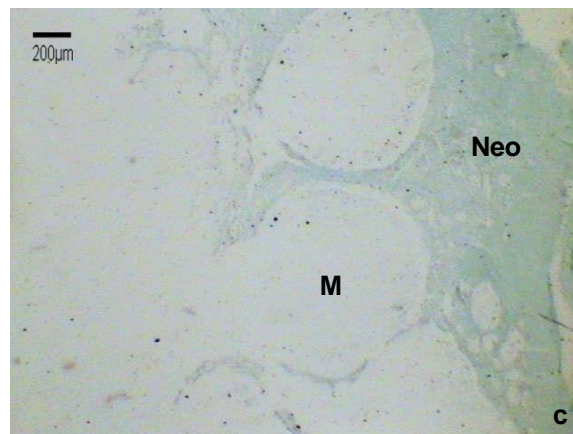
As bordas ósseas, aos 15 dias, apresentavam ossificação reparativa com osteoblastos ativos. Esta ossificação, aos 45 dias, apresentava-se estável, com presença de osteócitos. Não houve atividade, aos 120 dias, de neoformação óssea reparativa, além da observada nos pontos biológicos anteriores.

Na outra área reparativa do defeito, que estava preenchida pelo biomaterial, aos 15 dias, existia a formação de um tecido conjuntivo frouxo localizado em toda a extensão do defeito e também de permeio ao biomaterial. Este tecido possuía abundante infiltrado inflamatório mononuclear difuso, assim como, abundante vascularização capilar sanguínea. O tecido conjuntivo estava fibroso, aos 45 dias e ocupava toda a extensão do defeito, com proliferação de células fusiformes e capilares sanguíneos entre o biomaterial, com discreto infiltrado inflamatório mononuclear difuso, entre os fragmentos das microesferas (Fotomicrografia 9a e 9b). O tecido conjuntivo encontrava-se frouxo, aos 120 dias, com áreas de deposição de colágeno em torno dos biomateriais (Fotomicrografia 11b e 11c).

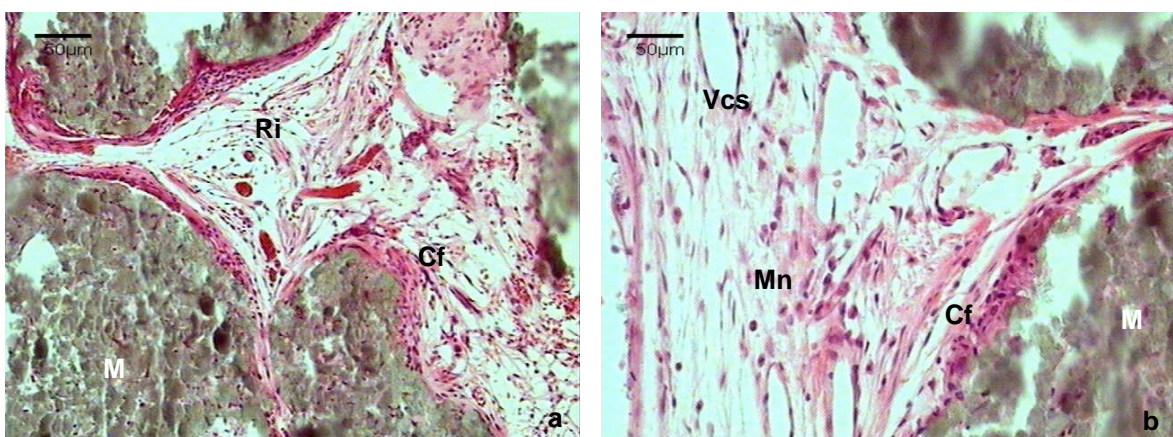
O biomaterial, aos 15 dias, preenchia, na maioria dos casos, toda a extensão e espessura do defeito, disposto em duas ou três camadas de microesferas e algumas destas com fragmentação parcial. Observou-se a ausência de mineralização (Fotomicrografias 8a, 8b e 8c). As microesferas, aos 45 dias, estavam em maior fragmentação do que aos 15 dias, e a neomineralização tecidual se fez em lamelas concêntricas justapostas, particularmente circundando fragmentos menores. Aos 120 dias, as microesferas ainda permaneciam em parcial fragmentação e algumas regiões estavam circundadas por tecido mineralizado, sem coesão completa, quando localizadas na região central do defeito. Havia um início de penetração de delgados septos de tecido conjuntivo frouxo no biomaterial, com presença de células fusiformes (Fotomicrografias 10 e 11).



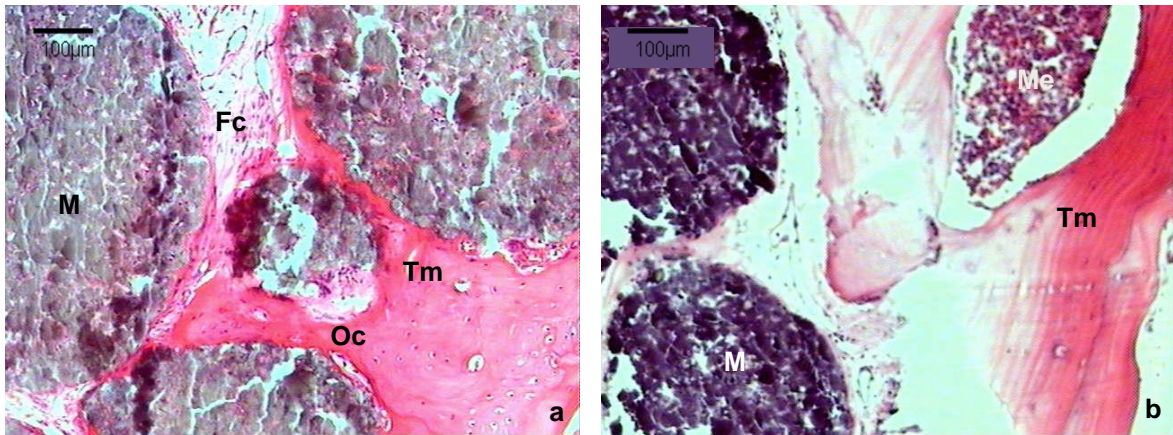
Fotomicrografia 8 - GIII-15 dias: **(a)** Microesferas do biomaterial (M) preenchendo a região do defeito dispostas em duas a três camadas e tecido conjuntivo frouxo (Tcfx) de permeio; matriz osteóide (Mo) em torno de algumas microesferas – HE – Obj.10x; **(b)** Tecido conjuntivo fibroso (Tcf) – PIFIG - Obj.1x.



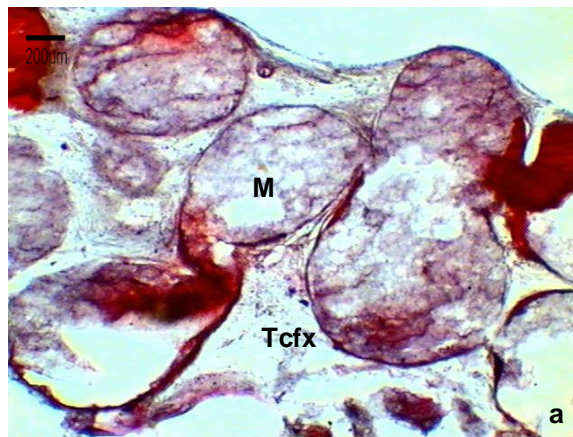
(c) Neoformação óssea – Tricrômico de Goldner – Obj.1x.



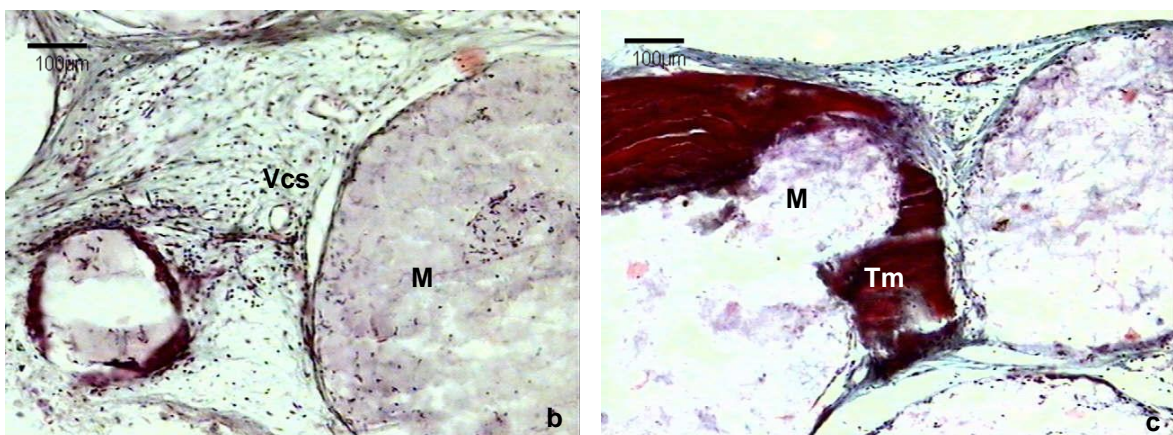
Fotomicrografia 9 - GIII-45 dias: **(a)** Discreto infiltrado inflamatório mononuclear difuso (Ri) entre os fragmentos das microesferas (M); células fusiformes (Cf) – HE – Obj.20x; **(b)** Capilares sanguíneos (Vcs); células fusiformes (Cf), células mononucleares (Mn) – HE – Obj.20x.



