

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

RONALDO OLIVEIRA LOMELINO

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE GRÂNULOS DE BTCP/HA E DO SEU
POTENCIAL COMO CARREADOR DE CÉLULAS OSTEOPROGENITORAS HUMANAS**

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ MAURO GRANJEIRO

**Universidade Federal Fluminense
Niterói
2010**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

RONALDO OLIVEIRA LOMELINO

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE GRÂNULOS DE β TCP/HA E DO SEU
POTENCIAL COMO CARREADOR DE CÉLULAS
OSTEOPROGENITORAS HUMANAS**

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

Orientador: José Mauro Granjeiro
Co-orientador: Vinicius Schott Gameiro

Niterói
2010

RONALDO OLIVEIRA LOMELINO

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE GRÂNULOS DE β TCP/HA E DO SEU
POTENCIAL COMO CARREADOR DE CÉLULAS
OSTEOPROGENITORAS HUMANAS**

Orientador: José Mauro Granjeiro

Co-orientador: Vinícius Schott Gameiro

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

Aprovado em 23 de novembro de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. William Fernando Zambuzzi

Universidade Federal Fluminense - Examinador prévio e Titular

Prof. Dr. Alexandre Malta Rossi

Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas - Titular

Prof. Dr. Simão Pedro Fernandes Pereira

Faculdade de Minas - Titular

Prof. Dr. José Guilherme Guimarães

Universidade Federal Fluminense - Suplente

Prof. Dr. Gutemberg Gomes Alves

Universidade Federal Fluminense - Suplente

Niterói
2010

Ao Victor e à Bia, que fazem tudo valer a pena
À minha mãe, sempre ao meu lado
À Isabella, amor de minha vida inteira
Ao meu Pai, meu grande exemplo e minha maior saudade

“Bom mesmo é ir a luta
com determinação,
abraçar a vida com paixão,
perder com classe e
vencer com ousadia,
pois o triunfo pertence
a quem se atreve...
A vida é muita para ser
insignificante.”

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Aos colegas do Hospital Universitário Antônio Pedro que compreenderam minha ausência parcial nestes dois anos.

Ao colega e amigo Vinicius Schott Gameiro (prof de ortopedia da UFF), pela preciosa ajuda na idealização de grande parte deste projeto.

Ao professor José Mauro Granjeiro, pela orientação, pelo *design* experimental e pelo pioneirismo nesta instituição, integrando os conhecimentos básicos e clínicos num novo campo de atuação que é a bioengenharia tecidual.

Ao professor Alexandre Rossi, responsável pelo Laboratório de Biocerâmicas (Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, RJ), pela síntese e caracterização físico-química do material cerâmico testado neste estudo.

Aos técnicos do Núcleo de Terapia Celular (Universidade Federal Fluminense, RJ), a bióloga e pós doutoranda Adriana Linhares, envolvida na caracterização biológica *in vitro* deste projeto.

Aos professores e médicos veterinários Maria Lúcia e Carlos Campos, responsáveis pelo Núcleo de Animais de Laboratório (Universidade Federal Fluminense, RJ), pela disponibilização dos recursos físicos para cirurgias e caracterização biológica *in vivo* deste projeto.

Aos colegas de pós-graduação, pelo companheirismo em sala de aula.

Aos professores do curso de pós graduação em Ciências Médicas da UFF, pela dedicação, profissionalismo e atenção que dedicam aos alunos.

E por fim, um agradecimento especial ao Igor Iuco Castro-Silva, mestre em patologia (UFF) pela ajuda em todas as fases deste trabalho, desde as cirurgias com animais, análises histológicas/estatísticas e sugestões no texto final. Muito obrigado amigo!

RESUMO

O objetivo deste estudo foi caracterizar biologicamente uma cerâmica bifásica (β TCP:HA, 70:30). A citocompatibilidade foi testada com células osteoprogenitoras humanas (COPH), após 24 horas de exposição ao extrato do material (norma ISO 10993-5), através de análises morfológica e bioquímica (crystal violeta). A adesão de hOST à cerâmica foi avaliada após incubação por 14 dias. A biocompatibilidade em tecido subcutâneo e o reparo de defeito ósseo (Θ 5mm) em calvária de ratos (n=20), do material sem células (controle) e com células (COPH) foram avaliados concomitantemente em 15 e 45 dias após os enxertos, através de análises histológica e histomorfométrica. O material apresentou alta citocompatibilidade, com preservação da morfologia celular e uma densidade celular estimada similar ao controle negativo. À microscopia eletrônica de varredura, houve presença de COPH aderidas e espalhadas na superfície da cerâmica e indicativa migração para dentro dos seus poros. À microscopia de luz, o tecido subcutâneo exibiu maior celularidade no grupo com COPH do que a cerâmica pura, em ambas houve ausência de leucócitos polimorfonucleares ou necrose e presença moderada de linfócitos, macrófagos e células gigantes multinucleadas circundantes (15 dias), seguindo-se à maturação de tecido conjuntivo e revascularização compatível com o processo normal de reparo (45 dias). Os achados histopatológicos da área central de defeitos cranianos após 15 dias mostraram alta celularidade no grupo com COPH junto à cerâmica do que matriz de tecido conjuntivo em contato com o material sem células, em ambos houve suave presença de linfócitos, macrófagos e novos vasos sanguíneos circundando as partículas do enxerto e após 45 dias, no grupo com COPH a cerâmica foi circundada por tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos, poucas células gigantes multinucleadas e moderado novo osso (6,64%), confirmando o processo de biomineralização similar ao osso autógeno (6,59%), que foi maior do que no grupo sem células (3,84%) e significativamente diferente do coágulo sanguíneo (2,23%, $p < 0,05$), este último com osteogênese apenas nas bordas do defeito tal quais os demais grupos. Pode-se concluir que o material testado apresenta cito e biocompatibilidade, osteocondutividade e funciona como carreador de células para promoção de maior reparo ósseo *in vivo*.

Palavras-chave: β TCP:HA, Enxerto aloplástico, Terapia de perdas ósseas

ABSTRACT

The aim of this study was the biological characterization of a biphasic ceramic (β TCP: HA, 70:30). The cytocompatibility was tested with human osteoprogenitor cells (HOPC), after 24 hours of exposure to material extract (ISO 10993-5), using morphological and biochemical analysis (crystal violet). The HOPC adhesion to ceramic was evaluated after incubation for 14 days. The biocompatibility in subcutaneous tissue and repair of bone defects (Θ 5mm) in rat calvaria (n = 20), of the material without cells (control) and cells (HOPC), was evaluated concurrently on 15 and 45 days after the grafts using histology and histomorphometry. The material showed high cytocompatibility, with preservation of cell morphology and cell density similar to the estimated negative control. In scanning electron microscopy, was present and adhered and sprawling HOPC on the surface of ceramic and indicative migration into the pores. At light microscopy, the subcutaneous tissue showed increased cellularity in the group with HOPC than the pure ceramic, in both there was no polymorphonuclear leukocytes or necrosis and moderate presence of lymphocytes, macrophages and multinucleated giant cells surrounding (15 days), followed maturation of tissue revascularization and compatible with the normal process of repair (45 days). The histopathologic findings of central skull defects after 15 days showed higher cellularity with HOPC together the ceramics than connective matrix in contact with the material without cells, in both there was mild presence of lymphocytes, macrophages and new blood vessels surrounding particles of the graft and after 45 days in the group with HOPC the ceramic was surrounded by loose connective tissue, blood vessels, few multinucleated giant cells and moderate new bone (6.64%), confirming the biomineralization process similar to the autograft (6.59%), which was higher than the group without cells (3.84%) and significantly different from the blood clot (2.23%, $p < 0.05$), the latter with osteogenesis only at the edges of the defect such as the other groups. It can be concluded that the material tested is citocompatible, biocompatibile, osteoconductive and works as a carrier of cells to promote greater bone repair in vivo.

Key-words: β TCP:HA, aloplastic graft, Bone loss therapy

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1. CÉLULAS	14
1.2. BIOMATERIAIS	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. FISIOLÓGIA ÓSSEA	17
2.2. REPARO DE PERDAS ÓSSEAS	24
2.2 USO DE CÉLULAS	26
2.3 USO DE BIOMATERIAIS	29
2.4 USO DE BIOENGENHARIA TECIDUAL	37
3 OBJETIVOS	44
4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 ESTUDO <i>IN VITRO</i>	48
4.2 ESTUDO <i>IN VIVO</i>	50
5 RESULTADOS	56
5.1 ESTUDO <i>IN VITRO</i>	56
5.2 ESTUDO <i>IN VIVO</i>	57
6 DISCUSSÃO	122
7 CONCLUSÃO	136
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137
9 ANEXOS	163

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Protocolo sugestivo de experimentação <i>in vivo</i>	37
TABELA 2: Dados histomorfométricos de calvária de ratos.....	117

LISTAS DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1: Sítio de implantação na calvária de ratos	53
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Estatísticas mundiais do mercado consumidor de biomateriais	30
GRÁFICO 2: Análise estrutural de amostras do material aloplástico βTCP:HA	63
GRÁFICO 3: Teste <i>in vitro</i> de citotoxicidade	73
GRÁFICO 4: Histomorfometria de calvária de ratos – Parte 1.....	119
GRÁFICO 5: Histomorfometria de calvária de ratos – Parte 2	121

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estágios celulares no processo de diferenciação óssea	21
FIGURA 2: Uso ortopédico de biomateriais osteosubstitutos	38
FIGURA 3: Representação de uma técnica para bioengenharia tecidual	42
FIGURA 4: Análise topográfica por eletromicrografia de varredura de amostras do material aloplástico β TCP:HA	62
FIGURA 5: Obtenção das células humanas para experimentos – Parte 1	65
FIGURA 6: Obtenção das células humanas para experimentos – Parte 2	67
FIGURA 7: Obtenção das células humanas para experimentos – Parte 3	69
FIGURA 8: Teste <i>in vitro</i> de citotoxicidade	71
FIGURA 9: Teste <i>in vitro</i> de adesão celular	75
FIGURA 10: Testes <i>in vivo</i> em ratos	77
FIGURA 11: Testes <i>in vivo</i> em tecido subcutâneo de ratos	79
FIGURA 12: Testes <i>in vivo</i> em calvária de ratos – Parte 1	81
FIGURA 13: Testes <i>in vivo</i> em calvária de ratos – Parte 2	83
FIGURA 14: Histomorfometria de calvária de ratos – Parte 1	85
FIGURA 15: Histomorfometria de calvária de ratos – Parte 2	87
FIGURA 16: Tecido subcutâneo de ratos, 15 dias – Parte 1	89
FIGURA 17: Tecido subcutâneo de ratos, 15 dias – Parte 2	91
FIGURA 18: Tecido subcutâneo de ratos, 45 dias – Parte 1	93
FIGURA 19: Tecido subcutâneo de ratos, 45 dias – Parte 2	95
FIGURA 20: Calvária de ratos. Coágulo sanguíneo – Parte 1	97

FIGURA 21: Calvária de ratos. Coágulo sanguíneo – Parte 299
FIGURA 22: Calvária de ratos. Osso Autógeno – Parte 1	101
FIGURA 23: Calvária de ratos. Osso Autógeno – Parte 2	103
FIGURA 24: Calvária de ratos. βTCP:HA – Parte 1	105
FIGURA 25: Calvária de ratos. βTCP:HA – Parte 2	107
FIGURA 26: Calvária de ratos. βTCP:HA + células humanas – Parte 1	109
FIGURA 27: Calvária de ratos. βTCP:HA + células humanas – Parte 2	111
FIGURA 28: Calvária de ratos. βTCP:HA + células humanas – Parte 3	113
FIGURA 29: Calvária de ratos. βTCP:HA + células humanas – Parte 4	115

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde há mais de 150 doenças e síndromes relacionadas a problemas musculares e esqueléticos (BIOMET, 2004). Apesar do grande avanço no desenvolvimento de biomateriais osteosubstitutos, não se obteve, ainda, o biomaterial ideal capaz de mimetizar as propriedades e características de células viáveis especializadas em produzir seus respectivos tecidos. Neste sentido, a Bioengenharia de Tecidos surge como uma abordagem capaz de aliar células, substratos adequados (carreadores ou *scaffolds*) e fatores de crescimento para a criação de tecidos em laboratório, autógenos e passíveis de serem aplicados como agentes terapêuticos (NEREM, 1992; LANGER e VACANTI, 1993; CHEN et al., 2007; HOFMANN et al., 2008). As estratégias da engenharia de tecidos envolvem o uso de células isoladas para substituir funções específicas, substâncias que induzem a proliferação de células e tecidos (fatores de crescimento como as proteínas ósseas morfogenéticas), ambas combinadas a matrizes que atuam como suportes (carreadores) para células ou proteínas (UEDA et al., 2000; GRANJEIRO et al., 2005; TIAN et al., 2008).

1.1. CÉLULAS

Os significativos avanços nas técnicas de biologia celular e molecular têm permitido a obtenção de células bem diferenciadas, pouco (células osteoprogenitoras) ou não-diferenciadas (células-tronco) de uma larga variedade de sítios anatomicos para a recriação dos mais distintos tecidos do organismo, para o tratamento das mais diversas patologias (HUTMATCHER e SITTINGER, 2003; BARRY e MURPHY, 2004).

A mais estudada tem sido a medula óssea, porém existem outras fontes teciduais para obtenção de células com potencial osteogênico, tais como: osso trabecular (NOTH et al., 2002; SOTTILE et al., 2002; TULI et al., 2003; BELOTI et al., 2008; CHAMBERLAIN et al., 2007), periósteo (FUKUMOTO et al., 2003; NAKAHARA et al., 1990; ZARNETT et al., 1989; O'DRISCOLL et al., 2001), tecido adiposo (DE UGARTE et al., 2003; DRAGOO et al., 2003; GRONTHOS et al., 2001; WICKHAM et al., 2003) e polpa de dentes decíduos (MIURA et al., 2003).

1.2. BIOMATERIAIS:

O melhor material com capacidade de promover osteogênese em um defeito ósseo continua sendo considerado o osso autógeno, por apresentar células do próprio hospedeiro, propiciando formato e suporte adequados ao novo tecido ósseo em formação e fatores de crescimento. A desvantagem do seu uso é a disponibilidade limitada e possíveis complicações per e pós-operatórias relacionadas ao procedimento de coleta (BOO et al., 2002).

Formas alternativas ao enxerto autógeno têm sido exaustivamente pesquisadas para o desenvolvimento de novos materiais osteossubstitutos, como:

colágeno (BER et al., 2005), hidroxiapatita (KASTEN et al., 2005; MORISHITA et al., 2006; TURHANI et al., 2005), beta tricálcio fosfato (ARNOLD et al., 2002; ARINZEH et al., 2005), ácido polilático (CHEN et al., 2007), dentre outros, isoladamente ou em associação. A busca por um material com boas propriedades físico-químicas, biologicamente aceitável e possível de ser comercializado é o grande objetivo das pesquisas sobre o tema.

Biocerâmicas têm surgido como boas alternativas para reabilitações ortopédicas e craniomaxilofaciais (LE GEROS et al., 2003). O desenvolvimento de materiais cerâmicos híbridos baseados em fosfatos de cálcio (BCP), combinando as favoráveis taxas de reabsorção do beta tricálcio fosfato (β TCP) e as propriedades osteocondutora/osteointutora da hidroxiapatita (HA), representa uma promissora ferramenta para bioengenharia óssea (GOSAIN et al., 2004; ARINZEH et al., 2005). Além disso, estes materiais podem servir como carreadores de células formadoras de osso, objetivando acelerar e aumentar o ganho ósseo em novos procedimentos regenerativos (ARINZEH et al., 2005). Entretanto, neste mercado predominam materiais que não permitem a regeneração do tecido ósseo. Tem se buscado pela Bioengenharia a conjugação de células e biomateriais objetivando a reconstrução completa do tecido lesado, embora limites técnicos tenham, ainda, que ser superados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. FISILOGIA ÓSSEA:

Segundo NEFUSSI et al. (2003), modelos *in vitro* de osteogênese permitem estudo da cinética da diferenciação osteoblástica. De acordo com a cinética celular baseada em auto-radiografia e estudos microcinematográficos, quatro sucessivas etapas morfológicas de formação do nódulo ósseo podem ser distinguíveis: (a) proliferação celular com formação de camadas multicelulares; (b) mudanças fenotípicas na superfície celular com diferenciação celular; (c) atividade celular com formação e maturação de matriz e processos de inclusão celular; (d) mineralização de matriz óssea medular com formação de superfície óssea ativa e osteócitos maduros.

Os osteoblastos são as células responsáveis pela síntese e secreção de matriz orgânica do osso, cujo componente mais abundante é o colágeno I. Estas células também são responsáveis pela formação das vesículas da matriz e estão associadas à enzima fosfatase alcalina, imprescindível na mineralização óssea (KATCHBURIAN e ARANA, 1999). Os osteoblastos se organizam em monocamada aderente sob as superfícies do osso (periósteo e endósteo) e apresentam um formato cuboidal, com núcleos normalmente arredondados (MACKIE, 2003).

Ultraestruturalmente, os osteoblastos maduros e metabolicamente ativos apresentam um fenótipo com inúmeras cisternas de retículo endoplasmático rugoso,

complexo de Golgi bem desenvolvido associado a uma grande quantidade de vesículas de secreção, lisossomas e mitocôndrias. A zona subjacente à membrana plasmática é rica em filamentos de actina que também estão presentes nos prolongamentos citoplasmáticos característicos destas células. Estes filamentos projetam-se para a matriz, e chegam a se prender aos prolongamentos dos osteoblastos vizinhos através de junções comunicantes (*gap*). Estas junções aderentes conectam os corpos celulares de osteoblastos maduros (WIESMANN et al., 2003).

Em cultura, os osteoblastos podem ser muito semelhantes aos fibroblastos exceto pelo fato de que estes não são capazes de produzir uma matriz extracelular mineralizada (DUCY et al., 2000).

Geneticamente podemos considerar os osteoblastos como fibroblastos especializados, já que quase todos os genes expressos nos osteoblastos são também expressos em fibroblastos. Somente dois fatores são transcritos especificamente em osteoblastos: *Cbfa1* (*core binding factor alfa one* - fator de transcrição indutor de osteoblastos), expressos em níveis de 10 a 100 vezes mais altos em osteoblastos do que em qualquer outro tipo celular, e osteocalcina (marcador específico de osteoblastos maduros). O *Cbfa1* possui um papel crítico na diferenciação de linhagens osteogênicas. Durante o desenvolvimento embrionário, a expressão de *Cbfa1* precede a diferenciação dos osteoblastos e é restrita às células mesenquimais destinadas a serem condrócitos ou osteoblastos (DUCY et al., 2000).

KOBAYASHI et al. (2000) mostrou que ratos deficientes no gene *Cbfa1* em células mesenquimais não adquiriram fenótipo osteoblástico, mas numerosos focos de adipócitos apareceram no lugar. Mesmo em cultura com BMP-2, estas células falharam em gerar nódulos ósseos, mas se diferenciaram em condrócitos. Estes

resultados indicam que deficiência de Cbfa1 leva à perda da habilidade de diferenciar em osteoblastos maduros. Cbfa1, também chamado Pebp2αA (*polyoma enhancer-binding protein*) é um fator de transcrição pertencente à família do gene de domínio *runt*, que se liga a uma seqüência de consenso (TGT/CGGT) e ativa uma variedade de genes, incluindo colágeno tipo I, osteopontina, sialoproteína óssea, osteocalcina, que participam da osteogênese. Células de calvária têm sido usadas para estudar diferenciação osteoblástica visto que a calota craniana possui células mesenquimais heterogêneas que incluem osteoprogenitores em vários estágios de diferenciação e é formada principalmente através de processo de ossificação intramembranosa.

A formação óssea implica direta ou indiretamente em crescimento ósseo longitudinal, mineralização óssea e remodelação óssea, todas as funções que não são facilmente estudadas *in vitro*. Dessa forma, a compreensão do controle molecular da função de osteoblastos tem sido significativamente baseada em tecnologia de deleção de genes (DUCY et al, 2000).

A deposição da matriz extracelular é uma importante etapa na formação de todos os tecidos rígidos e órgãos. Os osteoblastos não só são responsáveis pela deposição da matriz óssea, como também regulam a diferenciação dos osteoclastos e a sua atividade no processo de reabsorção óssea, o que remete a essas células um papel importante, mesmo que por vias indiretas, na regulação de homeostasia do cálcio (DUCY et al., 2000; MACKIE, 2003). *In vivo*, a deposição da matriz é um processo altamente direcionado que requer que os osteoblastos façam a distinção entre a membrana ligada por contato (junções) e a membrana livre, com o objetivo de direcionar o fluxo de vesículas para uma determinada região. Por serem células polarizadas, os osteoblastos secretam as proteínas que vão constituir a matriz

(osteóide), de forma perpendicular à base da célula, longe dos capilares e em direção à superfície óssea já existente. Sendo assim, a direção do crescimento do osso é sempre perpendicular à base dos osteoblastos (PRELE et al., 2003).

Os osteoprogenitores dos osteoblastos derivam das células mesenquimais pluripotentes, que por sua vez dão origem a progenitores de outras linhagens de células como fibroblastos, mioblastos, adipócitos e condrócitos (KARTOSOGIANNIS e NG, 2004; ALBREKTSSON et al., 2001).

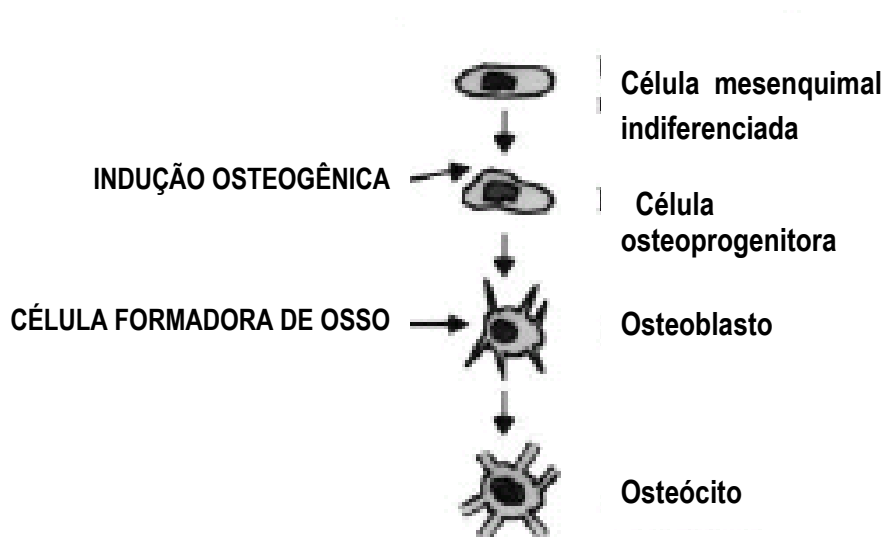


FIGURA 1: Estágios celulares no processo de diferenciação óssea (adaptado de ALBREKTSSON et al., 2001).

O desenvolvimento ósseo pode ocorrer através de dois processos: ossificação intramembranosa e ossificação endocondral.

A ossificação intramembranosa é responsável pela formação dos ossos da calota craniana como o frontal, o parietal, parte do occipital e as partes escamosas e timpânicas do osso temporal. Através deste processo se originam também, a maxila, a mandíbula e a clavícula. A ossificação intramembranosa também contribui para o

aumento em espessura dos ossos longos e para o crescimento dos ossos curtos (KATCHBURIAN e ARANA, 1999).

O início da ossificação intramembranosa ocorre com a ativação das células mesenquimais que proliferam e se agrupam na presença de uma abundante rede de capilares. Em seguida estas células se diferenciam em osteoblastos que passam a sintetizar e secretar as moléculas constituintes da matriz orgânica (osteóide), que é posteriormente mineralizada. A deposição dos componentes da matriz orgânica e a sua subsequente mineralização acarretam o aprisionamento dos osteoblastos dentro desta matriz calcificada e, nesta condição, se diferenciam em osteócitos (MACKIE, 2003). O entrelaçamento de vários centros de ossificação intramembranosa resulta na formação das trabéculas ou traves ósseas e entre elas, amplas cavidades abrigam numerosos vasos sanguíneos. Dessa forma, origina-se o osso primário, que com o aparecimento dos osteoclastos é gradualmente substituído pelo osso maduro ou lamelar (KATCHBURIAN e ARANA, 1999).

O processo de ossificação endocondral é responsável pela formação dos ossos longos das extremidades, bem como das vértebras e costelas. Neste tipo de ossificação as células mesenquimais proliferam, condensam e se diferenciam em condroblastos. A partir daí, um esboço cartilaginoso é inicialmente formado, na região e na forma do futuro osso. Na superfície da região mediana do modelo cartilaginoso, células mesenquimais adjacentes ao pericôndrio se diferenciam em osteoblastos. Estes passam a sintetizar e secretar matriz orgânica óssea que em seguida é mineralizada, formando externamente ao pericôndrio do modelo cartilaginoso um anel ósseo, que restringe a passagem de nutrientes para os condrócitos na parte mais interna da cartilagem. A seguir, os condrócitos sofrem alterações e começam a hipertrofiar (MACKIE, 2003). Durante esse processo os

condrócitos produzem vesículas da matriz que promovem a sua mineralização, com subsequente morte das células por apoptose, restando apenas as cavidades entre os tabiques da matriz cartilaginosa calcificada. A persistência da matriz mineralizada mesmo após a morte e desaparecimento dos condrócitos, serve de suporte para a deposição do osso subcondral. As cavidades deixadas pelos condrócitos entre os tabiques de matriz cartilaginosa calcificada são invadidas por capilares e células indiferenciadas vindas do mesênquima adjacente. Estas células se diferenciam em osteoblastos, que passam a sintetizar e secretar a matriz orgânica óssea sobre os tabiques de cartilagem calcificada, que servem apenas de ponto de apoio para a ossificação. Essa matriz é posteriormente mineralizada, dando origem ao tecido ósseo onde, anteriormente, havia tecido cartilaginoso (MARKES e HERMEY, 1996). Segundo AKITA et al. (2004), a presença de citocinas pode influenciar o grau de indução osteogênica *in vitro* de células tronco mesenquimais e o padrão de reparo ósseo *in vivo* em modelo de defeito crítico craniano. Através da aplicação de bFGF (2,5 ng/mL) e BMP-2 (50 ng/mL) além do meio suplementado osteogênico, observou-se em cultura expressão de fosfatase alcalina e osteocalcina, e em defeito craniano tratado com esponja colágena acrescida de 10µg de BMP-2 e bFGF, que produziu osteócitos maduros circundados por osteoblastos e osteoclastos, expressando fosfatase alcalina e osteocalcina, com maior imunoreatividade observada nos espaços intersticiais do carreador colágeno, acelerando o padrão de reparo ósseo.

O mecanismo pelo qual o osso é formado a partir de células previamente não diferenciadas, seja na recuperação de uma fratura, na recuperação do tecido em torno de um implante ou na remodelação, é semelhante. A formação de osso depende da migração de uma população de células potencialmente osteogênicas, e

da diferenciação desta população em células secretórias maduras. Tanto na remodelação endosteal como na cortical, isto envolve a migração através de uma matriz de tecido conjuntivo primitivo, células perivasculares, endosteais, ou células da camada interna do periósteo para a superfície da região reabsorvida. Da mesma forma, na fratura e recuperação peri-implante, a população potencialmente osteogênica vai migrar através do coágulo assumindo a retenção do mesmo, e vai atingir a superfície dos fragmentos de osso ou implante, dentro do local da lesão. Em cada um destes casos, as células que atingem a superfície sólida do tecido ósseo velho ou do implante, vão iniciar a síntese de matriz nessas superfícies. As células que se diferenciam antes de atingir a superfície do alvo vão secretar matriz. Como consequência, elas irão parar de migrar e, portanto, não atingirão a superfície do alvo. Dessa forma, a osteocondução vai resultar em uma espícula óssea avançando na direção da superfície do alvo. Por outro lado, os osteoblastos diferenciados, ativos na secreção, irão se afastar da superfície em consequência da diferenciação precoce, ou ficar presos como osteócitos na matriz que eles produziram (DAVIES e HOSSEINI, 2000).

A literatura mostra que a microarquitetura dos ossos lamelares e esponjosos difere, mas a histodinâmica que está por trás da sua formação é muito similar. É a taxa de síntese da matriz recém-formada que produz as diferenças significativas na aparência do osso lamelar e esponjoso. O osso lamelar é o resultado de secreção lenta e sincronizada, enquanto o osso esponjoso é o resultado de secreção rápida e não sincronizada. Aparentemente a estrutura e a composição do osso formado *in vitro* mimetizam o osso esponjoso. Isto é particularmente significativo para aqueles interessados em estratégias de engenharia de tecidos baseadas em estágio de formação de matriz de tecido ósseo *in vitro*. Mesmo nas estratégias de engenharia

de tecidos, nas quais as células-tronco ou osteoprogenitoras são semeadas sobre ou dentro de um arcabouço que é implantado imediatamente, a primeira matriz de osso formada dentro do arcabouço será de osso esponjoso, o qual será substituído durante remodelação de longo termo. De fato, na remodelação óssea, seja do osso esponjoso ou lamelar, um novo osso se forma sobre a superfície sólida resultante da absorção óssea. Este novo osso tem características particulares e a sua formação é denominada *de novo*, resultante da atividade de células osteogênicas em recente estado de diferenciação (DAVIES e HOSSEINI, 2000).

2.2. REPARO DE PERDAS ÓSSEAS SEVERAS:

Um dos dilemas em cirurgias reconstrutivas nas áreas de Ortopedia e Craniomaxilofacial é a escolha sobre a forma de tratar extensas injúrias ósseas secundárias a trauma, cirurgia, infecção e outras causas. O tecido ósseo possui alta capacidade de regeneração espontânea, porém este potencial é limitado pelo tamanho do defeito. Nos últimos anos, vários procedimentos cirúrgicos usando substitutos ósseos biológicos ou sintéticos têm sido desenvolvidos para o tratamento destes defeitos no intuito de promover sua cicatrização com novo tecido ósseo, que possua características morfológicas e funcionais similares ao tecido original (MARINS et al., 2004; OKLUND, 1986).

Segundo SCHMITZ & HOLLINGER (1986), a quantidade de reparo que ocorre no defeito ósseo é dependente do tamanho da ferida. Um defeito crítico pode ser definido como o menor tamanho de ferida intra-óssea em um osso particular ou espécie animal que não cicatrizará espontaneamente durante o tempo de vida do

animal. A patogênese dos defeitos ósseos de tamanho crítico envolvem 2 mecanismos: a) formação de uma barreira fibroblástica pelo periósteo ou segundo DAHLIN et al. (1991), prolápso de tecido mole dentro do defeito com fusão de dura e pericrânio, devido a rápida migração de fibroblastos, prevenindo a união das margens ósseas, ou b) incapacidade do hematoma, no momento de injúria, em se organizar e preencher o defeito, levando à ausência de outros elementos osteogênicos e fazendo reparo incompleto.

A qualidade do reparo ósseo, sob condições experimentais ótimas (defeitos estáveis e não-infectados), pode ser influenciada marcadamente por cinco variáveis: (1) espécies animais, (2) idade do animal, (3) localização anatômica do defeito experimental, (4) tamanho do defeito e (5) periósteo intacto. Defeitos ósseos críticos podem ser considerados um protótipo modelo para defeitos de descontinuidade e não-uniões ósseas. (SCHMITZ & HOLLINGER, 1986)

Em 1963, URIST e McLEAN estabeleceram que a razão da osteogênese ou formação de novo osso deve ser superior a razão de invasão de tecido fibroso durante reparo de lesões endocondrais. Aparentemente, este princípio se aplica também ao osso intramembranoso. OKLUND (1986) mostra que o recrutamento de células mesenquimais perivascularares do estroma da medula óssea e o endósteo podem direcionar de forma eficiente o crescimento ósseo das bordas para completa regeneração óssea no animal adulto.

TAGAKI e URIST (1982) mostraram que defeitos de 8mm de diâmetro criados em calvária de ratos Sprague-Dawley velhos não repararam espontaneamente em 12 semanas, sendo observada uma formação óssea inferior a 50% do defeito, por técnicas radiográfica e histopatológica. Essa formação óssea diminuta ocorreu principalmente nas margens do defeito de calvária, mas se observou também na

camada mais profunda da dura-máter em forma de ilhas de novo osso. Ratos em desmame formam um modelo animal não-satisfatório para avaliar materiais de reparo ósseo devido a sua grande capacidade de reparar espontaneamente defeitos grandes.

2.3. USO DE CÉLULAS NA TERAPIA DE PERDAS ÓSSEAS:

A manipulação de células humanas tem despertado grande atenção por conta de seu potencial uso em aplicações de engenharia tecidual. Um material ideal para enxertia óssea do ponto de vista biológico e biomecânico é aquele que consegue ser completamente repostado por novo osso formado pelo hospedeiro (BOO et al, 2002).

O trabalho de REDLICH et al. (1999) discute que células bem diferenciadas são difíceis de expandir em cultura e que muitas vezes perdem o potencial para diferenciação. Em contraste, células-tronco mesenquimais proliferam facilmente, mas direcionar estas células para a diferenciação osteogênica é ainda um grande desafio.

Muitos modelos de culturas de células ósseas apresentam limitações, pois contam com uma inerente instabilidade e possibilidade de comportamentos aberrantes associados às diversas linhagens celulares. No caso das culturas primárias de osteoblastos, os modelos apresentam uma mistura de células osteoblásticas em diferentes estágios de diferenciação além de possivelmente células de outras linhagens. Embora as culturas tenham limitações, quando plaqueadas apropriadamente, desenvolvem-se culminando na formação de nódulos de mineralização (KARTSOGIANNIS e NG, 2004).