Fotomicrografia 10 - GIII-120 dias: **(a)** Esferas parcialmente fragmentadas, delgados septos de tecido conjuntivo frouxo; microesferas circundadas por tecido mineralizado; osteócitos (Oc); Fibras de colágeno (Fc) – HE – Obj.10x; **(b)** Tecido mineralizado (Tm); medula óssea (Me) – HE – Obj.10x.



Fotomicrografia 11 - GIII-120 dias: **(a)** Tecido conjuntivo frouxo de permeio as microesferas do biomaterial – Tricrômico de Goldner – Obj.1x. Corte em resina;



(b) Fibras de colágeno (Fc), capilares sanguíneos (Vcs) - Tricrômico de Goldner – Obj.10x. Corte em resina; **(c)** Tecido mineralizado (Tm) em torno das microesferas - Tricrômico de Goldner – Obj.10x. Corte em resina.

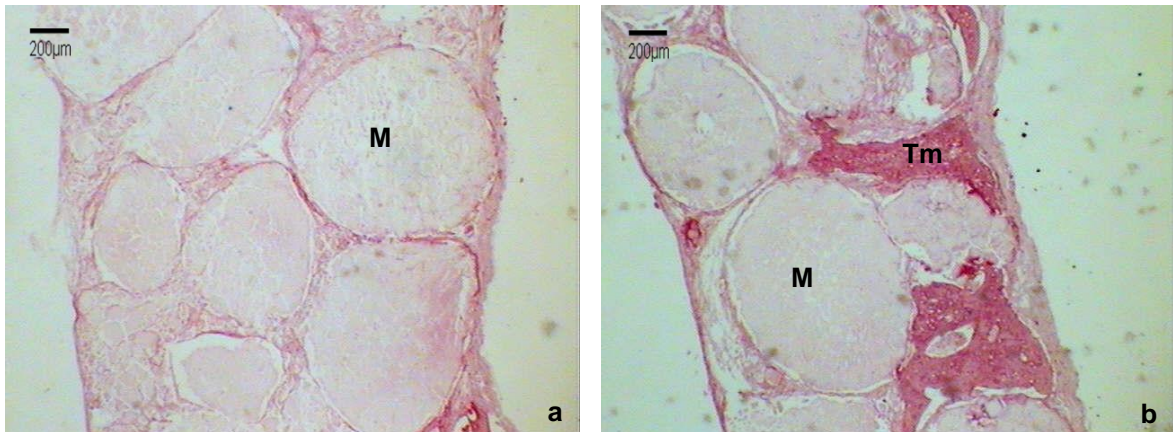
5.4 GIV - HIDROXIAPATITA DOPADA COM ESTRÔNCIO ASSOCIADA AO ALGINATO (HASr- Alg)

Notou-se nas bordas ósseas do defeito, aos 15 dias, uma ossificação reparativa, porém, com discreta atividade de osteoblastos. Aos 45 e 120 dias, estas bordas já apresentavam uma ossificação reparativa estável com ausência de osteoblastos ativos e presença de osteócitos.

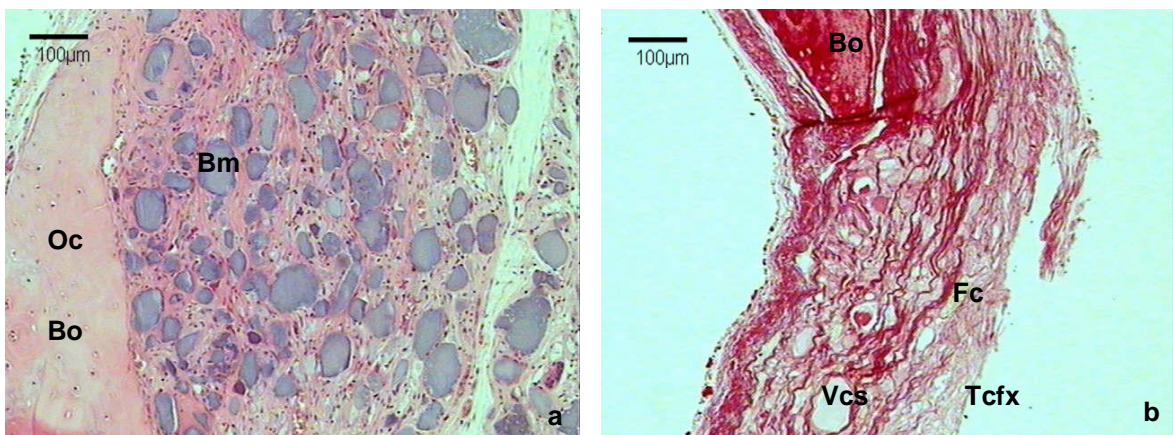
O tecido conjuntivo frouxo, aos 15 dias, apresentava-se com moderado infiltrado inflamatório mononuclear difuso e proliferação de vasos capilares sanguíneos.

Aos 45 dias, o tecido conjuntivo frouxo, com algumas áreas de deposição de colágeno e proliferação de vasos sanguíneos capilares, estava localizado em toda a extensão do defeito e em torno dos biomateriais. Havia um infiltrado inflamatório mononuclear difuso e uma reação granulomatosa em torno dos fragmentos do biomaterial. O tecido conjuntivo frouxo, aos 120 dias, com áreas de deposição esparsa de colágeno, estava localizado próximo aos restos dos fragmentos do biomaterial. Havia presença de infiltrado inflamatório moderado mononuclear difuso. A reação granulomatosa estava menos acentuada do que aos 45 dias, circundando os pequenos fragmentos remanescentes do biomaterial.

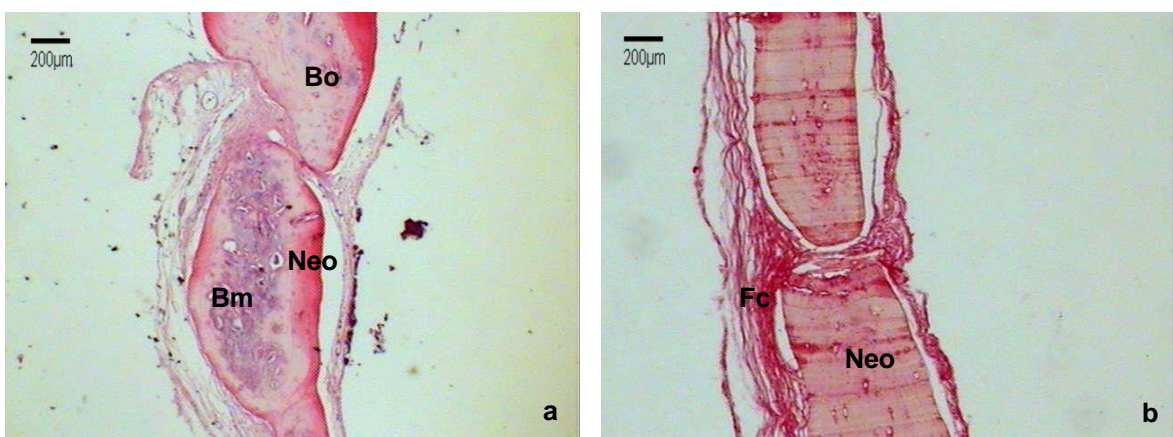
A maioria das microesferas, aos 15 dias, estava parcialmente fragmentada, preenchendo toda a extensão e espessura do defeito, na maioria das vezes, dispostas em duas ou três camadas. Quando estas estavam localizadas próximas às bordas ósseas existia mineralização entre elas, com presença de osteoblastos e osteócitos (Fotomicrografias 12a e 12b). Notou-se, aos 45 dias, as microesferas totalmente fragmentadas com fragmentos em tamanhos diminutos. Havia formação escassa de tecido mineralizado em focos esparsos, de pequenas dimensões (Fotomicrografias 13a e 13b). Aos 120 dias, quando comparado ao ponto biológico anterior observou-se fragmentos das microesferas, com tamanhos ainda menores e focos esparsos de mineralização, com ausência de osteoblastos ativos (Fotomicrografias 14 e 15).