A diferenciação osteogênica pode ser detectada a partir do aumento da expressão gênica de certos marcadores mais comumente utilizados. Fosfatase alcalina é considerada um marcador inicial da osteogênese *in vitro*, pois durante a diferenciação osteogênica, os osteoblastos exibem forte atividade do marcador (CHANG et al., 2006), detectável por imunomarcação (AKITA et al., 2004), reação em cadeia da polimerase (PCR) (TULI et al., 2003) ou atividade enzimática via espectrofotometria (pico de expressão em 10-14 dias pós-osteoindução em cultura celular) (KOTOBUKI et al., 2004; YOSHIMURA et al., 2006). Nódulos de mineralização são normalmente evidenciados pela técnica de Von Kossa, método qualitativo baseado na substituição de íons Ca^{2+} da matriz calcificada por átomos de prata, revelando os minerais de cálcio como pontos negros (ZHENG et al., 2006). Depósito de cálcio, método quantitativo, mensura a deposição mineral por colorimetria (SOTTILE et al., 2002). Dentre as proteínas e genes que podem ser utilizados para a detecção, pode-se citar o colágeno I, que é a proteína mais abundante no osso conhecida por exercer um importante papel na produção de matriz e que pode ser detectado por dosagem (ARNOLD et al., 2002), imunomarcação (LU et al., 2005) ou PCR (TURHANI et al., 2005). A osteocalcina é um importante marcador para diferenciação terminal do osteoblasto, podendo ser detectada por imunomarcação (IKEDA et al., 2006) ou PCR (CLAUSEN et al., 2006). A osteopontina é um marcador ósseo não específico que é expresso bimodalmente, presente tanto no início (fase proliferativa) quanto no fim (após começo da mineralização) da osteogênese (MEINEL et al., 2006; KIM et al., 2004), podendo ser detectada por imunomarcação (JAGER et al., 2005) ou PCR (BENSAID et al., 2003). A osteonectina é considerada um potencial regulador da mineralização em tecidos calcificados, devido a sua afinidade a ácido hialurônico (ZHENG et al., 2006),

hidroxiapatita e colágeno I, detectável através de imunomarcação (JAGER et al., 2007) ou PCR (CLAUSEN et al., 2006; TURHANI et al., 2005). Cbfa 1 (ou Runx2) é reportado como gene-mestre da diferenciação osteoblástica, sendo seus transcritos detectados por PCR (TURHANI et al., 2005; KIM et al., 2004). A sialoproteína óssea (BSP) é um marcador ósseo tardio, produzido por osteoblastos diferenciados formando osso, podendo se ligar a colágeno, hidroxiapatita em formação e tem sido isolado em células ativamente mineralizando uma matriz de colágeno I (MEINEL et al., 2006; TULI et al., 2003). O fator de crescimento transformante beta (TGF- β) é um potente fator de crescimento osteogênico que estimula a síntese de proteínas da matriz e tem grande efeito sobre as células responsáveis pela regeneração óssea, atuando na quimiotaxia, proliferação e diferenciação de osteoblastos (KANNO et al., 2005), aumentando e acelerando a regeneração óssea (KITOH et al., 2004), detectado por PCR (KANNO et al., 2005). A osteoprotegerina é uma proteína envolvida no metabolismo celular ósseo, sendo detectável por PCR (KULTERER et al., 2007). Osterix é um fator de transcrição essencial que regula a diferenciação e formação óssea detectável por PCR (KADOWAKI et al., 2004); camundongos deficientes geneticamente apresentam bloqueio da maturação de osteoblastos, perdendo a capacidade de formar osso. BMP2, em altas concentrações, funciona como uma proteína osteoindutiva conhecida por estimular a diferenciação de células-tronco mesenquimais durante a linhagem osteogênica (MEINEL et al., 2006). O aumento da expressão de receptor de hormônio paratireoidiano (PTH) acompanha a osteogênese (SOTTILE et al., 2002). A calceína é usada na detecção de células sofrendo osteodiferenciação através da marcação de depósitos de cálcio intracelulares (LAINO et al., 2006).

2.4. USO DE BIOMATERIAIS NA TERAPIA DE PERDAS ÓSSEAS:

As sociedades atuais apresentam um aumento progressivo da idade média populacional, levando a uma enorme demanda de equipamentos e materiais médico-hospitalares. Segundo dados da Organização das Nações Unidas (ONU, 2008), a população mundial excedeu 6 bilhões em 1999 e alcançará 9 bilhões em 2050, sendo que a média de idade para todos os países vai subir de 29 para 38 anos em 2050. No momento, apenas menos de 11% da população mundial de 6,9 bilhões de pessoas está acima dos 60 anos. Entretanto, em 2050 a parcela aumentará para 22% (de uma população de 9 bilhões), chegando nos países desenvolvidos a 33%. (ONU, 2008; BAXTER, 1999)

Adicionalmente, ocorre um crescente número de estados mórbidos (lesões traumáticas, doenças crônicas e degenerativas) que exige da rede hospitalar um organizado e caro processo de atendimento. Entre outras ações, é importante o desenvolvimento de intervenções médicas, processos cirúrgicos e materiais de maior tecnologia que possibilitem uma rápida recuperação do paciente e retorno à sua vida produtiva. (BIOMET, 2004)

Assim como nos países desenvolvidos, tem crescido rapidamente o mercado de produtos destinados ao cuidado com saúde nos países em desenvolvimento, incluindo materiais médicos implantáveis (BAXTER, 1999). Estima-se que em 2004 o mercado mundial de produtos utilizados no tratamento de doenças músculo-esqueléticas, em especial as ósseo-articulares, tenha alcançado 20 bilhões de

dólares, com um crescimento anual de cerca de 14% somente nos Estados Unidos (BIOMET, 2004). Na América Latina, o mercado de materiais ortopédicos é estimado em 200 milhões de dólares anuais, e é liderado pelo Brasil, com 70 milhões de dólares anuais (MRG, 2004). O desenvolvimento de um biomaterial nacional, com produção em larga escala, custo acessível e propriedades biológicas benéficas ao reparo ósseo, em quantidade e qualidade, é o foco das recentes pesquisas de osteosubstitutos (SILVA et al., 2009, GONÇALVES et al., 2009).

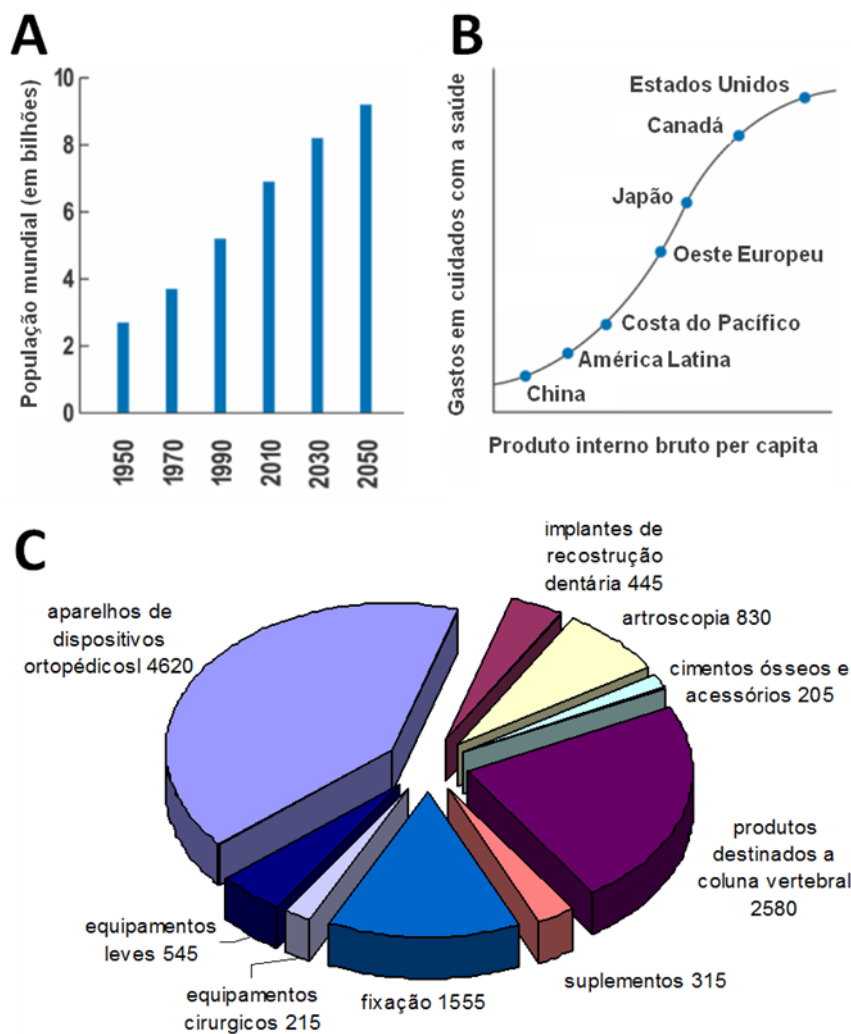


GRÁFICO 1: Estatísticas mundiais do mercado consumidor de biomateriais. A - Perspectiva populacional humana; B - Economia interna X Gastos com saúde

(adaptado de BAXTER, 1999) e C - Perfil do mercado de produtos músculo-esqueléticos (adaptado de BIOMET, 2004).

Na área da bioengenharia tecidual, os materiais biomiméticos destacam-se por terem características semelhantes às da própria matriz extracelular na qual serão aplicados e podem acelerar o reparo da lesão a partir do tecido original adjacente do próprio paciente, não necessitando serem substituídos após alguns anos. Dessa forma, estes materiais sustentáveis para intervenções de reparo ou reestruturações ósseas se assemelham a um “osso artificial” (VALLET-REGÍ, 1997).

Materiais de enxerto pertencem a uma das quatro categorias básicas, que inclui os autógenos, alógenos, xenógenos ou aloplásticos. Autógenos são materiais retirados do hospedeiro e são o único tipo de material de enxerto que possui propriedades osteogênica, osteoindutiva e osteocondutiva, sendo então considerados o “padrão ouro” para regeneração de estruturas ósseas (MAH et al., 2004). Como ratifica OKLUND (1986), o osso trabecular fresco autógeno é superior a todos os tipos de osso autógeno processado ou osso alógeno fresco ou processado. Seja como for, seu uso é limitado pela necessidade de um segundo sítio cirúrgico para coletar o osso com possíveis complicações per e pós-operatórias relacionadas ao procedimento de coleta (infecção, deformidades, dor e perda de sangue) e quantidade limitada de enxerto. (BOO et al., 2002).

Os materiais alógenos são retirados de outro indivíduo da mesma espécie com diferentes genótipos, como cadáveres, parentes ou bancos ósseos. Para a preparação como enxerto, são, muitas vezes, simplesmente congelados a seco, irradiados ou desmineralizados. O congelamento dos ossos doados diminui a antigenicidade do enxerto, enquanto a irradiação diminui a chance de infecção e a

desmineralização remove o conteúdo mineral, deixando somente o colágeno e morfógenos, aumentando o potencial osteoindutivo. As vantagens de alógenos sobre autógenos são a eliminação da necessidade de sítio doador durante cirurgia e a rápida disponibilidade. Entretanto, as desvantagens incluem rejeição, infecção e maiores períodos de reparo, o que resulta em menos volume ósseo que o autógeno. (MAH et al., 2004)

Os materiais xenógenos, onde indivíduos doador e receptor são de espécies diferentes (geralmente, enxertos bovinos ou suínos utilizados em seres humanos), tem sido uma boa alternativa para suprir a pouca disponibilidade de material humano autógeno ou alógeno, por serem biomiméticos. A matriz óssea desmineralizada é uma matriz leve, biodegradável, puramente protéica, consistindo se principalmente em colágeno I e uma mistura natural de fatores de crescimento (KASTEN et al., 2005). Após adequado processamento, além de minimizar risco de ocorrência de encefalopatia espongiiforme ou doença priônica, são obtidas mais propriedades favoráveis para seu uso clínico, como citocompatibilidade e biocompatibilidade (CASTRO-SILVA et al., 2009).

Os materiais aloplásticos são osteosubstitutos sintéticos facilmente disponíveis e que dispensam a necessidade de sítio doador do paciente. Idealmente, devem ser biocompatíveis com tecidos hospedeiros, não-antigênicos, não-carcinogênicos e não-inflamatórios. Adicionalmente, eles devem ser suficientemente porosos e interconectivos para permitir crescimento dentro e em torno do implante (osteocondução), devem ser capazes de estimular osteoindução, serem bioabsorvíveis para permitir reposição por osso, radiopacos para permitirem boa visualização e distinção radiográfica, aptos a resistir à esterilização sem perder qualidades favoráveis, estáveis em várias temperaturas e sob umidade, baratos e

facilmente obtidos. A maioria dos materiais aloplásticos é osteocondutora e as principais limitações são a reabsorção lenta, formando muitas vezes, uma cápsula de tecido conjuntivo que pode afetar estabilidade do enxerto (KREBSBACH et al., 1998). Materiais aloplásticos podem ainda apresentar várias desvantagens como rejeição, infecção, perda e toxicidade (OKLUND, 1986; MAH et al., 2004).

Atualmente, para aplicações em tecido ósseo, os biomateriais aloplásticos metálicos utilizados apresentam propriedades mecânicas semelhantes às naturais e auxiliam na sustentação do organismo. Os Implantes de liga de titânio, embora apresentem ótimas propriedades mecânicas e compatibilidade com osso, demonstram osteogênese demorada e em menor quantidade, quando comparadas ao fosfato de cálcio, material de excelente osteocondutividade (HARTMAN et al., 2005). Porém, estes materiais não são biodegradados com o tempo, necessitando sua posterior remoção e substituição de acordo com a vida útil do material. (LE GEROS, 2003)

Materiais poliméricos têm boa biocompatibilidade, mas pelo seu alto grau de deformação, exibem o pior desempenho mecânico. O colágeno é um biomaterial que apresenta boas propriedades de degradação e de viabilidade celular (adesão, crescimento e diferenciação), em análise topográfica e química (BER et al., 2005). O poliácido-L-lático é atrativo como um polímero reabsorvível, pois seu produto de degradação, ácido glicólico, é um metabólito natural, que além de promover boa aderência celular em meio osteogênico (JÄGER et al, 2005; HOSSEINKHANI et al., 2006) e formação de tecido mineralizado (CHEN et al., 2007; HOSSEINKHANI et al., 2006); em associado à trombina, forma osso trabecular mineralizado com presença de osteócitos (SCHMELZEISEN et al., 2003). Células mesenquimais mantêm sua viabilidade em hidrogel de polietilenoglicol, além da heparina conjugada relacionar-

se à adesão e diferenciação dos osteoblastos (BENOIT et al., 2007). Poli- ϵ -caprolactone promove adesão e proliferação de células osteoblastóides, sendo favorável a associação com fosfato de cálcio no intuito de aumentar o potencial osteocondutivo (SCHANTZ et al., 2005). Poligalactina 910, com sua estrutura porosa, permite o crescimento do tecido ósseo e polidioxanone funciona como barreira tecidual (JÄGER et al., 2005). Hidrogéis termo-reversíveis, como poli(N-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico) utilizado como carreador, permitem evidente expressão dos marcadores osteogênicos, tendo resultados ainda mais favoráveis quando associados a HA e BMP-2 (NA et al., 2007).

Materiais cerâmicos, como os fosfatos de cálcio, apresentam características interessantes quanto à biocompatibilidade e reabsorção natural, mas perdem significativamente resistência mecânica com o passar do tempo. Portanto, encontrar um biomaterial ideal ainda requer muitas pesquisas nesta área. (LE GEROS, 2003) A hidroxiapatita, seja natural ou sintética, pode ser considerada um controle positivo para formação óssea ectópica via osteocondução *in vivo* (KASTEN et al., 2005; MORISHITA et al., 2006; TURHANI et al., 2005); a sua associação com β TCP mostra indução de células mesenquimais e conseqüente formação óssea, distribuída através de sua estrutura porosa, numa sugerida proporção ótima de 20:80 (ARINZEH et al., 2005). Beta-tricálcio fosfato apresenta boa biocompatibilidade, biodegradabilidade e extrema osteocondutividade; quando associado ao ácido polilático, mostra formação de tecido pré-ósseo (ARNOLD et al., 2002). Cerâmica de alumina tem excelente biocompatibilidade e resistência mecânica, permite proliferação de células osteoblastóides sobre sua superfície (KITAMURA et al., 2004), entretanto, é um material bioinerte, não apresentando osseointegração. As biocerâmicas, como alumina, zircônia e fosfatos de cálcio, já foram aplicadas em

diversos sítios como dentes, ossos do ouvido e em reparos de doenças periodontais, respectivamente, não causando rejeição ou danos ao sistema músculo-esquelético (LE GEROS, 1991).

A produção e utilização de fosfatos de cálcio na Medicina Regenerativa data do início do século XX. Muitos autores desenvolveram produtos com diferentes características, variando sua composição, forma, propriedades físico-químicas e estrutura. (LE GEROS, 2003). Cerâmicas a base de fosfatos de cálcio apresentam expressiva contribuição aos implantes para regeneração óssea. A hidroxiapatita é uma cerâmica bioativa comumente utilizada no organismo humano sob formas particuladas em vários sítios de reparo ósseo, no revestimento de próteses metálicas para o melhoramento de suas propriedades biológicas, e ainda como substrato para liberação controlada de drogas. Hidroxiapatita é, termodinamicamente, o mais estável dos fosfatos de cálcio em relação às mudanças de pH, temperatura e composição do fluido biológico. (LE GEROS, 2003)

A estrutura cristalina da hidroxiapatita foi determinada por NÀRAY-SZABÓ & MEHMEL em 1930. Seu cristal possui estrutura hexagonal com as dimensões da célula unitária $a = b = 9,423$ e $c = 6,875$. O átomo de cálcio forma triângulos normais ao eixo c que giram mutuamente 60° ao longo deste e é rodeado por seis átomos de oxigênio ligados a grupos PO_4 e grupos OH^- . A partir das concentrações adequadas, ocorre o produto iônico entre íons cálcio e fosfato que posteriormente sofre um processo de transição e interconversão, gerando vários arranjos cristalinos alternativos de graus variáveis de complexidade. Uma vez iniciada a formação dos cristais de hidroxiapatita, eles tenderão a crescer e a catalisar a posterior cristalização de fosfatos de cálcio, mesmo nos locais que as concentrações de íons cálcio e fosfato sejam semelhantes às do nível plasmático (COMARCK, 1991).

A hidroxiapatita sintética apresenta a habilidade de ligar-se diretamente ao tecido ósseo adjacente do sítio implantado, sem a formação de cápsula fibrosa (ROUAHI et al., 2006). Além disso, substitutos ósseos baseados nesse mineral são biocompatíveis e osteocondutivos (TACHIBANA et al., 2005). Para uso clínico, alguns desses cerâmicos além de biocompatibilidade e osteocondução apresentam também alta biodegradabilidade (UEMURA et al., 2003).