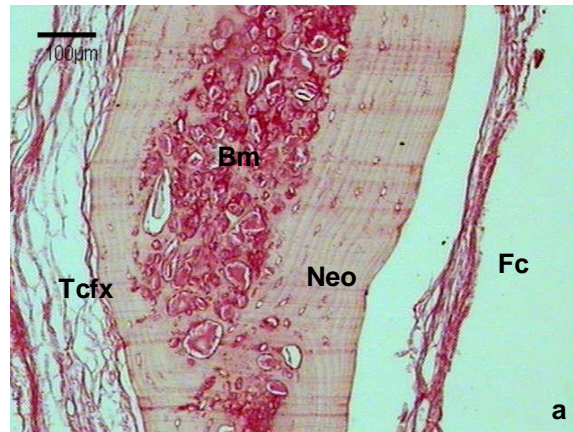
Fotomicrografia 12 - GIV-15dias: **(a)** Microesferas dispostas em duas ou três camadas, parcialmente fragmentadas em toda a extensão e espessura do defeito – HE – Obj.1x; **(b)** Tecido mineralizado de permeio as microesferas próximas às bordas ósseas – HE – Obj.1x.



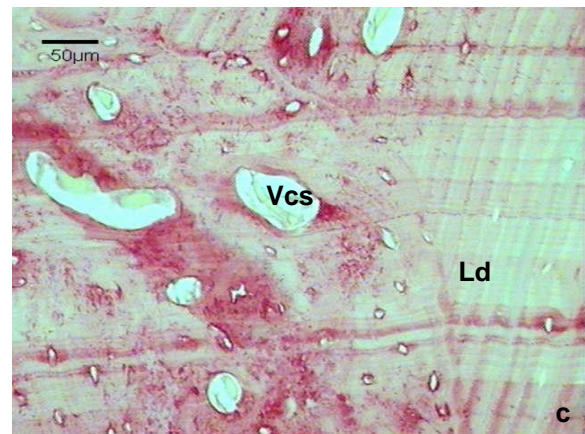
Fotomicrografia 13 - GIV-45 dias: **(a)** Borda óssea com ossificação reparativa estável, com osteócitos (Oc); microsferas (Bm) – HE – Obj.10x; **(b)** Tecido conjuntivo frouxo, com deposição de colágeno (Fc) e proliferação de vasos sanguíneos (Vcs) – PIFIG – Obj.10x.



Fotomicrografia 14 - GIV-120 dias: Região próxima a borda óssea. **(a)** Biomaterial fragmentado em tamanhos diminutos – HE – Obj.1x; **(b)** Neoformação óssea e fibras de colágeno (Fc) circundando o tecido mineralizado – PIFIG –Obj.1x.



Fotomicrografia 15 - GIV-120 dias: **(a)** Tecido ósseo neoformado, mineralizado e estável; tecido conjuntivo frouxo com áreas esparsas de deposição de fibras colágenas – PIFIG – Obj.10x;



(b) Biomaterial fragmentado envolto por tecido ósseo neoformado, fibras colágenas – PIFIG – Obj.20x; **(c)** Tecido ósseo maduro com linhas de deposição cíclica de osso (Ld); lacunas de osteócitos; vasos capilares sanguíneos (Vcs) – PIFIG – Obj.20x.

Discussão

6 DISCUSSÃO

O aumento na expectativa de vida da população proporciona a exposição a inúmeras situações tais como, doenças degenerativas, alterações metabólicas, osteoporose, fraturas, lesões císticas, perdas ósseas extensas decorrentes de acidentes automobilísticos, e da própria violência urbana, entre outros. Muitas destas situações clínicas são desafiadoras. Neste sentido, tem sido realizadas inúmeras pesquisas no campo da Bioengenharia Tecidual no intuito de desenvolver materiais capazes de promover a regeneração tecidual, reestabelecendo a estética, a função e auto-estima do paciente.

Nestas perspectivas, os estudos experimentais devem mimetizar aquelas situações, nas quais existam desafios em relação à regeneração tecidual óssea. Considerando-se as devidas proporções, embora não pertença a mesma categoria filogenética dos primatas, os modelos experimentais, *in vivo*, que utilizam o rato *norvegicus* da linhagem *wistar*, como evidenciado neste estudo, servem de parâmetro comparativo ao que ocorre nos mecanismos de regeneração óssea humana, na análise do potencial osteogênico de biomateriais. Os animais de pequeno porte apresentam metabolismo ósseo mais acelerado e, portanto apresentam capacidade regenerativa óssea distinta da que ocorre em humanos. Porém, esta espécie é bem aceita e utilizada em pesquisas pela comunidade científica.

Este modelo experimental apresenta facilidades de aquisição, de manuseio, de criação e manutenção em biotério, e ainda possibilita realizar diferentes tipos de análises, dentre elas, histológica, bioquímica e radiográfica, do reparo de defeitos ósseos. Além disso, ainda é possível padronizar e controlar algumas variáveis, tais como idade, peso, condições ambientais de temperatura, luminosidade,

alimentação, ingestão de água, minimizar o estresse no manuseio e aplicar a dose adequada do anestésico de acordo com o peso do animal.

Os animais utilizados neste estudo eram adultos, e portanto, o seu metabolismo ósseo é mais lento e estável, diferentemente de animais jovens em que a neoformação e remodelação óssea é mais dinâmica para atender as demandas naturais do processo de crescimento esquelético do animal. Os fatores hormonais de ratas fêmeas, também podem influenciar no mecanismo de reparo ósseo (CACCIAFESTA e outros, 2001; DAHL e outros, 2001; AUER e outros, 2007; LANDI e outros, 2007), além disso, acredita-se que são mais sensíveis ao ruído, ao cheiro, e as variações de temperatura, o que pode dificultar o manuseio do animal nas etapas cirúrgicas (AUER e outros, 2007), por isso foram escolhidos animais machos. Não foi administrado nenhum analgésico nem antiinflamatório, no pós-operatório, visto que estes interferem no mecanismo de reparo (AUER e outros, 2007; LAMANO-CARVALHO, 2007), porém foram seguidas as condições éticas pré-estabelecidas.

O tecido ósseo tem capacidade regenerativa espontânea, contudo há limitações, na qual se determina um defeito ósseo como crítico.

A região anatômica escolhida foi a calvária, pois apresenta: metabolismo ósseo lento quando comparado aos ossos longos; menor suprimento sanguíneo, o que dificulta o aporte de nutrientes, células, sinalizadores biológicos ao local lesionado; menor espessura de tecido medular, o que pode tornar crítico a fixação do enxerto e ocasionar fraturas (BOSCH, MELSEN, VARGERVIK, 1998).

Deve-se considerar também, que defeitos em calvária não se reparam da mesma forma que defeitos em ossos longos, pela sua morfologia, carga funcional a que estão sujeitos e metabolismo ósseo distintos. Esse metabolismo também é variável se o tecido ósseo a ser reparado é cortical ou medular (DAHL e outros, 2001; AUER e outros, 2007). Na díplôe da calvária, entre as suas tábuas corticais, o osso esponjoso apresenta pouca espessura. Esse aspecto anatômico é semelhante ao do osso alveolar. A origem embriológica e a morfologia da calvária, bem como o tipo de ossificação, intramembranosa, são semelhantes aos ossos membranosos da face. No entanto, o local de eleição para pesquisas com o uso de biomateriais com objetivo de avaliar os mecanismos de regeneração tecidual e o potencial osteogênico é em calvária (BUCKWALTER, GLIMCHER, COOPER, 1995).

Para acesso ao osso parietal da calvária foi realizada uma incisão bicoronal cutânea, em formato de meia lua, a qual gera um retalho amplo, que cobre bem a

área do defeito e facilita a visualização do campo cirúrgico; com mobilidade e de fácil manejo; com base bem vascularizada e com bordas em bisel, adequadas para a síntese cruenta por meio da sutura. Não é recomendada a incisão seguindo a direção da sutura sagital realizada em algumas pesquisas (BOSCH, MELSEN, VARGERVIK, 1995; CACCIAFESTA e outros, 2001; MEINEL e outros, 2005) pois, no reposicionamento do retalho a coaptação das bordas fica sobreposta à área do defeito e ao biomaterial, fazendo com que dois processos de cicatrização, do tegumento e do osso interajam e afetem os resultados da regeneração óssea. Além disso, é comum ocorrer extravasamento do biomaterial se a sutura com pontos interrompidos estiver inadequada. E também, há um maior risco de contaminação da ferida e rompimento dos pontos, por causa dos hábitos, próprios do animal, de coçar a cabeça com as patas para higienizar o pêlo e ao dormir posicionar a cabeça em decúbito dorsal, em contato com a maravalha. Essa maravalha embora trocada diariamente pode conter vestígios de fezes ou de urina do animal.

No presente estudo, os defeitos críticos em calvária de rato foram confeccionados com trefinas de 8mm em seu diâmetro interno, o que possibilitou um defeito final com 8,5mm. Esse diâmetro tem dimensão suficiente para limitar a regeneração óssea espontânea, o qual foi comprovado com os resultados encontrados no grupo controle. Além disso, durante a confecção dos defeitos ósseos transfixados, o periósteo aderido ao osso, membrana conjuntiva rica em células osteoprogenitoras, foi removido, ficando restrita sua influência apenas nas áreas ósseas adjacentes às bordas cruentas.

O defeito, quando confeccionado no centro da calvária, não tem interferência da musculatura adjacente da orelha, disponibiliza grande área óssea e permite o acesso adequado. Porém, como inconvenientes desse modelo experimental, é requerido habilidade e domínio da técnica cirúrgica na confecção do defeito em uma área anatômica convexa e com estruturas delicadas como a veia central, localizada logo abaixo da sutura sagital, a dura máter e a massa encefálica do animal. A convexidade da calvária pode interferir na estabilidade da trefina durante a trepanação do osso.

Outros defeitos críticos, em fêmur, em tíbia e bilaterais em calvária tem sido encontrados na literatura (BOSCH, MELSEN, VARGERVIK, 1995; CACCIAFESTA e outros, 2001; RUPPRECHT e outros, 2003; MEINEL e outros, 2005). Os defeitos bilaterais em calvária de ratos são contra-indicados, pois ficam muito próximos um

do outro na linha sagital. Nestes casos, pode ocorrer fratura e a intercomunicação entre os dois defeitos, o que afetaria os resultados da pesquisa na avaliação da regeneração tecidual.

A morfologia circular do defeito crítico em calvária de rato, com dimensões de aproximadamente 8mm, primeiramente descrita por Takagi e Urist (1982), está bem consolidada em trabalhos mais recentes (SCHMITZ, HOLLINGER, 1986; CHESMEL e outros, 1998; LIM, LEE, YEO, 2001; FERREIRA e outros, 2004; MARINS e outros, 2004; MENDONÇA, 2005; KNESER e outros, 2006; PARK e outros, 2009), e em nosso grupo de pesquisa (BARRETO, 2006; MIGUEL e outros, 2006; BARRETO, 2008; MIGUEL, 2008).

Outros estudos em calvárias de rato com diâmetros menores, 4mm (MULLIKEN e GLOWACKI, 1980), 5mm (BOSCH, MELSEN, VARGERVIK, 1995 e 1998; CACCIAFFESTA e outros, 2001) e 6mm (BRUNEL e outros, 1996) também foram encontrados. Portanto, não há consenso na literatura sobre o tamanho exato para considerar o defeito como crítico, isto pode variar conforme o modelo animal, com suas distintas características metabólicas, anatômicas, fisiológicas, diferentes entre as espécies e a região em estudo (BOSCH, BOSCHMELSEN, VARGERVIK, 1998). Um defeito circular de 4mm, em mandíbula de camundongo, ou de 8mm em calvária de rato, não se regeneram espontaneamente sem que haja uma intervenção terapêutica. Entretanto, para animais de maior porte (cobaias, coelhos, cães, ovelhas) defeitos de 8,5mm em calvária não são considerados críticos. Nestes animais defeitos críticos estão entre 17 e 35mm. Segundo Bosch, Boschmelsen, Vargervik (1998), o sítio de implantação deve incluir de preferência tanto osso cortical quanto medular; o defeito deve ser estável; deve ser realizado em região anatômica que apresente mínimo risco à fratura; o modelo animal escolhido deve facilitar as diversas análises de resposta biológica à implantação do biomaterial; o tamanho do defeito não deve ter o tamanho mínimo recomendado para cada espécie.

No presente estudo, observou-se, nos achados histológicos, no qual o defeito não foi preenchido por nenhum biomaterial, apenas pelo coágulo (GI), que os resultados foram condizentes com a literatura quanto ao reparo de defeitos críticos, com formação óssea centrípeta restrita às bordas do defeito, e formação de tecido conjuntivo fibroso nas demais áreas do defeito. Esses achados histológicos foram confirmados por outros pesquisadores (TAKAGI, URIST, 1982, MARINS e outros,

2004; MENDONÇA, 2005; KNESER e outros, 2006; MIGUEL e outros, 2006; BARRETO, 2008; MIGUEL 2008).

A neoformação óssea restrita as bordas do defeito, no grupo I evoluiu gradativamente de acordo com os pontos biológicos, 15, 45 e 120 dias. Os osteoblastos ativos são vistos, aos 15 dias e aos 45 dias. Neste último período, além destes, observou-se osteócitos ativos e também, maior extensão da neoformação óssea. Aos 120 dias a neoformação óssea mostrou-se estável, sem características de proliferação e com a presença de osteócitos, compatível com a característica histológica que caracteriza o defeito crítico. Na área residual do defeito, o tecido conjuntivo formado também mostrou gradações na sua densidade, espessura e vascularização sanguínea.

A neoformação óssea restrita às bordas provavelmente foi influenciada por alguns fatores: a ruptura vascular nas bordas cruentas do defeito, liberação de fatores inflamatórios, angiogênicos, de crescimento e diferenciação celulares, periosteó adjacente ao defeito, rico em células osteoprogenitoras e fibras colágenas (BOSCH, MELSEN, VARGERVIK, 1998; LIND e outros, 2000; HSIONG, MOONEY, 2006).

Um discreto infiltrado inflamatório mononuclear difuso foi observado no GI, apenas aos 15 dias condizentes com o mecanismo inicial do reparo devido à lesão tecidual causada pela confecção do defeito ósseo, de forma semelhante àquela encontrada por Barreto (2006), Miguel e outros (2006), Miguel (2008) e Paula (2008). A confecção do defeito em calvária promove a liberação de citocinas e mediadores químicos que iniciam uma resposta inflamatória em paralelo à formação do coágulo sanguíneo. Esta reação inflamatória é mais evidente quando da implantação de um biomaterial ao sítio do defeito (LIND e outros, 2000; ANDERSON, RODRIGUES, CHANG, 2008).

Em relação à mineralização, em defeitos preenchidos apenas por coágulo, que não forem cuidadosamente irrigados para evitar a presença de espículas ósseas residuais, pode ocorrer a formação de núcleos de mineralização. Esse achado histológico não foi encontrado no nosso estudo, porém foi visto aos 15 e 45 dias, na área central do defeito, de outros estudos (MIGUEL e outros, 2006; BARRETO, 2008; MIGUEL 2008; PAULA, 2008).

Nos demais grupos, preenchidos por microesferas biocerâmicas, observou-se neoformação óssea nas bordas ósseas, em toda espessura e extensão do defeito,

exceto na região correspondente a veia central. A neoformação óssea foi mais evidente, em todos os pontos biológicos em estudo, especialmente no grupo GII. A neoformação óssea, nas bordas ósseas, foi progressivamente estabilizada, com ausência de osteoblastos ativos e presença de osteócitos.

As HAs sintéticas puras apresentam características importantes como substitutos ósseos empregados pela bioengenharia tecidual e podem ser classificadas de acordo com a sua biodegradação e biodisponibilidade no sítio do defeito. Elas permitem a adsorção de proteínas e adesão de osteoblastos a sua superfície (THORWARTH e outros, 2005).

A composição química influenciou diretamente no comportamento biológico das microesferas, quanto à biodegradação, biocompatibilidade e neoformação óssea. Os grupos, GIII e GIV com estrôncio em sua composição, fragmentaram mais quando comparado ao grupo GII. As microesferas de hidroxiapatita que contém 1% de estrôncio apresentaram maior solubilidade em meio biológico. É sugestivo que os grupos com estrôncio não apresentam biodegradação controlada compatível como tempo necessário para que haja neoformação óssea. Em estudos de Liao e outros, (2002), semelhante ao presente estudo, foi observado melhor biocompatibilidade e uma alta taxa de biodegradação da HASr quando comparada com a HA pura. A adição de estrôncio à estrutura da hidroxiapatita modifica as propriedades físico-químicas e cristalográficas e, portanto, as propriedades biológicas desse biomaterial. O estrôncio presente na hidroxiapatita estimula a formação de matriz, a proliferação e diferenciação de células pré-osteogênicas em osteoblastos, inibe os osteoclastos e conseqüentemente a reabsorção óssea, estimula a adesão, proliferação e migração de células endoteliais ao implante, incrementa a angiogênese na regeneração óssea (DAHL e outros, 2001; LIAO e outros, 2002; ALKHRAISAT e outros, 2008; CHEN e outros, 2008).