Complicações no desenvolvimento de biocerâmicas reabsorvíveis são (1) manutenção da resistência e estabilidade da interface durante o período de degradação e substituição por tecido natural novo e (2) a razão de substituição para a razão de reparo dos tecidos do corpo (degradação muito rápida ou muito lenta).

SCHIMITZ & HOLLINGER (1986) sugerem um protocolo *in vivo* para testagem de novos materiais de reparo ósseo, seguindo uma hierarquia de modelos animais antes de testes de fase I em humanos serem realizados, conforme demonstrado na TABELA 1.

Etapas	Vantagens
I. Começar testando em defeitos de calvária de ratos	(1) Animais não são caros e podem ser usados em grande número (2) Somente poucas quantidades do agente experimental são requeridas para teste individual (3) Agentes particulados/gelatinosos são bem aceitos para implantes neste tipo de defeito
II. Continuar testando em defeitos de calvária de coelhos	Este tipo de defeito permite um implante sólido para ser avaliado em termos de sua habilidade em ser adaptado dentro do defeito
III. Finalizar o teste em defeitos de descontinuidade em mandíbulas de cães mongrel adultos ou primatas não humanos, ou calvária de primatas não-humanos	(1) Permite a avaliação do material de reparo ósseo em uma área funcional (mandíbula) (2) Permite uma comparação da razão de reparo do material de reparo ósseo X osso medular particulado (3) Permite a avaliação do material de reparo ósseo no sítio onde será eventualmente usado em humanos (vantajoso para futura aprovação do material pelo FDA)

TABELA 1: Protocolo sugestivo de experimentação *in vivo*.

2.5. USO DA BIOENGENHARIA TECIDUAL NA TERAPIA DE PERDAS ÓSSEAS:

Na última década tem se observado o desenvolvimento de uma área que une conhecimentos de diferentes disciplinas de ponta para a pesquisa de produtos e técnicas que visam a melhoria necessária aos pacientes que necessitam de cirurgia ortopédica . A bioengenharia tecidual é uma área multidisciplinar que pode ser classificada como Medicina Regenerativa, pois substitui tecidos e órgãos danificados por substitutos funcionais e estruturalmente equivalentes. Agregando o termo

“biomimética”. Esses materiais planejados apresentam sua formação, constituição e/ou função semelhante aos encontrados nos tecidos vivos. Dentre inúmeras características, a bioengenharia tecidual faz uso de arcabouços (ou “scaffolds”) tridimensionais biocompatíveis, células autógenas e moléculas sinalizadoras que, unidos, são implantados no paciente. Esse “complexo” fornece elementos que irão favorecer a integração e substituição gradativa do material, diferenciação de células progenitoras do tecido adjacente e, conseqüentemente, a retomada da saúde do indivíduo. (HARDOUIN et al., 2000).

Existe uma grande variedade de biomateriais associados à terapia celular usados na bioengenharia óssea. Para orientar à melhor escolha, considera-se que um carreador ideal deva apresentar as seguintes características: a) adaptabilidade à área do defeito; b) osteocondutividade, marcada por boa capacidade de adesão, proliferação e maturação das CTMA; c) capacidade de servir como barreira aos tecidos vizinhos; d) tempo de reabsorção compatível com o tempo requerido para formação óssea, porém não tão longo que interfira na substituição do material pelo osso (DONZELLI et al., 2007); e) biocompatibilidade, não-imunogenicidade e atoxicidade; f) radioluscência, preferível para permitir que o novo osso seja distinguível radiograficamente do implante; g) facilidade na manufatura e esterilização; h) fácil manuseio durante ato cirúrgico, evitando procedimentos pré-operatórios que aumentam o risco de infecção; i) adequada microarquitetura, com interconexões e porosidades (200-900 μ m) que permitam tanto a penetração de células osteocompetentes quanto de células endoteliais, necessárias à vascularização do novo tecido em formação (LOGEART-AVRAMOGLU et al., 2005).

No interior destes substitutos teciduais, células pluripotentes teciduais são estimuladas bioquimicamente a proliferarem, diferenciarem e a criarem uma nova matriz extracelular, resultando na substituição progressiva do material implantado.

Apesar do rápido avanço dessa área, os produtos utilizados nos pacientes ainda apresentam um custo muito elevado. Uma das explicações para esse alto valor agregado é o fato da bioengenharia tecidual ser usada individualmente, com tratamento específico para aquele contexto particular. Em especial, pela etapa inicial que consta de captação, expansão e cultivo das células do próprio paciente sobre o arcabouço, que representa um alto custo apesar de fundamental ao sucesso do implante, pois diminui significativamente o risco de rejeição pelo organismo. (BARBANTI & ZAVAGLIA, 2005)

Estudos *in vitro* indicam que as respostas celulares, quando em contato com os biomateriais artificiais, são fundamentais para se conhecer a dinâmica da interação entre o implante e o tecido vivo participante (VERNON et al., 2005).

Estudos *in vivo*, utilizando diferentes animais experimentais (camundongos [TASSO et al., 2010], ratos [SAKATA et al., 2006], coelhos [JIANG et al., 2010], cães [YOSHIMI et al., 2009], cabras [MAREI et al., 2009] e primatas [XIE et al., 2007]) mostram qualitativamente uma boa biocompatibilidade tecidual e quantitativamente uma osteogênese aumentada no sítio de implantação, com efeito direto em defeitos ósseos críticos induzidos ou mesmo ectopicamente. A enxertia de células alógenas ou xenógenas em tecido subcutâneo demonstrou processo de mineralização dentro de pouco tempo (em média, 4 semanas) [TORIGOE et al, 2009; VAN DINTHER et al., 2010], sendo consideradas um material bioativo para osso e não gerador de resposta inflamatória intensa (reação de corpo estranho exacerbada e/ou focos de necrose). Defeitos ósseos críticos induzidos em diferentes sítios anatômicos servem

como bom modelo para estudar a possibilidade de osteogênese em leitos receptores desfavoráveis ou muito extensos. (SCHMITZ & HOLLINGER, 1986) A terapia celular pré-clínica mostra-se então favorável para oferecer melhor grau de osteogênese de 4 a 12 semanas (XIE et al., 2007) pós-enxerto (superando mais de 100% o controle negativo [SAKATA et al., 2006]) e ainda mostra-se até três vezes mais rápida frente ao material sem células (XIE et al., 2007), sendo refletido o resultado positivo em tratamentos de defeitos cranianos (SAKATA et al., 2006) e mandibulares [YOSHIMI et al., 2009] em interesse às cirurgias ósseas para seres humanos, enquanto resultados promissores em defeitos femorais (KANCZLER et al., 2010), radiais (XIE et al., 2007) e ulnares (ZHOU et al., 2010) abrem possibilidade de aplicabilidade clínica em cirurgia ortopédica. (FIGURA 2)



FIGURA 2: Tratamento de lesões ortopédicas via uso de biomateriais osteosubstitutos. Caso 1. A - Tomografia computadorizada evidenciando área tumoral metafisária. B - Radiografia após exérese da lesão e preenchimento com enxerto ósseo, com 1 ano de follow up. Caso 2. C - Radiografia mostrando integração prótese-biomaterial-osso, com 1 ano de *follow-up*.

A terapia celular vem crescentemente evoluindo no campo das pesquisas clínicas, voltada para o tratamento de perdas ósseas advindas de traumas e/ou patologias pré-existentes.

Trabalhos em pacientes com osteogênese imperfeita, patologia caracterizada por deficiência no gene para Colágeno I, tem obtido resultados promissores, utilizando células mesenquimais autógenas modificadas que traduzem a proteína em deficiência, dessa forma otimizando a reposição óssea do indivíduo, traduzida por incremento na massa óssea corporal, redução da taxa de ocorrência de fraturas e atividade osteoblástica acelerada (HORWITZ et al., 1999). No tratamento da hipofosfatasia infantil, após implante de células mesenquimais houve aumento da radiopacidade femoral, diminuindo a aparência radiográfica similar ao raquitismo (CAHILL et al., 2004). Em defeitos cranianos extensos, houve clara redução dimensional em poucos meses após o enxerto celular em infantes (VELARDI et al., 2006). Para o procedimento oral de levantamento de seio maxilar, houve formação de osso esponjoso ou trabecular em 4 meses pós-cirurgia, possibilitando reabilitação protética satisfatória através de ancoragem de implantes osseointegráveis de titânio na mesma região (SCHMELZEISEN et al., 2003). Fenda alveolar congênita teve alta taxa de fechamento maxilar (80% de osso regenerado em 9 meses) após uso de células mesenquimais (HIBI et al., 2006). Distração óssea, procedimento indicado para alongamento ósseo em casos de pseudartrose, discrepância de membros e acondroplasia, foi realizada de forma gradual e concomitantemente usando enxerto de células mesenquimais, o que demonstrou formação de calo ósseo na tíbia e no fêmur tratados (KITOH et al., 2004). De forma semelhante, tumores ósseos (cisto ósseo aneurismático, granuloma de células gigantes e displasia fibrosa) tratados com curetagem e enxerto com células mesenquimais, conseguiram bom padrão de

reparo ou ossificação em 4 semanas pós-cirurgia de tíbia ou fêmur, e em um ano, sua completa regeneração (MORISHITA et al., 2006).

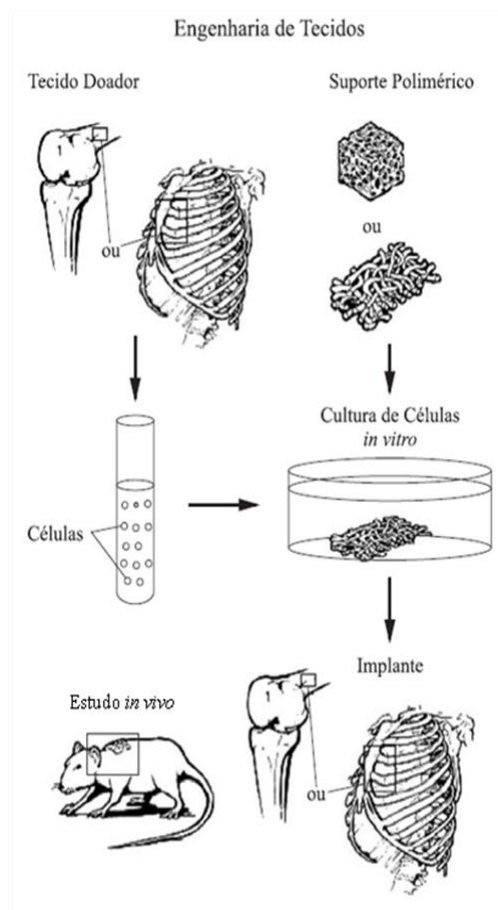


FIGURA 3: Representação de uma técnica para bioengenharia tecidual (adaptado de BARBANTI & ZAVAGLIA, 2005).

Buscou-se neste estudo desenvolver um substituto ósseo biocompatível, com organização estrutural que favorecesse a atividade osteocondutora e ainda, que pudesse ser usado de forma isolada ou associado a células osteocompetentes.

Foi produzida uma cerâmica a base de tricálcio fosfato (TCP) e hidroxiapatita (HA) devido a alguns fatores, como: fácil obtenção e manipulação, porosidade, resistência à compressão similar ao osso esponjoso e capacidade de ser reabsorvido pelo organismo (HAK et al., 2007).

O TCP pode assumir duas formas estruturais: o α TCP, que forma cristais poligonais, e o β TCP, que forma cristais esféricos com porosidade mais alta. O β TCP, por sua microestrutura (ERBE et al., 2001), se mostra mais osteocondutor e solúvel/absorvível pelo organismo do que o α TCP (WILTFANG et al., 2002; GAASBEEK et al., 2009). Neste trabalho, optou-se pelo β TCP por conta destas propriedades favoráveis. Os β TCPs podem ser produzidos por processos convencionais com altas temperaturas ou por processos químicos. Estes processos tendem a alterar a porosidade do material, melhorando assim suas propriedades osteocondutoras e alterando o tempo de reabsorção do material. O fato do β TCP ser bioabsorvível também lhe confere vantagens sobre outros biomateriais que não possuem esta característica, como a hidroxiapatita, material mais encontrado no mercado. Os β TCPs são reabsorvidos em média entre 6 e 18 meses via osteoclastos, sem persistência de reação inflamatória e resposta exuberante de células gigantes (MOORE et al., 1987). A hidroxiapatita (HA), por sua vez, além de osteocondução pode promover osteoindução, sendo um controle positivo (HABIBOVIC et al., 2008; KASTEN et al., 2005; MORISHITA et al., 2006; TURHANI et al., 2005). A associação sinérgica entre β TCP e HA numa razão favorável de 70:30, poderia aumentar a formação óssea, tal qual em estudos com proporção similar (80:20) (ARINZEH et al., 2005) ou ligeiramente diferentes (BERTRAM et al., 2005; CHAMBERLAIN et al., 2004; KOK et al., 2003; LECHNER et al., 2006; OTAKI et al., 2007; ROSADA et al., 2003). Neste contexto, a conjugação de células osteoprogenitoras a essa cerâmica bifásica poderia representar, hipoteticamente, o aumento da resposta biológica reparadora, levando assim a maior formação óssea.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo é avaliar biologicamente o biomaterial aloplástico a base de β TCP e HA no formato de grânulos e seu potencial como carreador de células derivadas de osso trabecular humano no tratamento de defeitos extensos em crânio de ratos.

Como objetivos específicos, pretende-se:

- 1- Avaliar *in vitro* qualitativa e quantitativamente a citocompatibilidade da cerâmica bifásica β TCP:HA;
- 2- Avaliar *in vivo* semi-quantitativamente a biocompatibilidade da cerâmica bifásica β TCP:HA, isoladamente ou com células osteoprogenitoras humanas, enxertada em tecido subcutâneo de ratos;
- 3- Avaliar *in vivo* qualitativa e quantitativamente o reparo tecidual promovido pela cerâmica bifásica β TCP:HA, isoladamente ou com células osteoprogenitoras humanas, enxertada em crânio de ratos;

4. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada segundo as normas de boa conduta científica recomendadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana do Hospital Universitário Antônio Pedro / Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense (Registro CEP-UFF 232/08) para os estudos *in vitro* (**ANEXO I**) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal Fluminense (Registros CEPA-UFF 94/09 e 149/09) para os estudos *in vivo* (**ANEXOS II e III**).

4.1. MATERIAL

O material testado é de origem sintética e formulação bifásica composta por β -TCP (70%) e HA (30%) hiperporótico, com porosidade de 75%, calcinado a 1150°C na forma de grânulos (450-750 μ m de diâmetro), foi idealizado na UFF e sintetizado no Laboratório de Biocerâmicas do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF). Foi usada a composição de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ (HA) e $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ a 2% (β -TCP), formando uma substância pastosa, levada em fôrma para estufa a 80°C por 10 horas, e depois para forno a 1150°C por 8 horas com intuito de aumentar a sua resistência (processo de sinterização).

Este material foi esterilizado em calor úmido (autoclave, 20 minutos, 121°C, 2ATM), previamente a todos os testes biológicos.

4.2. METODOLOGIA:

4.2.1. Caracterização físico-química

Amostras de β TCP/HA foram avaliadas usando Microscopia Eletrônica de Varredura (Jeol JSM 5800LV, Suécia), Difração de Raios-X-(Zeiss HZG4, Alemanha) e Espectroscopia por infravermelho transformada de Fourier (Paragon1000 Perkin-Elmer, Estados Unidos) para caracterização de sua topografia, fases cristalográficas / cristalinidade e análise estrutural de fases inorgânicas, respectivamente.

4.2.2. Caracterização biológica

4.2.2.1. Coleta das amostras de tecido ósseo e expansão celular

Após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram coletadas amostras de osso trabecular de pacientes voluntários saudáveis, que seriam descartadas após procedimento cirúrgico de artroplastia no Hospital Universitário Antonio Pedro (HUAP). Somente pacientes que apresentaram prova sorológica negativa de imunodeficiência (HIV), hepatite ou doença venérea (VDRL) foram inseridos neste estudo. A equipe de coleta das biópsias ósseas foi composta pelo médico ortopedista Prof. Dr. Vinicius Schott Gameiro, pela técnica em cultivo celular Dra. Adriana Linhares e pelas técnicas de enfermagem do Centro Cirúrgico da referida instituição. **(FIGURA 5)**

A expansão celular foi realizada no Núcleo de Terapia Celular – Unidade de Pesquisa Clínica – HUAP/UFF. As amostras de osso trabecular foram lavadas em

solução salina tampão fosfato (PBS) e posteriormente tratadas com solução de colagenase 0,2% (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) permanecendo em digestão enzimática pelo período de 2 horas e acondicionadas em frascos plásticos de cultura de tecidos (Corning, Estados Unidos) com meio de Eagle modificado por Dubelco (DMEM; Cultilab, Brazil) com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil), incubadas em frascos de cultura a 37° C, pressão de CO₂=5% e 95% de atmosfera úmida, com trocas de meio a cada 2 dias (**FIGURA 6**). Após 7 dias, as primeiras células humanas começaram a migrar dos explantes ósseos para o plástico e em 30 dias, foi possível observar a cultura primária de células fibroblastóides dispostas em uma monocamada confluenta (**FIGURA 7**). O presente material biológico humano foi usado para ambos os teste *in vitro* e *in vivo*.