A adição de Sr à hidroxiapatita do tecido ósseo proporciona aumento em sua densidade mineral. Esse aumento da densidade, nem sempre é proporcional ao aumento da resistência mecânica do osso tratado com íons Sr. Este aspecto depende da dose de Sr administrado oralmente ou da concentração de Sr incorporado ao tecido ósseo neoformado por meio do uso de biomateriais (CHRISTOFFERSEN e outros, 1997; LANDI e outros, 2007).

Um achado importante no GIII foi a presença de delgados septos de tecido conjuntivo frouxo no material, com presença de células fusiformes. As microesferas

deste grupo foram tratadas termicamente, isto é, calcinas à temperatura de 1000°C. Nesta condição, o alginato é decomposto termicamente, em temperaturas superiores a 200°C, em compostos voláteis, tais como, CO₂, NO e água. Pressupõe-se que este biomaterial (HASr) do grupo GIII, seja mais poroso, e permitiu a presença de septos em seu interior, provavelmente após a calcinação e remoção do alginato formou-se uma HASr carbonatada (RIBEIRO, BARRIAS, BARBOSA, 2006). Estes septos fibrosos também foram relatados por Kuboki (1998), citado por Paula (2008), ao redor do tecido mineralizado adjacentes as partículas fragmentadas do biomaterial. Isto não foi encontrado no grupo GIV (HASr- Alg), nem no GII (HA-Alg).

As formas de apresentação, de consistência, da HA (pó, blocos, cimentos, microesferas, matrizes tridimensionais e no revestimento de implantes metálicos) estão relacionadas com a sua solubilidade, quanto maior a porosidade maior a área de superfície, maior será sua solubilidade (THORWARTH e outros, 2005; RIBEIRO, BARRIAS, BARBOSA, 2006; MIÑO-FARIÑA, e outros, 2007).

As microesferas, empregadas neste estudo, têm diâmetros em média de 400 µm e superfície porosa, o que favorece a adsorção de moléculas mediadoras da sinalização, quimiotaxia e adesão celular, tanto de células inflamatórias, angiogênicas, quanto osteogênicas. (THORWARTH e outros, 2005; SOLTAN, SMILER, CHOI, 2009.).

Os interstícios formados pelas microesferas possibilitam que osteoblastos possam migrar, proliferar e aderir entre as superfícies das mesmas. Essas características são importantes e foram também relatadas por outros autores (RIBEIRO, BARRIAS, BARBOSA, 2004; BARRETO, 2006; VOLKMER, SANTOS, 2007; HABIBOVIC e outros, 2008).

Diversos estudos avaliaram a influência do tamanho das partículas, dos poros e da interconectividade entre os poros, necessário para a osteogênese na regeneração óssea (HOLMES, HAGLER, 1988; HING, BEST, BONFIELD, 1999; FLAUTRE e outros, 2001; GAUTHIER e outros, 2001; MANGANO, BARTOLUCCI, MAZZOCCO, 2003; KURELLA, DAHOTRE, 2005; RIBEIRO, BARRIAS, BARBOSA, 2006; MARCACCI e outros, 2007; KLENKE e outros, 2008; TIAN e outros, 2009).

Não está claramente estabelecido na literatura qual o tamanho ideal da partícula do biomaterial para cada região do defeito ou para cada condição clínica. Os biomateriais implantados em defeitos ósseos podem gerar diversas possibilidades de respostas biológicas influenciadas pela própria característica

físico-química do mesmo, por fatores locais e sistêmicos (MENDONÇA, 2005; FONSECA, 2007; KLENKE e outros, 2008). Segundo a maioria dos autores, o tamanho ideal de partículas é considerado entre 200 a 500µm, e partículas inferiores a 50µm induzem a citotoxicidade.

O tamanho dos poros internos e na superfície do biomaterial pode servir de parâmetro para diferenciar diversas hidroxiapatitas (VOLKMER, SANTOS, 2007; HABIBOVIC e outros, 2008). A forma porosa permite o crescimento de tecido fibrovascular por entre os poros, isso pode ajudar a estabilizar o enxerto e evitar micromovimentações (MIÑO-FARIÑA, e outros, 2007; LONG, 2008). Segundo, Gauthier e outros (2001), o espaço necessário para a passagem de células osteoprogenitoras no interior do biomaterial, que permite a formação de tecido ósseo no interior do mesmo, deve ser de no mínimo 100µm.

A formação de vasos sanguíneos capilares foi observada em todos os grupos e em todos os pontos biológicos deste estudo, porém, ora de permeio ao biomaterial, ora em toda a extensão do defeito, ora mais intensa, ora menos acentuada na reação granulomatosa. A angiogênese, que precede o reparo, permite o aporte de oxigênio e nutrientes à área lesada, sendo modulada por fatores angiogênicos mediadores (VEGF, FGF, TGF-β, PDGF). Estes e outros fatores influenciam na quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular em osteoblastos (HISIONG, MOONEY, 2006).

O coágulo é importante como substrato estrutural e bioquímico, facilitando à interação celular ao biomaterial, além disso, facilita a migração, diferenciação e proliferação celular. Dependendo das características físico-químicas do material implantado, essa formação do coágulo será estimulada e apresentará boas qualidades ao reparo ósseo. O alginato, por exemplo, quando adicionado à HA favorece a formação de coágulo de boa qualidade, devido as suas características poliméricas e de geleificação (ALVES, SANTOS, BERGMANN, 2006).

Em alguns casos, as microesferas movimentaram-se, houve instabilidade do biomaterial no leito do defeito. Isso pode ser explicado pelo formato das microesferas favorecer o deslocamento; a calvária apresenta convexidade; o defeito crítico não forma uma cavidade fechada capaz de reter as microesferas, tal como ocorre nos sistemas injetáveis. As microesferas injetáveis são menos invasivas e permitem o preenchimento do defeito ósseo em sítios irregulares. Além disso, algumas características comportamentais do *Rattus norvegicus*, como o hábito de

dormir com o dorso da calvária voltada para baixo. Durante a cicatrização da ferida, na primeira semana do pós-cirúrgico, percebeu-se que alguns animais sentiam prurido característico dessa fase, o que pode ter favorecido o deslocamento do biomaterial (FLACH e outros, 2008).

As interações entre os biomateriais e os componentes orgânicos locais e sistêmicos são de extrema importância para o entendimento das propriedades e do comportamento dos implantes *in vivo*. É necessário avaliar o comportamento biológico, a citotoxicidade, o potencial angiogênico e osteogênico, a influência das características da superfície desses biomateriais na presença de fluidos corpóreos e/ou de substâncias orgânicas, como proteínas e enzimas. Estas características permanecem pouco conhecidas, uma vez que representam interações de grande complexidade (LIND e outros, 2000).

No grupo GII, o processo inflamatório, pouco evidente, aos 15 dias, se tornou moderado aos 45 dias e escasso aos 120 dias. No grupo GIII esse processo já era abundante aos 15 dias e se tornou progressivamente discreto nos demais pontos biológicos. No grupo GIV, esse infiltrado inflamatório mononuclear difuso permaneceu moderado até o ponto biológico de 45 dias e, aos 120 dias, se tornou menos intenso em torno dos fragmentos do biomaterial. Observa-se que o GII apresenta maior biocompatibilidade, o GIII tem comportamento intermediário quando comparado aos demais grupos, e o GIV menor biocompatibilidade. O processo inflamatório e a reação de corpo estranho foram evidenciados em outros estudos. Acredita-se que esse mecanismo de resposta biológica à presença do biomaterial é importante para que haja a biodegradação do biomaterial, a sinalização de fatores de crescimento e o reparo ósseo (DAGANG, KEWEI, YONG, 2008). Segundo Yang e Jones (2009), o alginato pode estimular uma resposta imune inata, através da liberação de citocinas pró-inflamatórias tais como, a IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α . Esta resposta inflamatória é mediada por macrófagos e linfócitos.

O osso autógeno é considerado o padrão ouro para os padrões de regeneração almejados, muito embora apresente ainda algumas limitações (ZEBEU e MERCADANTE, 2008). No entanto, apesar dos biomateriais empregados neste estudo não disporem em sua constituição de células osteoprogenitoras, componentes orgânicos do osso autógeno, como o colágeno, fatores de crescimento, como por exemplo, BMPs, demonstraram excelentes perspectivas em futuras aplicações clínicas. É necessário o desenvolvimento de novas pesquisas

para melhor avaliar o potencial osteogênico destes aloenxertos bioativos em longo prazo e por meio de outras análises mais específicas.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Nas condições experimentais do nosso estudo, inferimos que:

A) No GI, o reparo ósseo foi apenas reparativo e restrito às bordas ósseas, ratificando o defeito como crítico.