Para a quantificação celular foi utilizada a câmara de Neubauer, como preconizado por FRESHNEY (2000), fazendo-se a exclusão de células mortas ou não viáveis coradas com azul de Trypan 0,4% (Sigma-Aldrich, São Paulo, BR). Uma alíquota de 20µL da suspensão celular em 1mL foi misturada em igual volume ao azul de trypan, homogeneizada e transferida para a câmara. As células foram contadas excluindo-se aquelas que se apresentaram coradas em azul. Para o cálculo do número de células no frasco, foi utilizada a seguinte equação: $NC \times D \times 10^4 / Q$, onde NC= número de células viáveis contadas, D= diluição da amostra, Q= quadrantes da Câmara de Neubauer utilizados na contagem.

4.2.2.2. Teste *in vitro* de citotoxicidade:

A citotoxicidade dos materiais foi determinada utilizando o protocolo definido na ISO 10993-5, sendo as amostras β TCP:HA preparadas como descrito na ISO 10993-12 e previamente esterilizadas por calor úmido/autoclave (temperatura=121°C, pressão=1ATM, tempo de ciclo=20 minutos). Células: osteoprogênitoras humanas passagem 2, semeados em placa de cultura de 96 poços em quintuplicata, na densidade de $1,0 \times 10^4$ células/mL, mantidos em DMEM suplementado com 1,2 g/L NaHCO₃, 0,025 g/L ampicilina, 0,1 g/L estreptomicina e 10% soro fetal bovino e incubados a 37°C em atmosfera úmida (95% de ar e 5% de CO₂) por 24 horas. Extrato: obtido na proporção de 0,1g de material/mL de α -MEM e incubado a 37°C em atmosfera úmida (95% de ar e 5% de CO₂) por 24 horas; como controles, foram usados: pó de titânio grau II (Micron Metals, Estados Unidos), negativo, e fenol 0.2% (VETEC, Brasil), positivo. Após o período de incubação, os extratos acrescidos de 10% de soro fetal bovino foram incubados junto às células durante adicionais 24 horas, momento em que as amostras foram submetidas à análise bioquímica.

O efeito dos tratamentos foi observado pela mensuração da coloração por cristal violeta (Cristal Violet Dye Elution/CVDE test, KXRCV 96300 - Xenometrix kit, Alemanha), que possui afinidade aos núcleos celulares. As absorbâncias dos diferentes materiais ($\lambda=540\text{nm}$) foram detectadas em espectrofotômetro PowerWave MS2 (BioTek Instruments, Estados Unidos), sendo diretamente proporcionais ao número real de células, baseando-se na lei de Lambert-Beer. Os resultados foram expressos em porcentagem, onde: $VC = \text{AbsCcE} / \text{AbsCsE}$. VC = viabilidade celular, AbsCcE = absorbância das células com extrato, AbsCsE = absorbância das células

sem extrato, já descontados os brancos (corantes). A análise estatística (GraphPad Software, USA) utilizou teste paramétrico de ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, considerando diferenças significativas se $p < 0,05$. **(FIGURA 8) e (GRAFICO 3)**

4.2.2.3. Teste *in vitro* de adesão:

Para observar os eventos celulares de adesão e migração, um total de $2,0 \times 10^4$ células/mL foram semeadas sobre três discos plásticos thermanox (Thermo Scientific, Estados Unidos). Após 24 horas e já estabelecida uma monocamada de osteoblastos humanos, foi depositado sobre cada disco plástico cerca de 50 mg de grânulos de β TCP:HA, sendo este conjunto incubado em DMEM mais 10% SFB pelo período de 14 dias.

As amostras do conjunto biocerâmica-células foram fixadas em solução de Karnovsky em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 por 1 hora, lavadas com o tampão, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 por 1 hora, banhadas em soluções crescentes de etanol (1 banho de 30%, 50%, 70% e 90% e 3 banhos de 100%) por 10 minutos cada sempre em temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$), desidratadas em aparelho de ponto crítico (Bal-tec[®]-CPD.030, Alemanha), metalizadas em ouro (Balzers Union FL9496, Alemanha) e analisadas morfológicamente em Microscópio Eletrônico de Varredura (Jeol JSM 5800LV, Suécia). **(FIGURA 9)**

4.2.2.4. Teste *in vivo* em tecido subcutâneo de ratos

O objetivo de se utilizar a metodologia do enxerto em subcutâneo a fim de avaliar a biocompatibilidade, é que esta técnica permite avaliar a segurança sistêmica de novos biomateriais, constatando: o grau de toxicidade, possíveis malformações de estrutura, degeneração do tecido. Além disso, permite identificar as fibras imaturas as quais penetram entre enxertos de materiais granulares, sinais de inflamação e grau de encapsulamento do enxerto. Desta forma é capaz de concluir o grau de toxicidade do material utilizado como enxerto (NUSS et al., 2008). Outros estudos consideram como parâmetros, que avaliam compatibilidade no emprego desta técnica o aumento do calibre dos vasos, neovascularização e indução de angiogênese (PEATTIE et al., 2006), além de mínima resposta inflamatória com o passar do tempo (STITZEL et al., 2003). A fim de se avaliar a biocompatibilidade *in vivo* da biocerâmica, foi analisada a resposta inflamatória ao biomaterial enxertado, além de identificar as células e estruturas presentes.

Ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, n=10) machos adultos com 2 meses de idade e 300 g tiveram anestesia geral intraperitoneal próxima do músculo reto femoral da pata direita por meio de uma mistura de 90mg/kg de cloridrato de ketamina (Ketamin S[®] 50 mg/ml – Cristália Ltda, São Paulo, BR) e 10mg/kg de xilazina (Rompun[®] 20mg/ml – Bayer S/A, São Paulo, BR), administrando-se de 1 a 2 mL por animal de 300g, mostrando duração média de efeito de 40 minutos. Quando os animais ficaram completamente imóveis, foram colocados sobre um campo operatório esterilizado, submetidos à tricotomia e anti-sepsia. Para cada espécime (n=10), foram realizadas na sua região dorsal tricotomia bilateral, duas incisões

lineares sequenciadas por divulsão tecidual e preparo do leito subcutâneo para enxertia. **(FIGURA 10)**

Cada envelope subcutâneo recebeu uma forma de tratamento **(FIGURA 11)**: enxerto de 50mg de grânulos de β TCP:HA ou 50mg de grânulos de β TCP:HA com $2,0 \times 10^6$ células ósseas humanas, passagem 2, pré-incubadas em DMEM por 1 hora antes do procedimento (LIN et al., 2006). Os animais foram sacrificados após 15 e 45 dias, para avaliação da resposta tecidual, e necrópsias excisionais quadrangulares dos sitios de enxerto foram removidas e imediatamente imersas em formol 4% tamponado por no mínimo 24 horas antes do processamento histológico.

4.2.2.5. Teste *in vivo* em calvária de ratos

Foram utilizados 20 *Rattus norvegicus albinus* neste estudo (10 animais por período experimental ou 5 animais por grupo; cada animal equivale a 2 grupos). Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Núcleo de Animais Experimentais (NAL) da Universidade Federal Fluminense e conduzidos sob anestesia geral.

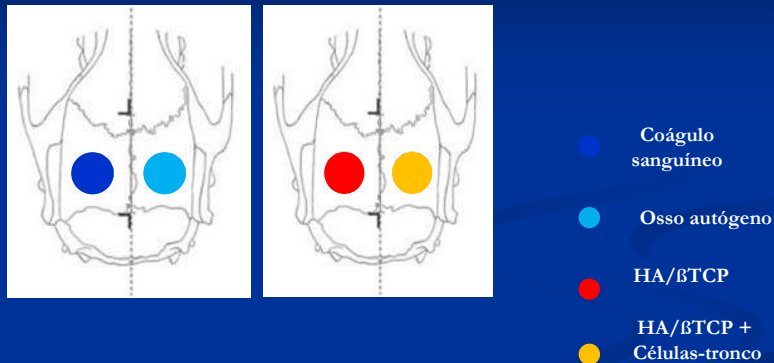
Os animais foram submetidos à anestesia geral e em seguida à tricotomia na região frontoparietal, com auxílio de tesoura e lâmina de barbear. Seguiu-se a antiseptia vigorosa com polivinilpirrolidoniado (PVPI) degermante e alcoólico e colocação de campos cirúrgicos esterilizados. Foi realizada uma incisão em formato de meia-lua de espessura total com cabo de bisturi nº 03 e lâmina nº15.

Na seqüência foi realizado o descolamento da pele e periósteo conjuntamente com o auxílio de um descolador do tipo Molt e cinzel de Ochsenbein nº1, expondo assim a cortical óssea da região interparietal a ser osteotomizada. Com uma broca

trefina cirúrgica de 5mm de diâmetro externo (Sistema de Implantes Nacionais/SIN - São Paulo, BR, Lote: E9208) acoplada a um contra-ângulo redutor com rotação de 1:16 e irrigação externa (Anthogyr S/A - FRA) e micromotor cirúrgico (VK Driller Equipamentos elétricos Ltda - modelo BLM 350 - São Paulo, BR) com irrigação abundante e contínua com solução fisiológica, realizou-se na região interparietal duas craniotomias bicorticais, expondo a dura-máter sem lesão da mesma, a exemplo de trabalhos similares (BOSCH et al. 1995, KHOJASTEH et al., 2008; SILVA et al., 2005; GRANDI, 2007; SANTOS, 2007). **(FIGURA 12)**

Foram quatro os grupos experimentais (**ESQUEMA 1**): Grupo 1 ou Controle Negativo (coágulo sanguíneo, defeito ósseo sem tratamento), Grupo 2 ou Controle Positivo (osso autógeno particulado com macerador de osso, da própria calota retirada para confecção do defeito), Grupo 3 ou Experimental 1 (50mg de β TCP:HA) e Grupo 4 ou Experimental 2 (50mg β TCP:HA + $2,0 \times 10^6$ células humanas pré-incubadas em DMEM 1 hora antes da cirurgia [LIN et al., 2006]). Após as terapias propostas segundo os grupos experimentais, o retalho foi reposicionado e suturado com fio de nylon 4.0 (Ethicon Inc., EUA). Os ratos foram deixados em gaiolas individuais com ração peletada da marca Nuvilab CR1[®] (Nuvital, Paraná, BR) e água *ad libitum*. Foram realizadas visitas pós-operatórias a cada 3 dias e trocas semanais de água e maravalha

Testes em Calvária



Esquema 1: Sítio de implantação ortotópica. Defeitos ósseos extensos em calvária de rato Wistar.

Os animais foram mortos após 15 dias (para observar as alterações inflamatórias) e 45 dias (reparo ósseo inicial), utilizando injeção intraperitoneal de 5mL de KCl 10% que promove parada cardíaca em 2 segundos, de acordo com a resolução nº 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

Constatada a morte do animal, uma necrópsia excisional retangular, englobando a área do defeito e sua periferia, foi realizada utilizando um micromotor odontológico e disco de aço de Carburundum. O material coletado foi fixado por 7 dias em formol 4% tamponado (pH 7,2). (**FIGURA 13**)

4.2.2.6. Processamento e exame histológico das amostras *in vivo*:

Após a fixação das peças referentes aos sítios subcutâneo e crânio, seguiu-se à sua lavagem em água corrente por 1 hora, desmineralização com solução desmineralizadora rápida de ossos da Alkkimia[®] por 48 horas (somente para crânio),

lavagem em água corrente por 1 hora (somente para crânio), desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico (1 banho de 70%, 80%, 90% e 3 banhos de 100%, 1 hora cada), diafanização em 3 banhos de xilol (30 minutos cada), impregnação em 3 banhos de parafina líquida a 60.º C (1 hora cada) e inclusão em parafina. Através de microtomia do material emblocado, foram obtidas lâminas histológicas com cortes na espessura de 5µm, havendo coloração com hematoxilina-eosina (HE) e/ou tricrômio de Masson-Goldner.

A resposta biológica foi analisada em função das alterações inflamatórias (alterações vasculares e infiltrado inflamatório) e dos processos reparatórios (fibrose, proliferação angioblástica, aposição e reabsorção óssea e reabsorção do material).

As imagens mais representativas dos fenômenos observados foram documentadas em um microscópio Nikon Modelo Eclipse E400 utilizando a câmera fotográfica acoplada Evolution[®] MP Color 5.0 MegaPixel (MediaCybernetics, CAN).

4.2.2.7. Análises histomorfométrica e estatística de calvárias de ratos:

Na calvária, além da análise qualitativa, foi empregada uma análise quantitativa de novo osso formado, novo tecido conjuntivo formado, novos vasos sanguíneos formados e presença do material enxertado, a partir das fotomicrografias capturadas em câmera digital.

Campos contíguos não superpostos (5 por lâmina corada em HE, aumento de 170x) representaram a extensão do defeito ósseo, de borda a borda, num total de 200 imagens avaliadas, utilizando o programa Image Pro-Plus 6.0 (MediaCybernetics, Estados Unidos) calibrado em micrômetros/pixel e com superposição de grade contendo 100 pontos (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003).

Para cada imagem, foi contado o número de pontos sobre tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, tecido ósseo neoformado, tecido ósseo antigo e biomaterial enxertado, por patologista calibrado. A densidade média e desvios padrão obtidos foram submetidos à Análise de Variância/ANOVA, com diferenças significantes se $p < 0,05$ (teste de Tukey); se $p > 0,05$, foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (pós-teste de Dun). **(FIGURA 14 e 15)**

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização físico-química:

A análise por Microscopia Eletrônica de Varredura mostrou partículas do material aloplástico em formato granular, com 450-700µm em diâmetro e apresentando superfície microrugosa (**FIGURA 4**). A análise por Difração de Raios-X das amostras de β TCP/HA após calcinação confirmaram a presença de uma cerâmica bifásica. Os três picos máximos de difração correspondem aos planos (0 2 10), (2 2 0) e (2 1 4) do β TCP foram observados a 31.08° , 34.48° e 27.88° como definido na norma JCPDS # 09-0169. Os três picos máximos de difração correspondem aos planos (2 1 1), (1 1 2) e (3 0 0) da HA foram observados a 31.88° , 32.28° e 32.98° como definido na norma JCPDS #09-0432. A análise por Espectroscopia por infravermelho transformada de Fourier mostrou diferenças nos espectros do grupamento fosfato (PO_4^{3-}) no comprimento de onda de 500 a 1200 cm^{-1} , com bandas características de β TCP em 1115 cm^{-1} , 1096 cm^{-1} , 1020 cm^{-1} e 944 cm^{-1} e bandas características de HA em 550 cm^{-1} , 605 cm^{-1} , 960 cm^{-1} e 1040 cm^{-1} , além da banda de grupamento hidroxila (OH^{-1}) em 3571 cm^{-1} . (**GRAFICO 2**)

5.2. Caracterização biológica *in vitro* - Citotoxicidade:

O ensaio de citotoxicidade apontou a biocerâmica β TCP:HA testada como material citocompatível, com resultado semelhante ao titânio (preservação da morfologia da monocamada celular e densidade celular próxima), onde ambos tiveram diferenças significativas em relação ao fenol 0.2% (que apresentava núcleos

picnóticos, com tamanho reduzido, cromatina densa e hipercondensada, sugerindo processo de apoptose e consequente diminuição da densidade celular), tanto morfológica (**FIGURA 8**) quanto estatisticamente (**GRÁFICO 3**).

5.3. Caracterização biológica *in vitro* - Adesão:

Após 14 dias de incubação, foi notada a migração das células sob o material β TCP:HA, que atravessaram os poros do material-teste, emitiram prolongamentos próprios de mecanismos de adesão (filopódios), aderindo e espalhando (reconfigurando sua morfologia, tendo uma alta superfície de contato e acompanhando as irregularidades ou microrrugosidades do BCP) até o topo da superfície da cerâmica (distal ao disco termanox e à monocamada celular inicial).

(**FIGURA 9**)

Este “tropismo positivo” foi muito favorável de se constatar, pensando no material BCP como um arcabouço ou carreador de células, para passar às etapas seguintes de testes biológicos *in vivo*.

5.4. Caracterização biológica *in vivo* - Tecido subcutâneo de ratos:

O tecido subcutâneo exibiu em 15 dias maior celularidade no grupo BCP carreando células ósseas humanas do que o tecido conjuntivo frouxo verificado no grupo de BCP sozinho e em ambos, notou-se: ausência de leucócitos polimorfonucleares ou focos de necrose, moderada presença de linfócitos, macrófagos e células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho circundando o BCP, presença de fibroblastos, matriz extracelular colagenosa e novos vasos

sanguíneos. Após 45 dias, em ambos os grupos foram observados: tecido conjuntivo denso circundando o BCP acompanhado de celularidade diminuída em relação ao período anterior, aumento da matriz extracelular colagenosa e favorável vascularização indicando o processo natural de reparo tecidual e persistência de células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho especialmente no grupo BCP com células ósseas humanas.