B) Nos demais grupos, preenchidos com as microesferas cerâmicas, apresentaram biocompatibilidade e potencial osteogênico.

C) As microesferas atuaram como um arcabouço tridimensional que favoreceu a osteocondução.

D) A presença de alginato e de íons estrôncio na composição das microesferas de hidroxiapatita favoreceram a formação óssea.

E) No GII, a presença do alginato associado a HA, possibilitou um melhor comportamento biológico, quanto a biocompatibilidade e ao potencial osteogênico, seguido pelo grupo com a HASr e pelo grupo da HASr-Alg.

Referências

REFERÊNCIAS¹

AABOE, M.; PINHOLT, E.M; HJØRTING-HANSEN, E. Healing of experimentally created defects: a review. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v.33, n.5, p.312-8, Oct.1995.

ALKHRAISAT, M.H et al. Strontium modified bioceramics with zero order release kinetics. **Biomaterials**, v.29, p.4691-4697, 2008.

ALMEIDA, J.D. et al. Estudo da reparação óssea em mandíbula de ratos. **Pós-Grad Rev Fac Odontol S J Campos**, v.3, n.1, p.49-53, jan./jun.2000.

ALVES, H.L. R; SANTOS, L.A.; BERGMANN, C.P. Influência de aditivos na injetabilidade de cimento ósseo de fosfato tricálcico. **Matéria**, Rio de Janeiro, v.11, n.3, p. 324-331, 2006.

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

AUER, J.A. et al. Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use. **BMC Musculoskelet Disord**, Aug. 2007. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2474/8/72>> Acesso em: 30 Jul. 2009.

AZEVEDO, V.V.C. et al. Materiais cerâmicos utilizados para implantes. **Rev Eletr Mat Proc**, n.23, p.35-42, 2007.

BARRÈRE, F.; BLITTERSWIJK, C.A.; GROOT, K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. **Intern J Nanomed**, v.1, n.3, p.317–332, 2006.

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

BARRETO, Isabela Cerqueira. **Utilização de microesferas de hidroxiapatita no reparo de defeitos críticos em calvária de rato**. 2008. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas), Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro/Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2008.

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

- BLOM, A.W. et al. Impaction bone grafting of the acetabulum at hip revision using a mix of bone chips and a biphasic porous ceramic bone graft substitute. **Acta Orthop**, v.80, n.2, p.150-4, Apr. 2009.
- BONNELYE, E. et al. Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. **Bone**, v.42, n.1, p.129-38, Jan. 2008.
- BOONTHEEKUL, T.; KONG, H. J.; MOONEY, D. J. Controlling alginate gel degradation utilizing partial oxidation and bimodal molecular weight distribution. **Biomaterials**, v.26, p.2455-65, 2005.
- BOSCH, C.; MELSEN. B.; VARGERVIK, K. Guided bone regeneration in calvarial bone defects using polytetrafluoroethylene membranes. **Cleft Palate-Craniofac J**, v.32, p.311-317, 1995.
- BOSCH, C.; MELSEN. B.; VARGERVIK, K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regeneration materials. **J Craniofac Surg**, v.9, n.4, p.310-316, 1998.
- BRÅNEMARK, P.I.; ZARB, G.A.; ALBREKTSSON, T. Tissue-Integrated Prostheses. Osseointegration in Clinical Dentistry. **Quintess Publish Co, Inc.**, Chicago, 1985, 350p.
- BRUNEL, G. et al. Regeneration of rat calvarial defects using a bioabsorbable membrane technique: influence of collagen cross-linking. **J Periodontol**, v.67, p. 1342-1348, 1996.
- BUCKWALTER, J.A.; GLIMCHER, M.J.; COOPER, R.R. Bone Biology Part I: Structure, blood supply, cells, matrix and mineralization. **J Bone & Joint Surg**, n.77A, p.1256-75, 1995.
- CACCIAFESTA, V. et al. Growth hormone treatment promotes guided bone regeneration in rat calvarial defects. **Eur J Orthod**, v.23, p.733-740, 2001.
- CALAMARI, S. et al. High molecular weight chitosan and sodium alginate effect on secretory acid proteinase of *Candida albicans*. **Rev Iberoam Micol**, v.21, n.4, p.206-208, Dec 2004.
- CANCEDDA, R.; GIANNONI, P.; MASTROGIACOMO, M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice (Review). **Biomaterials**, n.28, p.4240-4250, 2007.
- CAVERZASIO, J. Strontium ranelate promotes osteoblastic cell replication through at least two different mechanisms. **Bone**, v.42, p. 1131-1136, 2008.
- CHEN, Y.W. et al. In vitro study on the influence of strontium-doped calcium polyphosphate on the angiogenesis-related behaviors of HUVECs. **J Mater Sci Mater Med**, v.19, n.7, p.2655-62, 2008.
- CHESMEL, K.D. et al. Healing response to various forms of human demineralized bone matrix in athymic rat cranial defects. **J Oral Maxillofac Surg**, v.56, n.7, p.857-863. Jul. 1998.
- CHRISTOFFERSEN, J. et al. Effects of strontium ions on growth and dissolution of hydroxyapatite and on bone mineral detection. **Bone**, v.20, n.1, p.47-54. Jan. 1997.
- CUTTER, C. S.; MEHRARA, B. J. Bone Grafts and Substitutes. **J Long-Term Effects of Med Implants**, v.16, n.3, p.249-260, 2006.

- DAGANG, G.; KEWEI, X.; YONG, H. The influence of Sr doses on the in vitro biocompatibility and in vivo degradability of single-phase Sr-incorporated HAP cement. **J Biomed Mater Res A**, v.86, n.4, p.947-958, Sep. 15. 2008.
- DAHL, S.G. et al. Incorporation and distribution of strontium in bone. **Bone**, v.28, n.4, p.446-453, 2001.
- DOURADO, Erico Rodrigues. **Preparação e Caracterização de Hidroxiapatita Nanoestruturada Dopada com Estrôncio**. 2006.128p. Dissertação (Mestrado em Física). Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, Rio de Janeiro (RJ), 2006.
- EL-ADL, G. et al. Biphasic ceramic bone substitute mixed with autogenous bone marrow in the treatment of cavitary benign bone lesions. **Acta Orthop Belg**, v.75, n.1, p.110-8, Feb. 2009.
- ELLINGSEN, J.E.; THOMSEN, P.; LYGSTADAAS, S.P. Advances In Dental Implant Materials And Tissue Regeneration. **Periodontol** 2000, v.41, p.136-56, 2006.
- FERREIRA, G. R. et al. Lack of repair of rat skull critical size defect treated with bovine morphometric protein bound to microgranular bioabsorbable hydroxyapatite. **Braz Dent J**, v. 15, p. 175-180, 2004.
- FLACH, D.M. et al. Regeneração óssea em cães e gatos. 2002. Disponível em:<<http://www.geocities.com/CollegePark/Classroom/6137/textrege.html?200821>> Acesso em: 21 mai. 2008.
- FLAUTRE, B. et al. Porous HA ceramic for bone replacement: role of the pores and interconnections – experimental study in the rabbit. **J Mater Sci Mater Med**, v.12, p.679–82. 2001.
- FONSECA, Flavia Mendonça. **Biocerâmicas Porosas Bifásicas e Trifásicas à Base de Hidroxiapatita Produzidas Por Gelcasting**. 2007. 102 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia dos Materiais). Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro (RJ), 2007.
- GAUTHIER, O. et al. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics versus injectable bone substitute: a comparative study 3 and 8 weeks after implantation in rabbit bone. **J Mater Sci Mater Med**, v.12, p. 385–390, 2001.
- GRYNPAS, M.D.; MARIE, P.J. Effects of low doses of strontium on bone quality and quantify in rats. **Bone**, v.11, p.313-319, 1990.
- HABIBOVIC, P. et al. Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants. **Biomaterials**, v.29, n.7, p.944-953, 2008.
- HENCH, L. L.; ETHRIDGE, E. C. In **Biomaterials: an interfacial approach**; Noordergraaf, A., Ed.; Academic Press; New York, 1982; p. 3.
- HENCH, L.L. Bioceramics: From Concept to Clinic. **J Am Ceram Soc**, v.74, n.7, p.1487-1510, 1991.
- HENCH, L.L.; WILSON, J. Introduction. In An Introduction to Bioceramics (L. L. Hench and J. Wilson, eds., **Advanced Series in Ceramics**, v.1, p.1-24, River Edge, NJ. 1993.
- HING, K.A.; BEST, SM.; BONFIELD, W. Characterization of porous hydroxyapatite. **J Mater Sci Mater Med**, v.10, n.3, p.135-145, Mar. 1999.

HING, K.A. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? **Phil Trans R Soc Lond A**, v.362, p. 2821–2850, 2004.

HOLMES, R.; HAGLER, H. Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in maxillary augmentation: a histometric study. **J Craniomax Surg**, v.16, p.199–205, 1988.

HSIONG, S.X.; MOONEY, D.J. Regeneration of vascularized bone. **Periodontol 2000**, v.41, p.109-22, 2006.

HUGHES, J. M.; CAMERON, M.; CROWLEY, K. D. Structural variations in natural F, OH, and Cl apatites. **American Mineralogist**, Holly Springs, Georgia, USA. 1989,74:870-6. Disponível em: http://webmineral.com/jpowd/JPX/jpowd.php?target_file=Hydroxylapatite.jpg
>. Acesso em: 30 Jul 2009.

HULBERT, S.F. et al. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. **J Biomed Mater Res A**, v.4, p.433–56, 1970.

ISHIKAWA, K. et al. Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement: hydroxyapatite putty containing an increased amount of sodium alginate. **J Biomed Mater Res**, v. 36, p. 393-399, 1997.

JHON, H.; WENZ, B. Hystomorphometric analysis of natural bone mineral for maxillary sinus augmentation. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.19, n.2, p.199-207, 2004.

KARLSSON, K.H. Bioactivity of glass and bioactive glasses for bone repair. **Glass Technol**, v.45 , n.4, p.157-61, 2004.

KAWACHI, E.Y. et al. Biocerâmicas: Tendências e Perspectivas de uma Área Interdisciplinar. **Quím Nova**, v.23, n.4, p.518-522, 2000.

KIM, H.W. et al. Strontium substituted calcium phosphate biphasic ceramics obtained by powder precipitation method. **J Mater Sci Mater Med**, v.15, n.10, p.1129-1134, Oct. 2004.

KLENKE, F.M. et al. Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo. **J Biomed Mater Res A**, v.85, n.3, p.777-86, 1 Jun. 2008.

KNESER, U et al. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. **J Cell Mol Med**, v. 10, p.7-19, 2006.

KUO, C.; MA, P. X. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. **Biomaterials**, v.22, p.511-21, 2001.

KURELLA, A.; DAHOTRE, N.B. Review paper: Surface Modification for Bioimplants: The Role of Laser Surface Engineering. **J Biomater Appl**, v.20, p.5-50. 2005.

LANDI, E. et al. Development of Sr and CO₃ co-substituted hydroxyapatites for biomedical applications. **Acta Biomater**, v.4, n.3, p.656-663, May 2008.

LANDI, E. et al. Sr-substituted hydroxyapatites for osteoporotic bone replacement. **Acta Biomater**, v.3, p.961–9, 2007.

- LEGEROS, J.P.; LEGREOS, R.Z. Characterization of Calcium Phosphate Coatings on Implants, In: **Proceedings of the 17th Annual Meetings of the Society for Biomaterials**, (1991). p. 192, Scotsdale, AZ, USA.
- LEGEROS, R.Z.; LEGEROS J.P. CaP Biomaterial in Medical Applications. In Kokubo T, Nakamura T, Miyaji F (eds). **Bioceramics**, Tokyo, p. 7–10, 1996.
- LAMANO-CARVALHO, T.L. Efeito dos Anti-Inflamatórios Não-Esteroidais Convencionais e Seletivos para Cox-2 sobre o Reparo Ósseo. **Acta Ortop Bras**, v.15, n.3, p. 166-168, 2007.
- LIAO, D. et al. A fundamental study on bioreactions of Sr-HA. **Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**, v.20, n.3, p.172-4, Jun 2002.
- LIM, S.C.; LEE, M.J.; YEO, H.H. Effects of various implant materials on regeneration of calvarial defects in rats. **Pathol Inter**, v.50, n.8, p.594-602, 25 Dec. 2001.
- LIND, M. et al. Stimulating Bone Healing. Critical ReviewsTM. **Phys Rehabil Med**, v.12, p.313-43, 2000.
- LONG, P.H. Medical Devices in Orthopedic Applications. **Toxicologic Pathology**, v.36, p.85-91, 2008.
- MACNEILL, S.R. et al. In vivo comparison of synthetic osseous graft materials. A preliminary study. **J Clin Periodontol**, v.26, n.4, p.239-45, Apr. 1999.
- MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte II. **An Bras Dermatol**, v.78, n.5, p. 521-522, 2003.
- MANGANO, C.; BARTOLUCCI, E.G.; MAZZOCCO, C. A news porous hydroxyapatite for promotion of bone regeneration in maxillary sinus augmentation: clinical and histologic study in humans. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.18, n.1, p.23-30, Jan-Feb. 2003.
- MARCACCI, M. et al. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. **Tissue Eng**, v.13, n.5, p.947-955, May. 2007.
- MARIE, P.J. et al. Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. **Cacif Tissue Int**, Lyon, v.69, p.121-129, 2001.
- MARINS, L. V. et al. Radiographic and histological study of perennial bone defect repair in rat calvaria after treatment with blocks of porous bovine organicraft material. **J Appl Oral Sci**, v. 12, p.62-69, 2004.
- MARX, R.E.; GARG, A.K. Bone Structure, Metabolism and Physiology: Its Impact on Dental Implantology. **Implant Dentistry**, v. 7, n.4, p.267-276, 1998.
- MATEUS, A.Y. et al. Comparative study of nanohydroxyapatite microspheres for medical applications. **J Biomed Mater Res A**, v.86, n.2, p.483-493, Aug 2008.
- MAZUMDER, M.A. et al. Core-cross-linked alginate microcapsules for cell encapsulation. **Biomacromolecules**, v. 10, n.6, p.1365-1373, Jun 2009.
- MEINEL, L. et al. Silk implants for the healing of critical size bone defects. **Bone**, v.37, n.5, p. 688-698, 2005.

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

MIGUEL, F. B. et al. Morphological assessment of the behavior of threedimensional anionic collagen matrices in bone regeneration in rats. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v.78, p.334-339, 2006.

MIGUEL, Fúlvio Borges. **Avaliação do potencial osteogênico de matrizes tridimensionais colagênicas aniônicas, reticuladas ou não em glutaraldeído, na regeneração de defeitos críticos, em calvária de rato**. 2008. 158f. Tese (Doutorado em Patologia Humana) Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia/Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2008.

MIÑO-FARIÑA, N. et al. Quantitative analysis of the resorption and osteoconduction of a macroporous calcium phosphate bone cement for the repair of a critical size defect in the femoral condyle. **Vet J**, v.179, n.2, p.264-272, Feb. 2007.

MULLIKEN, J. B.; GLOWACKI, J. Induced osteogenesis for repair and construction in the craniofacial region. **Plast Reconstr Surg**, v.65, p.553-559, 1980.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE STATEMENT ON DENTAL IMPLANTS; 1988 Jun 13-15; **J Dent Educ**, v.52, n.12, p.824-827, Dec. 1988.

NEUMANN, M.; EPPLER, M. Composites of calcium phosphate and polymers as bone substitution materials. **Eur J Trauma**, v.32, p.125-31, 2006.

NGIAM M, et al. The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering. **Bone**, v.45, n.1, p.4-16, 2009.

NI, G.X. et al. Strontium-containing hydroxyapatite (Sr-HA) bioactive cement for primary hip replacement: an in vivo study. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v.77, n.2, p.409-415, May. 2006.

NOTARA, M. et al. Cytocompatibility and hemocompatibility of a novel chitosan-alginate gel system. **J Biomed Mater Res A**, v.89, n.4, p.854-864, Jun 2009.

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

PARK, J.W. et al. Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized rat calvarial defect. **Clin Oral Implants Res**, v.20, n.4, p.372-378, Apr. 2009.

PASSLISK, J. et al. Calcium alginate, an aluminium-free phosphate binder in patients on CAPD. **Clin Nephrol**, v.30,p.96-100,1989.

PAULA, Fabiana Lopes. **Avaliação in vivo de um compósito de hidroxiapatita e alginato no reparo ósseo**. 2008. 138 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro / Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Odontologia, Salvador, 2008.