Por não haver significativa resposta inflamatória nos grupos testados em tecido subcutâneo de ratos, sem focos de necrose ou indícios de processos de rejeição ao transplante de células humanas, com vascularização, sendo possível o processo de reparo por cicatrização ou conjuntivização. Seguindo os critérios morfológicos para análise de biocompatibilidade estabelecidos pela norma ISO 10993-6, pode-se afirmar que as duas modalidades de enxerto (grupo β TCP:HA e grupo β TCP:HA + células) são biocompatíveis. **(FIGURAS 16,17,18 e19)**

5.5. Caracterização biológica *in vivo* - Calvária de ratos:

Todos os grupos apresentaram em 15 dias leve processo inflamatório e tecido conjuntivo frouxo preenchendo a extensão dos defeitos ósseos, com pobre formação óssea, restrita às suas bordas. A interface célula-material mostrou uma camada composta por células humanas aderentes ao BCP com fenótipo variando de células com núcleo cuboidal e citoplasma intensamente hialino a basofílico e lacuna circular confirmando a diferenciação de osteoblastos em osteócitos. Após 45 dias, amostras de BCP foram circundadas por tecido conjuntivo denso, moderado a abundante novo osso e poucos novos vasos sanguíneos justapostos ao BCP por toda a extensão dos defeitos ósseos no grupo com células ósseas humanas, enquanto BCP sozinho

exibiu menor potencial osteocondutivo, e em ambos os grupos, houve suave presença de células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho, o que sugeriria um início de processo reabsortivo. Nos controles, presença de tecido conjuntivo preenchendo o grupo coágulo sanguíneo e maior formação óssea ao redor de partículas do autoenxerto. Em análise histomorfométrica, no período de 15 dias foi notado novo tecido ósseo especialmente nas bordas do defeito, sem diferenças estatísticas dentre os grupos analisados (coágulo sanguíneo: $2,17 \pm 1,34\%$, osso autógeno: $3,44 \pm 1,84\%$, BCP: $3,04 \pm 2,38\%$, BCP + células humanas: $1,8 \pm 1,67\%$, $p > 0,05$). Após 45 dias, interessante, a nova densidade óssea foi maior no grupo BCP associado a células ósseas humanas ($6,64 \pm 2,84\%$) do que no grupo BCP sozinho ($3,84 \pm 1,75\%$), similar ao grupo osso autógeno ($6,59 \pm 1,79\%$) e significativamente diferente do coágulo sanguíneo ($2,23 \pm 0,75\%$, $p < 0,05$), confirmando o potencial osteocondutor do BCP. Não houve diferenças significativas na densidade de vasos sanguíneos (coágulo sanguíneo: $1,19 \pm 0,48\%$, osso autógeno: $2,15 \pm 1,38\%$, BCP: $1,4 \pm 0,97\%$, BCP + células ósseas humanas: $3,4 \pm 1,77\%$, $p > 0,05$), na densidade de tecido conjuntivo (coágulo sanguíneo: $39,67 \pm 7,13\%$, osso autógeno: $31,90 \pm 3,58\%$, BCP: $33,60 \pm 6,00\%$, BCP + células ósseas humanas: $29,84 \pm 4,04$, $p > 0,05$) e na densidade de biomaterial (osso autógeno: $13,5 \pm 1,24\%$, BCP: $22,80 \pm 3,17\%$, BCP + células ósseas humanas: $26,80 \pm 2,46\%$, $p > 0,05$) observadas no final do experimento (45 dias). **(FIGURAS 20,21,22,23,24,25,26,27,28 e 29), (GRÁFICOS 4 e 5)**

FIGURA 4: Análise topográfica por eletromicrografia de varredura de amostras do material aloplástico β TCP:HA.

A - O material β TCP:HA apresentou formato de grânulos, com tamanho variável de 450 a 750 μ m de diâmetro.

B - A superfície do material β TCP:HA constou de camada globosa heterogênea, favorecendo a formação de uma topografia microrugosa.

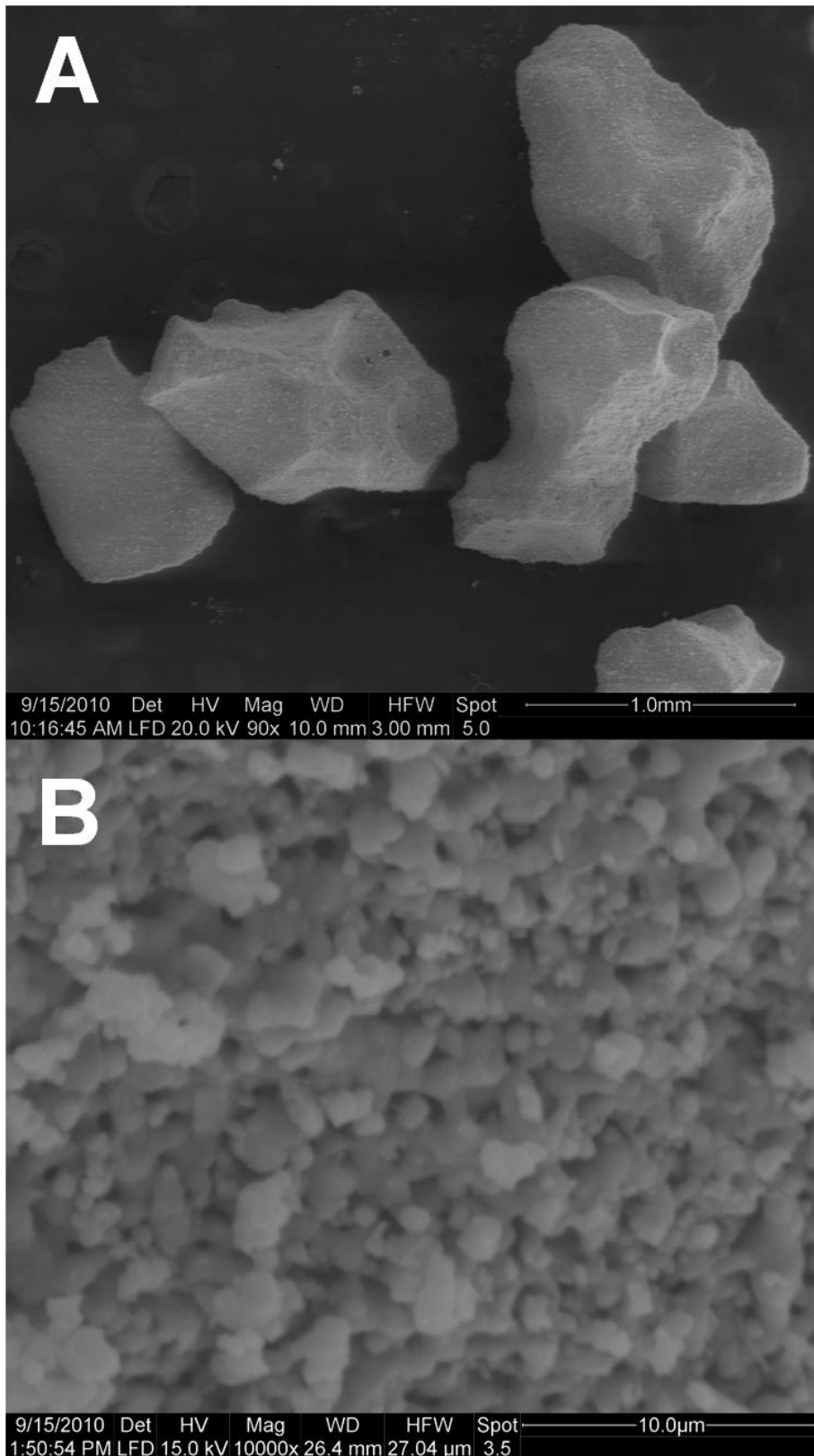


FIGURA 4

GRÁFICO 2: Análise estrutural de amostras do material aloplástico β TCP:HA.

A - Difractograma (DRX) do material sinterizado a 1150°C, β TCP:HA. Os três picos máximos de difração correspondentes aos planos cristalinos do β TCP foram: (0 2 10), (2 2 0) e (2 1 4), observados respectivamente em 31,0°, 34,4° e 27,8°, de acordo com a ficha JCPDS de nº 09-0169. Os três picos máximos de difração correspondentes aos planos cristalinos da HA foram: (2 1 1), (1 1 2) e (3 0 0), observados respectivamente em 31,8°, 32,2° e 32,9°, de acordo com a ficha JCPDS de nº 09-0432.

B - Espectrofotometria por infravermelho transformada por Fourier (FTIR) do material sinterizado a 1150°C, β TCP:HA. A diferença entre os espectros do β TCP [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] e da HA [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] está nas bandas de absorção do grupo P-O na faixa de 500 a 1200 cm^{-1} . Nestas regiões, para a fase β TCP, aparecem as bandas a 1115 cm^{-1} (**, PO_4^{3-}), 1096 cm^{-1} (**, PO_4^{3-}), 1020 cm^{-1} (**, PO_4^{3-}) e 944 cm^{-1} (**, PO_4^{3-}). Já o espectro da hidroxiapatita evidencia as bandas a 550 cm^{-1} (*, PO_4^{3-}), 605 cm^{-1} (*, PO_4^{3-}), 960 cm^{-1} (*, PO_4^{3-}) e 1040 cm^{-1} (*, PO_4^{3-}), além dos grupos hidroxilas a partir de banda a 3571 cm^{-1} (OH^{1-}).

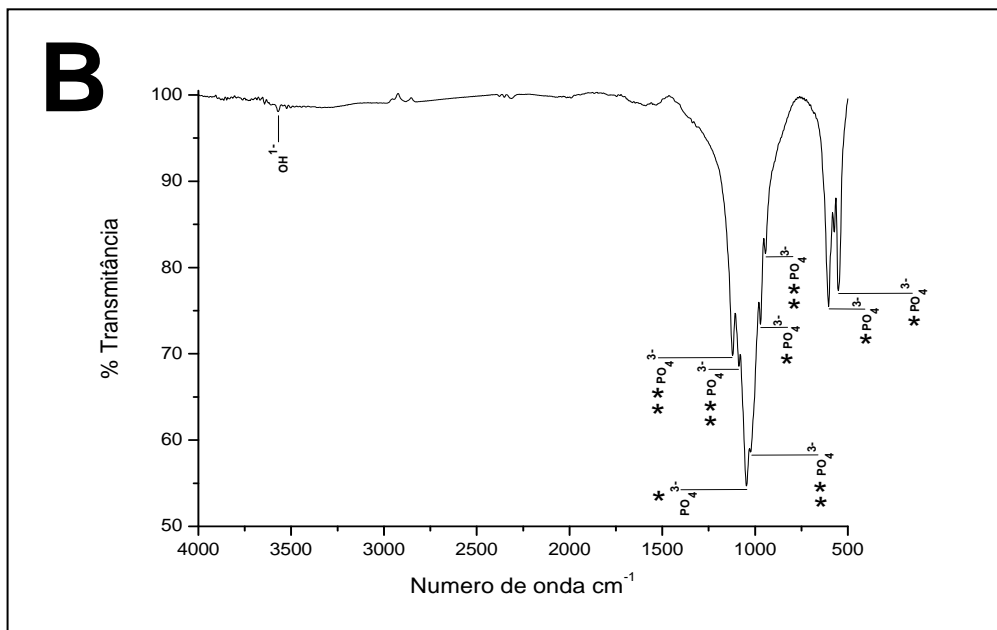
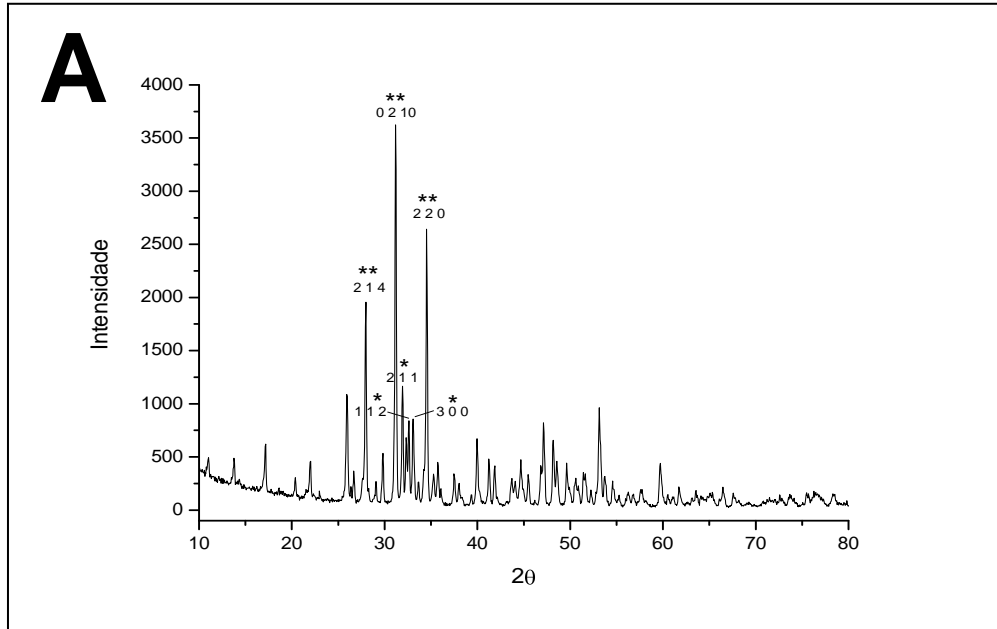


GRÁFICO 2

FIGURA 5: Obtenção das células humanas para experimentos – Parte 1.

A - Procedimento cirúrgico de artroplastia em paciente adulto saudável.

B - Fragmentos ósseos dispensados após a cirurgia corretiva, que serviram de fonte para a obtenção das células humanas.

Imagens gentilmente cedidas pelo médico ortopedista prof. Dr. Vinícius Schoot Gameiro, durante a realização de procedimento no Centro Cirúrgico do Hospital Universitário Antônio Pedro.

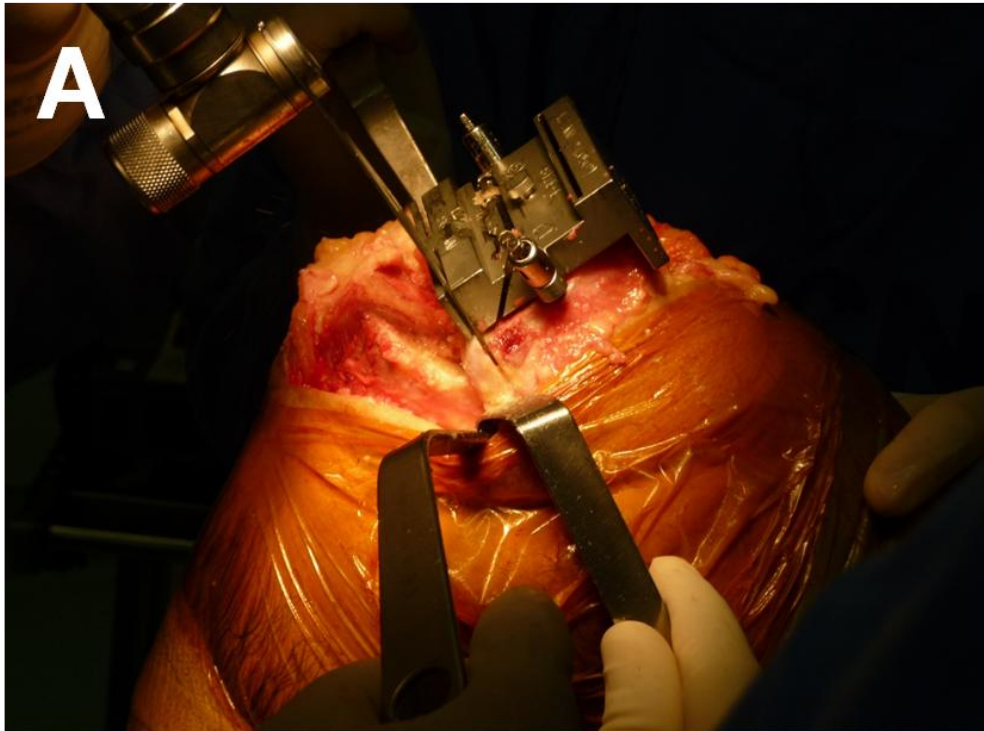


FIGURA 5

FIGURA 6: Obtenção das células humanas para experimentos – Parte 2.

A - Fragmentos ósseos acondicionados em container plástico contendo meio de cultura DMEM com 10% de soro fetal bovino.

B - Incubação do material biológico em estufa Thermo sob condições ambientais favoráveis para o crescimento das células (95% de atmosfera úmida, pressão de $\text{CO}_2=5\%$).

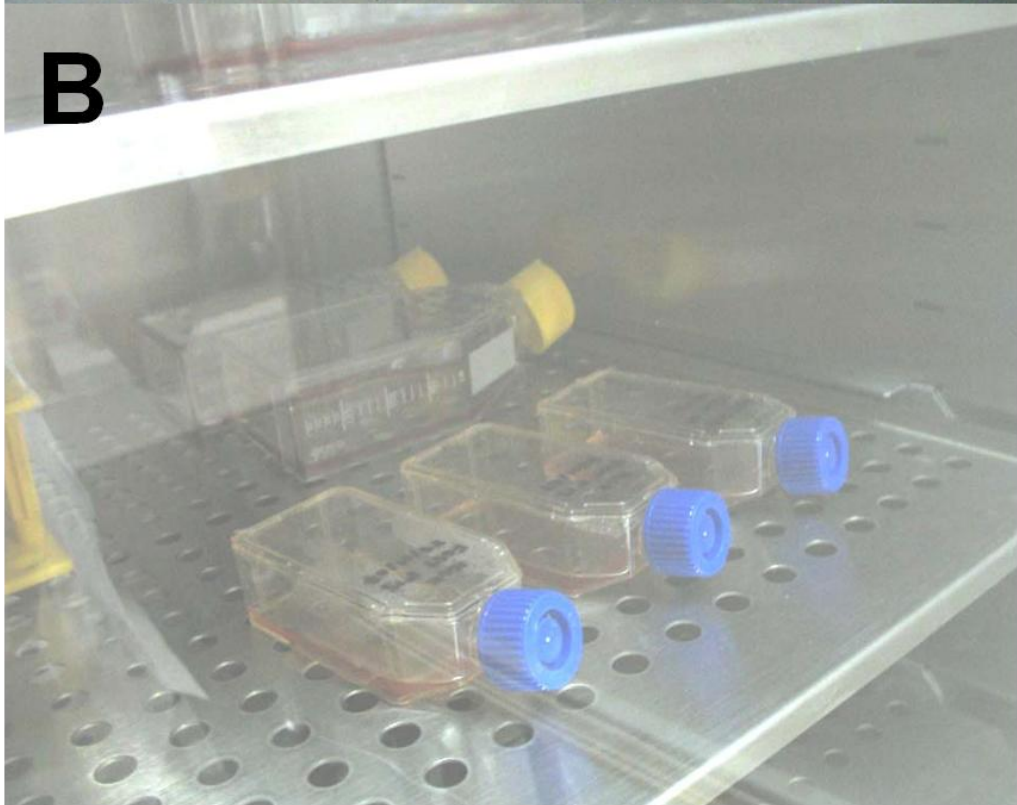


FIGURA 6

FIGURA 7: Obtenção das células humanas para experimentos – parte 3.

A - Fotomicrografia evidenciando migração de células a partir do explante ou fragmento ósseo. A barra representa 100 μ m.

B - Fotomicrografia evidenciando monocamada de células fibroblastóides já estabelecida. A barra representa 100 μ m.

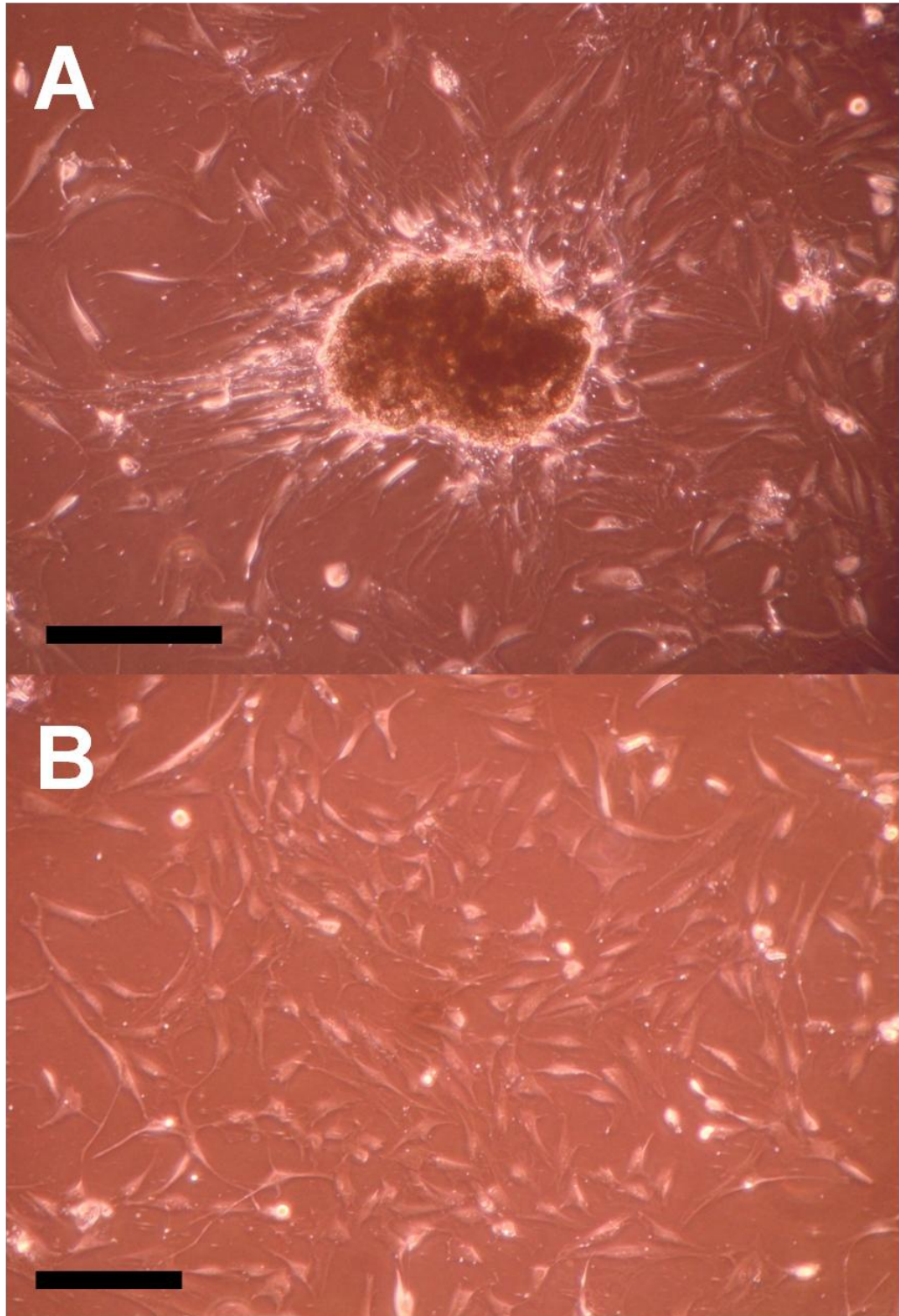


FIGURA 7

FIGURA 8: Teste *in vitro* de citotoxicidade.

A - Monocamada hídida de células ósseas humanas, tratadas por 24 horas com extrato de β TCP:HA e com núcleo corado por cristal violeta. A barra representa 200 μ m.

B - Monocamada hídida de células ósseas humanas, tratadas por 24 horas com extrato de titânio e com núcleo corado através de cristal violeta. A barra representa 200 μ m.

C - Perda da estrutura de monocamada de células ósseas humanas, tratadas por 24 horas com extrato de fenol 2% e com núcleo corado por cristal violeta. Sugestivo processo de morte celular por apoptose, caracterizado por perda da morfologia fibroblastóide típica, picnose e hipercromatismo nucleares e significativa diminuição do número de células. A barra representa 200 μ m.

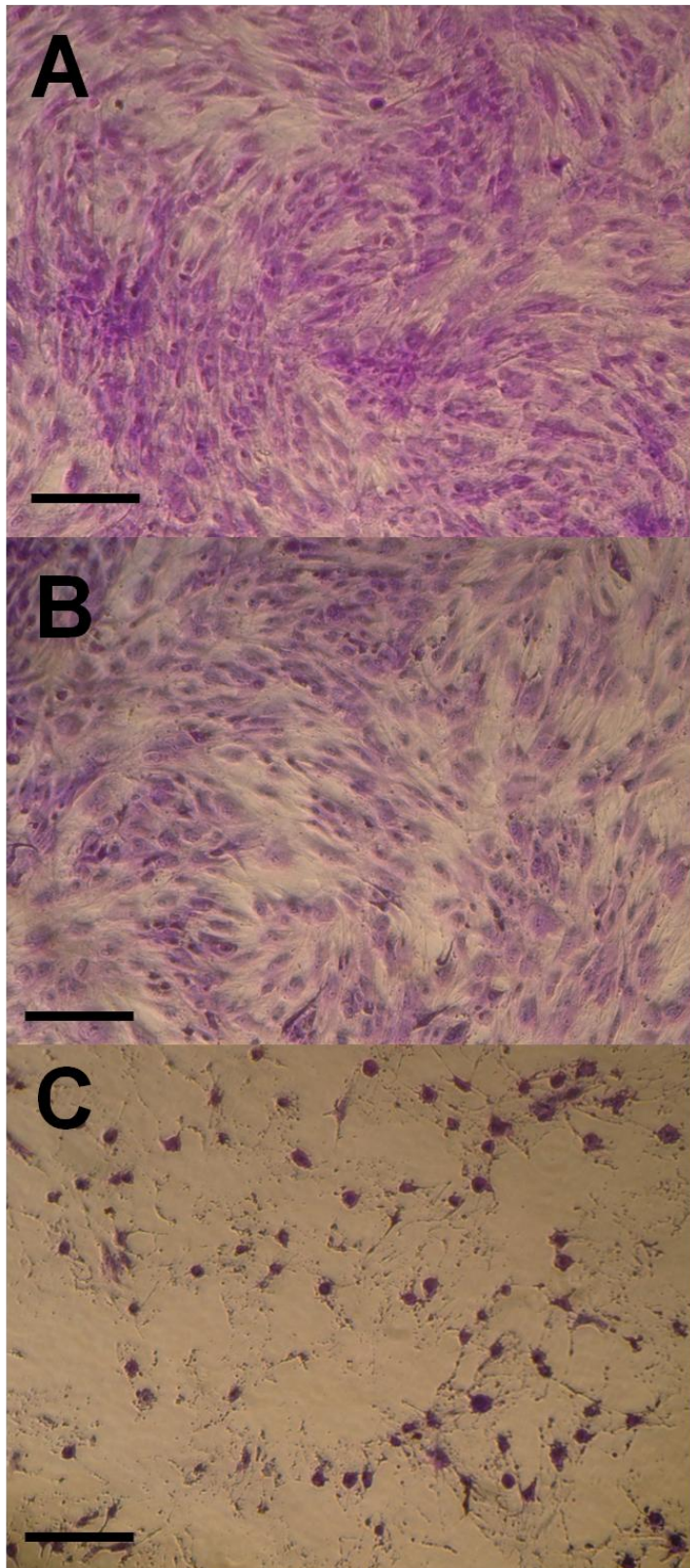


FIGURA 8

GRÁFICO 3: Teste *in vitro* de citotoxicidade.

Gráfico de viabilidade celular, determinada pela equação: Viabilidade Celular = Absorbância das células com extrato / Absorbância das células sem extrato, após o desconto em ambos os casos do branco ou corante cristal violeta.

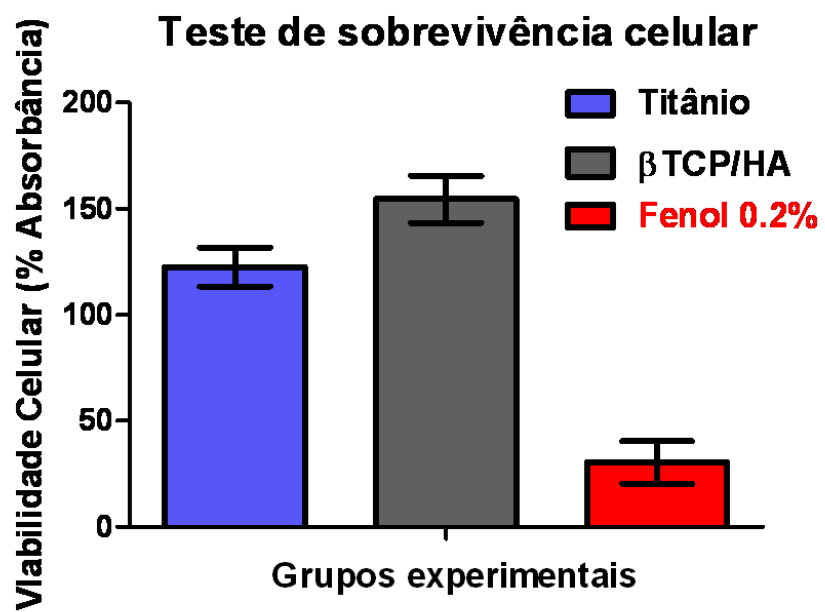


GRÁFICO 3

FIGURA 9: Teste *in vitro* de adesão celular.

A - Eletromicrografia de varredura representando uma célula derivada de osso trabecular espreada sobre grânulo do material-teste, após 14 dias de incubação.

B - Eletromicrografia de varredura representando uma célula derivada de osso trabecular com migração orientada para o interior de um dos poros que constituem o material-teste, após 14 dias de incubação.

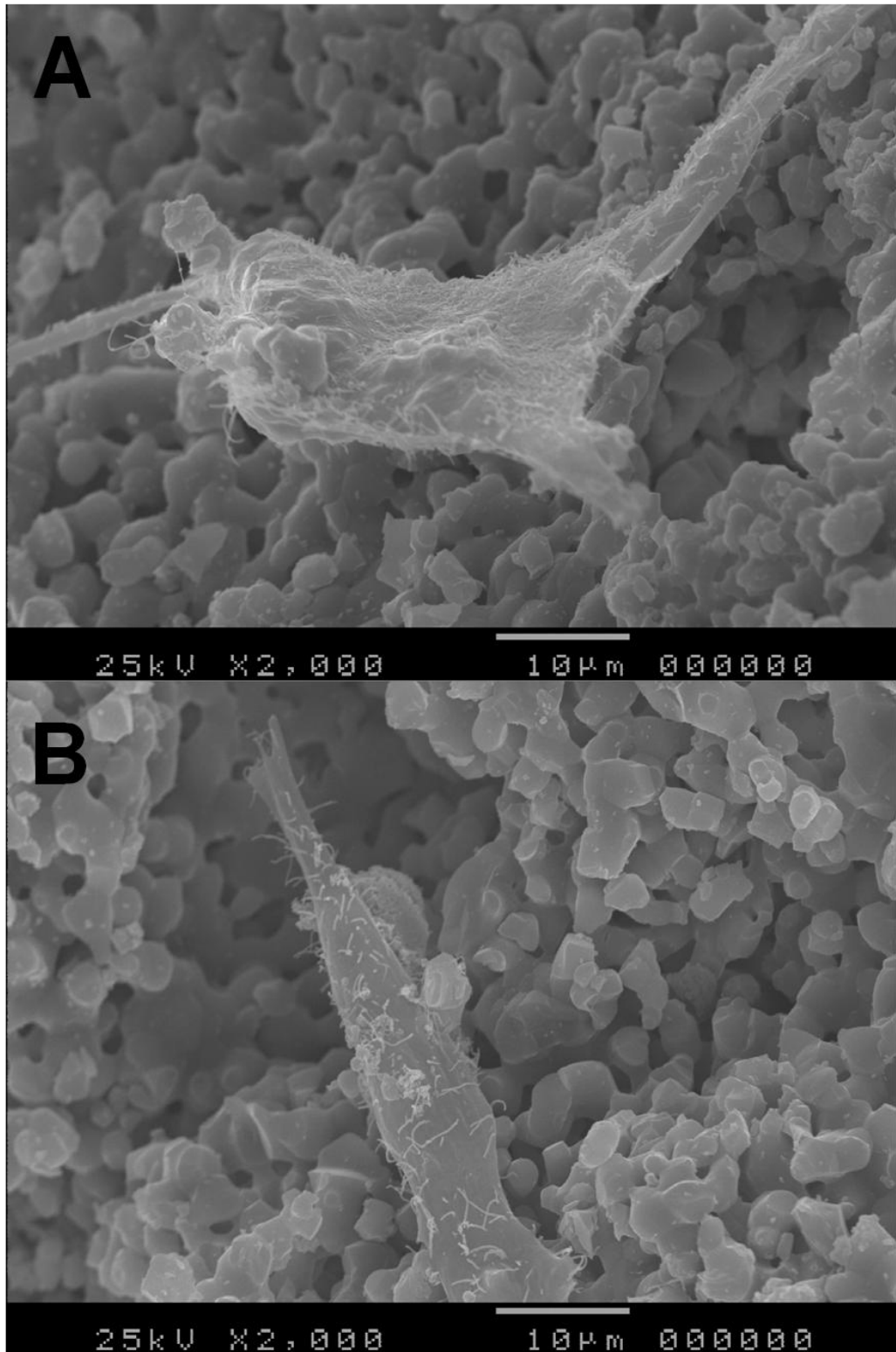


FIGURA 9

FIGURA 10: Testes *in vivo* em ratos.

A - Anestesia geral intramuscular.

B - Instrumental cirúrgico.

C - Design experimental dos diferentes sítios de enxerto por animal experimental:
subcutâneo e calvária.

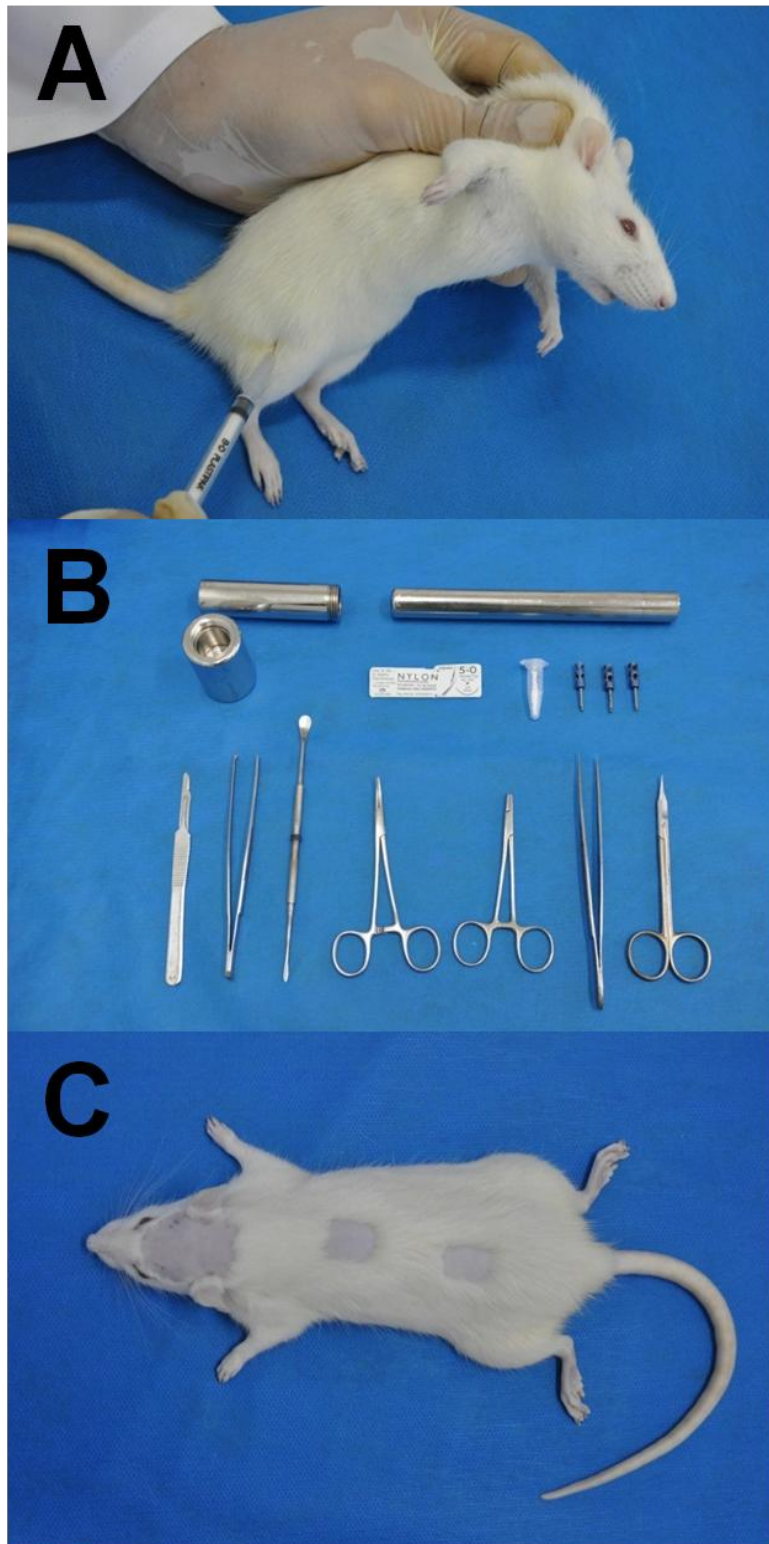


FIGURA 10

FIGURA 11: Testes *in vivo* em tecido subcutâneo de ratos.