- PRADO DA SILVA, M.H. **Apostila de Biomateriais**, CERAMED 2007. Disponível em:<http://www.mesonpi.cat.cbpf.br/e2006/posgraduacao/pdf_p3/ApostilaBiomateriais.pdf>. Acesso em: 05 jun. 2007.
- PROUSAEFS, P. et al. Histologic evaluation of a hydroxyapatite onlay bone graft retrieved after 9 years: A clinical report. **J Prosthet Dent**, v.87, p.481–484, 2002.
- 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**, v.17, n.5, p.455-463, 2006.
- ROGERO, S.O.; BRAGA, F.J.C.; HIGA, O.Z. Cytotoxicity test for bioceramics of calcium phosphate. **Mater Sci. Forum**, v.299-300, n.1, p.44-47, São Paulo, 1999.
- RUPPRECHT, S. et al. Hydroxyapatite cement (BoneSource™) for repair of critical sized calvarian defects—an experimental study. **J Craniomaxillofac Surg**, v.31, p.149–53, 2003.
- SAINT-JEAN, S.J. et al Study of the reactivity and *in vitro* bioactivity of Sr-substituted α -TCP cements. **J Mat Sci: Mat Med**, v.16, p.993– 1001, 2005.
- SALEM, Rachele . **Análise de compósitos de hidroxiapatita e alginate como potencial para aplicação futura como biomateriais ortopédicos**. 2006. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- SÁNDOR, George Kálmán Béla. **The minimization of morbidity in cranio-maxillofacial osseous reconstruction. Bone graft harvesting and coral-derived granules as a bone graft substitute**. 2003.100 p. Dissertation (Mester in Medicine). Institute of Dentistry; Department of Oral and Maxillofacial Surgery, University of Oulu, Oulu (Finland), 2003.
- SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The criticaí size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clin Orthop and Relat Res**, v.225, p.299-308, 1986.
- SCHWARZ, F. et al. Two-year clinical results following treatment of peri-implantitis lesions using a nanocrystalline hydroxyapatite or a natural bone mineral in combination with a collagen membrane. **J Clin Periodontol**, v.35, n.1, p.80-7, Jan. 2008.
- SENA, Lúcia Ágata de. **Produção e caracterização de Compósitos Hidroxiapatita-Colágeno para Aplicações Biomédicas**. 2004.95 f. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) –COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.
- SHIMMING, R.; SCHELZEISEN, R. Tissue- engineered bone for maxillary sinus augmentation. **J Oral Maxillofac Surg**, v.62, n.6, p.724-729, Jun. 2004.
- SILA-ASNA, M. et al. Osteoblast Differentiation and Bone Formation Expression in Strontium-inducing Bone Mesenchymal Stem Cell. Kobe **J Med Sci**, v.53, n.1, p.25-35, 2007.
- SILVA, R.V. et al. The use of hydroxyapatite and autogenous cancellous bone grafts to repair bone defects in rats. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.34, n.2, p.178-84, Mar. 2005.
- SOLTAN, M.; SMILER, D.; CHOI, J.H. Bone Marrow: Orchestrated Cells, Cytokines, and Growth Factors for Bone Regeneration. **Implant Dent**, v.18, p.132–141, 2009.

TAKAGI, K.; URIST, M. R. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. **Ann Surg**, v.196, p.100-109, 1982.

TENG, S. et al. The effect of alginate addition on the structure and morphology of hydroxyapatite/gelatin nanocomposites. **Compos Sci Tech**, v.66, p.1532-1538, 2006.

TERRA, J. et al. The structure of strontium-doped hydroxyapatite: an experimental and theoretical study. **Phys Chem Chem Phys**, v.11, p.574, 2009.

THORWARTH, M. et al. Bone Regeneration in Osseous Defects Using a Resorbable Nanoparticulate Hydroxyapatite. **J Oral Maxillofac Surg**, v.63, p.1626-1633, 2005.

TIAN, M. et al. In vivo study of porous strontium-doped calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute applications. **J Mater Sci: Mater Med**, v.20, n.7, p.1505-12, Jul. 2009.

TORRES, Marjorie González. **Preparación y caracterización de cementos de hidroxiapatita con alginato**. 76f Trabajo de Diploma, Universidad de La Habana Facultad de Química, Centro de Biomateriales, Habana, 2004.

TORRONI, A. Engineered Bone Grafts and Bone Flaps for Maxillofacial Defects: State of the Art. **J Oral Maxillofac Surg**, v.67, p.1121-7, 2009.

TURHANI, D. et al. Exogenous Recombinant Human BMP-2 Has Little Initial Effects on Human Osteoblastic Cells Cultured on Collagen Type I Coated/Noncoated Hydroxyapatite Ceramic Granules. **J Oral Maxillofac Surg**, v.65, p.485-93, 2007.

UENG, S.W. et al. Development of a biodegradable alginate carrier system for antibiotics and bone cells. **J Orthop Res**, v.25, n.1, p.62-72, Jan. 2007.

URIST, M.R., DeLANGE, R.J., FINERMAN, G.A. Bone cell differentiation and growth factors. **Science**, v.220, p.680-6, 1983.

URIST, M.R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, v.150, p.893-899, 1965.

VERBERCKMOES, S.C.; De BROE, M.E.; D'HAESE, P.C. Dose-dependent effects of strontium on osteoblast function and mineralization. **Kidney Int**, v.64, n.2, p.534-543, Aug. 2003.

VERBERCKMOES, S.C. et al. Effects of Strontium on the Physicochemical Characteristics of Hydroxyapatite. **Calcif Tissue Int**, v.75, p.405-415, 2004.

VOLKMER, T.M.; SANTOS, L.A. Influência no tempo de indução nas propriedades de hidroxiapatita porosa obtida por gelcasting de espumas. **Cerâmica**, v.53, p.429-435, 2007.

WANG, X.; YE, J. Variation of crystal structure of hydroxyapatite in calcium phosphate cement by the substitution of strontium ions. **J Mater Sci: Mater Med**, v.19, p.1183-1186, 2008.

WONG, C.T. et al. Ultrastructural study of mineralization of a strontium-containing hydroxyapatite (Sr-HA) cement in vivo. **J Biomed Mater Res A.**, v.70A, n.3, p.428-435, 1 Sep. 2004.

WONG, K.L. et al. Mechanical properties and in vitro response of strontium-containing hydroxyapatite/polyetheretherketone composites. **Biomaterials**, v. 30, n.23-24, p.3810-3817, Aug. 2009.

WU, C. et al. The effect of strontium incorporation into CaSiO₃ ceramics on their physical and biological properties. **Biomaterials**, v.28, p. 3171–3181, 2007.

WU, T.J. et al. Studies on the microspheres comprised of reconstituted collagen and hydroxyapatite. **Biomaterials**, v.25, n.4, p.651-658, Feb. 2004.

XUE, W. et al. Osteoprecursor cell response to strontium-containing hydroxyapatite ceramics. **J Biomed Mater Res A**, v.79, n.4, p.804-814, 15 Dec. 2006.

YANG, D.; JONES, K.S. Effect of alginate on innate immune activation of macrophages. **J Biomed Mater Res A**, v.90, n.2, p.411-418, Aug. 2009.

YONEDA, M. et al. Repair of an intercalated long bone defect with a synthetic biodegradable bone-inducing implant. **Biomaterials**, v. 26, p.5145–5152, 2005.

ZABEU, J. L. A.; MERCADANTE, M. T. Substitutos ósseos comparados ao enxerto ósseo autólogo em cirurgia ortopédica: revisão sistemática da literatura: [revisão]. **Rev Bras Ortop**, v.43, n.3, p.59-68, mar. 2008.

ⁱ As referências foram normatizadas segundo a Norma ABNT, NBR 6023.

Anexo



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

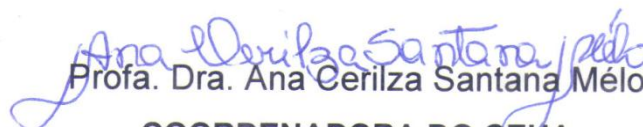
Feira de Santana, 24 de setembro de 2008.

PARECER

Após análise do projeto de pesquisa, referente ao protocolo nº 016/2008, intitulado "**Avaliação de Microesferas de Hidroxiapatita, Dopadas ou não com Estrôncio, no Reparo de Defeito Ósseo Crítico, em Calvária de Rato**", de autoria da Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa, observa-se que, de modo geral, a mesma atendeu satisfatoriamente aos questionamentos provenientes deste comitê.

Diante do exposto sou de **PARECER FAVORAVEL** à execução do projeto.

Atenciosamente,


Profa. Dra. Ana Cerilza Santana Mélo

COORDENADORA DO CEUA

PORT. 497/2008

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

ROLIM, Ana Emília Holanda. ***Avaliação de Microesferas de Hidroxiapatita, Dopadas ou não com Estrôncio, no Reparo de Defeito Ósseo Crítico, em Calvária de Rato.*** 91f.: il. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador 2010.

Autorizo a reprodução parcial ou total deste trabalho para fins de comutação bibliográfica.

Salvador, 26 de fevereiro de 2010.

Ana Emília Holanda Rolim

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](#)