A - Preparo do leito subcutâneo para receber o material-teste.

B - Enxertia do material sem células no leito subcutâneo.

C - Enxertia do material com células no leito subcutâneo.

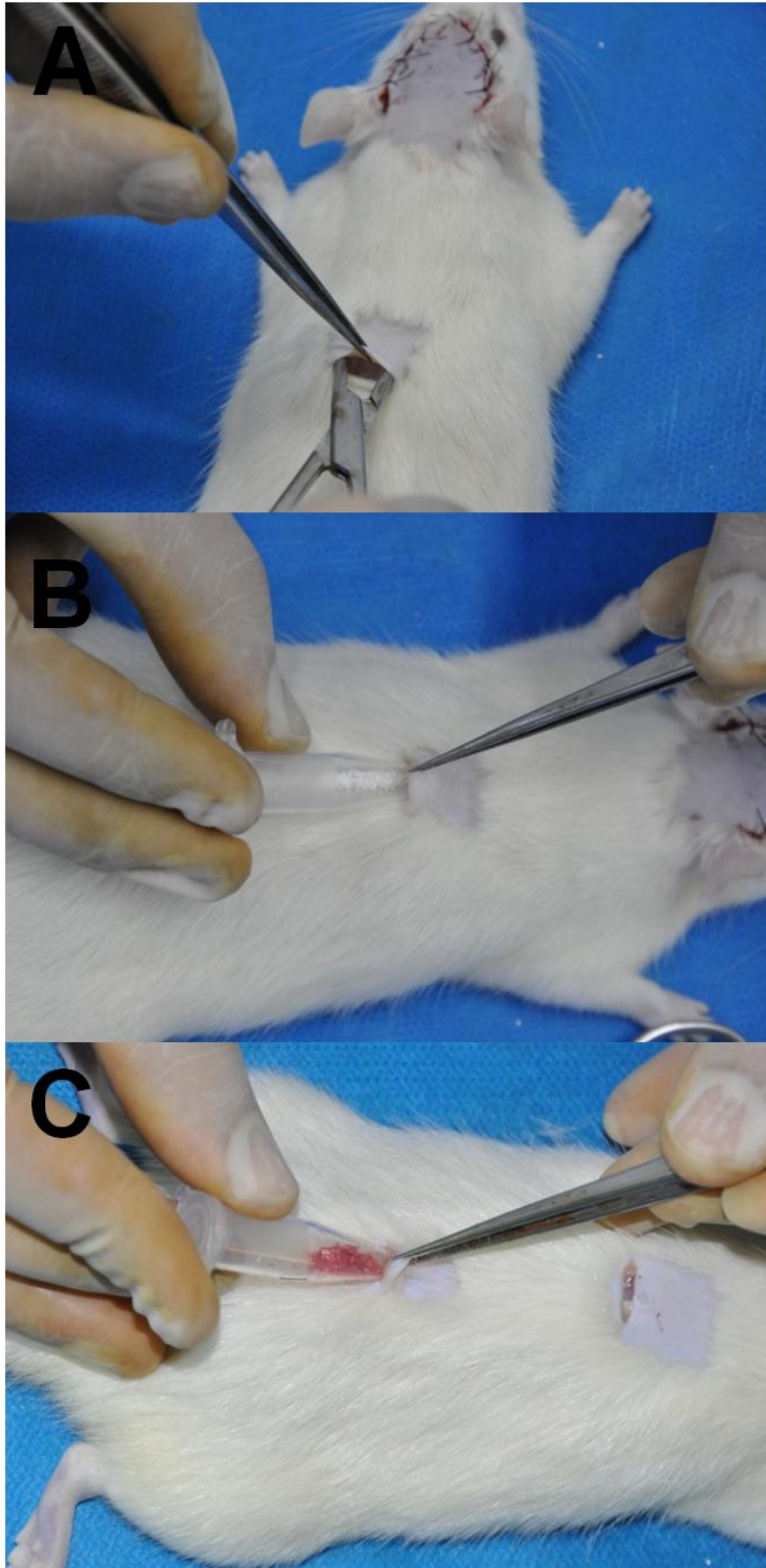


FIGURA 11

FIGURA 12: Testes *in vivo* em calvária de ratos – Parte 1.

A - Criação dos defeitos ósseos em calvária de ratos Wistar, por meio de trefinagem perpendicular à calota craniana e com irrigação contínua.

B - Defeitos ósseos circulares bilaterais, com diâmetro interno de 5mm, separados entre si por 1 mm e preenchidos por osso autógeno particulado (esquerda) ou coágulo sanguíneo (direita).

C - Defeitos ósseos circulares bilaterais, com diâmetro interno de 5mm, separados entre si por 1 mm e preenchidos por β TCP:HA (esquerda) ou β TCP:HA + células humanas (direita).

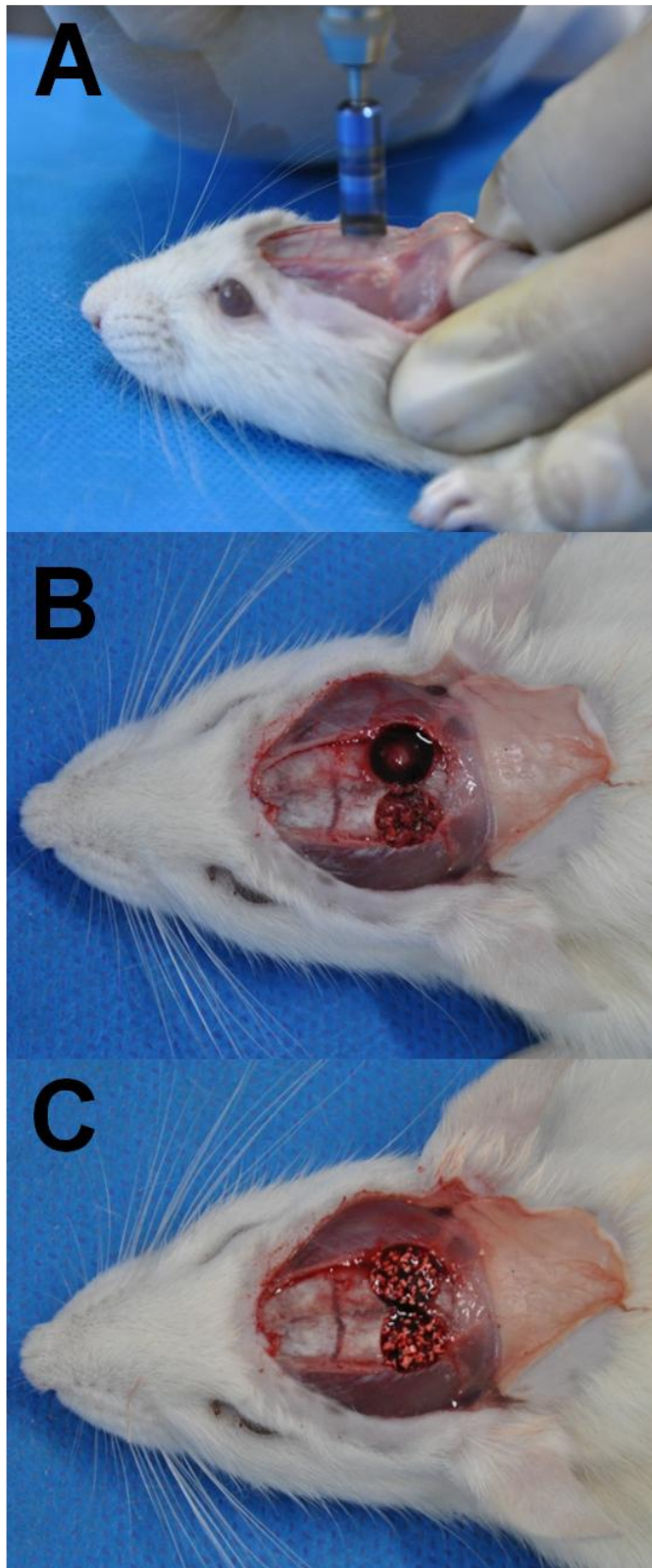


FIGURA 12

FIGURA 13: Testes *in vivo* em calvária de ratos – Parte 2.

A - Necrópsia de crânio de rato Wistar (visão externa).

B - Necrópsia de crânio de rato Wistar (visão interna). Notar áreas referentes aos defeitos osseos circulares (diâmetro: 5mm) bilaterais induzidos.

C - Clivagem do crânio de rato com navalha e separação dos grupos experimentais.

D - Clivagem na região mediana do defeito ósseo de cada grupo experimental, sequenciada do depósito dos fragmentos em cassetes para o posterior processamento histológico.

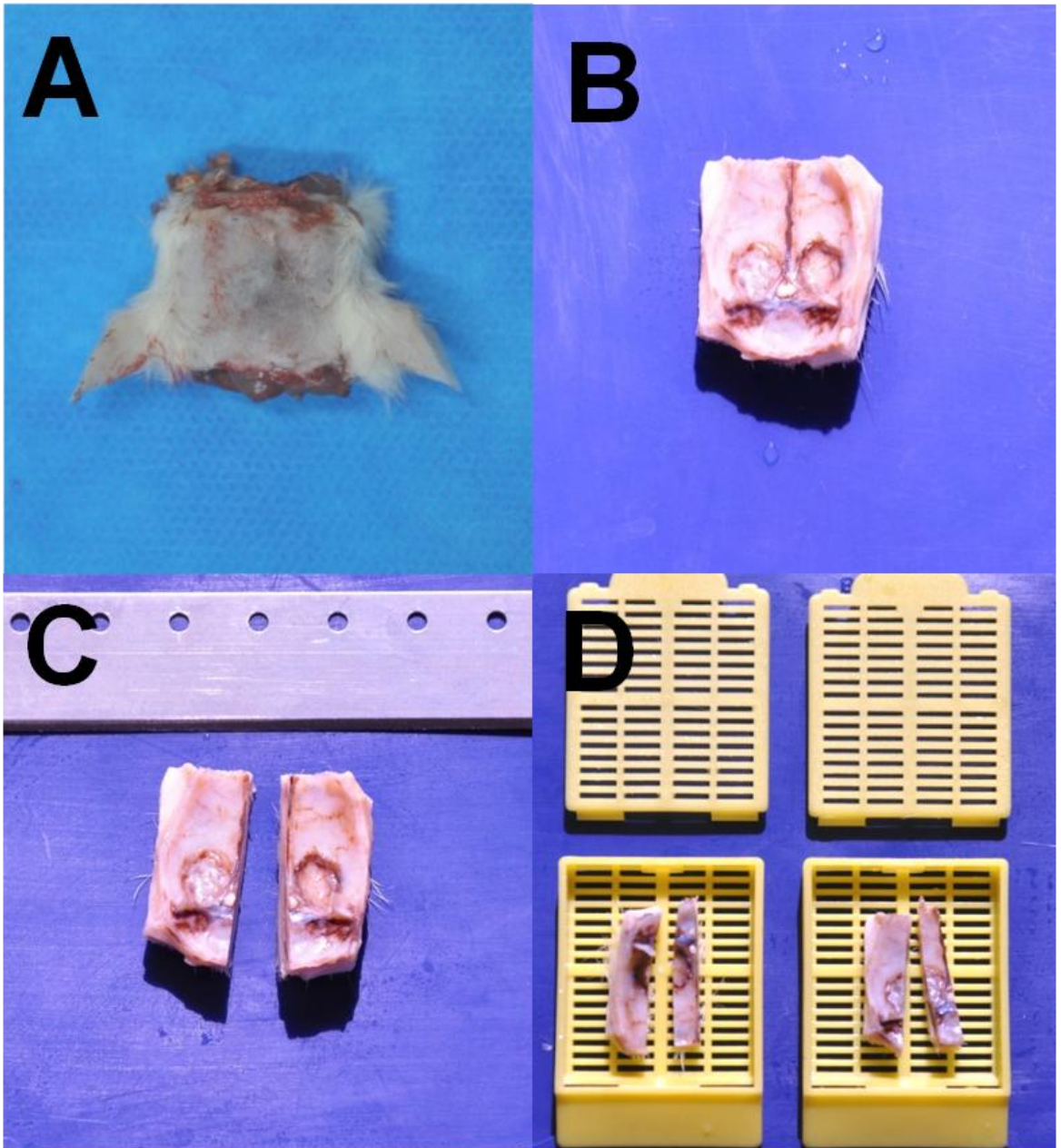


FIGURA 13

FIGURA 14: Histomorfometria de calvária de ratos – Parte 1.

A - Captura dos 5 campos contíguos não-superpostos em cada lâmina histológica, referente à região mediana ou de maior extensão do defeito ósseo em calvária de rato (5mm).

B - Após captura das imagens, cada campo teve a sobreposição de uma grade de calibração de 100 pontos para a contagem manual, por meio do programa Image ProPlus.

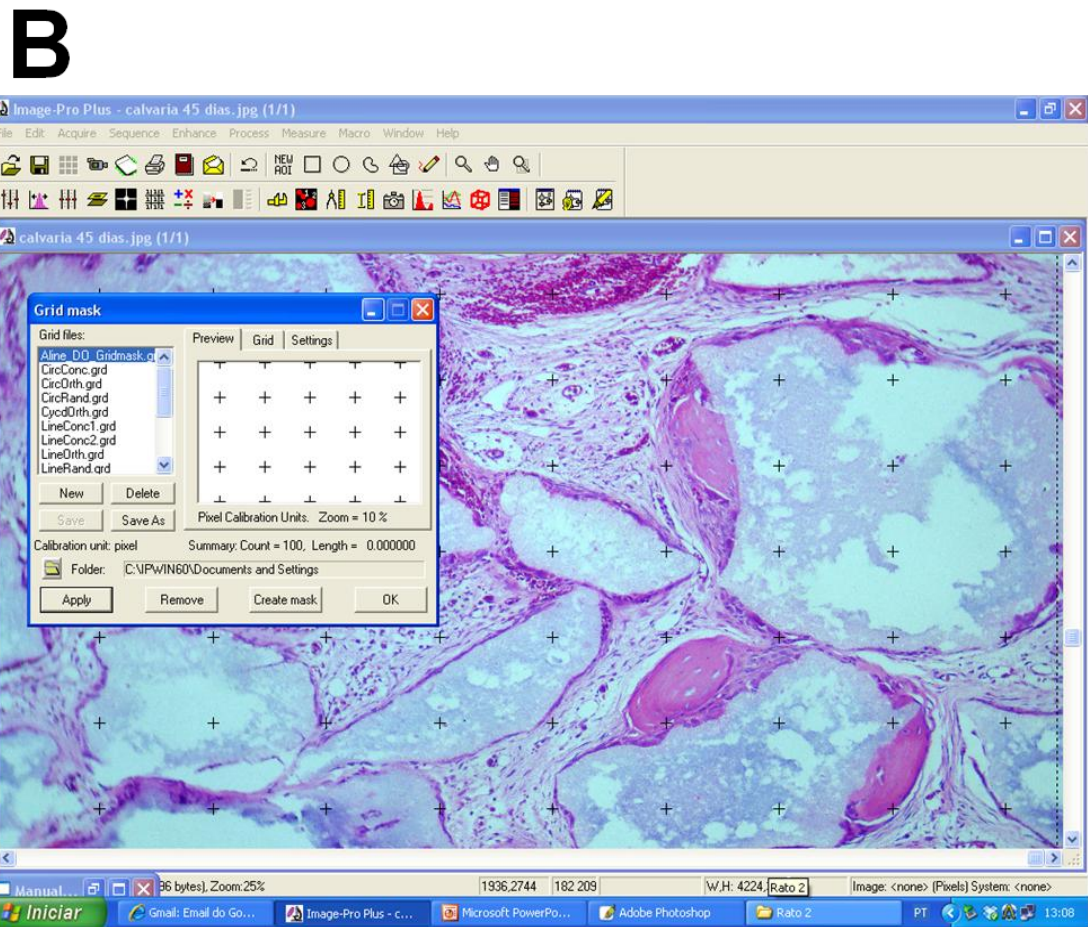
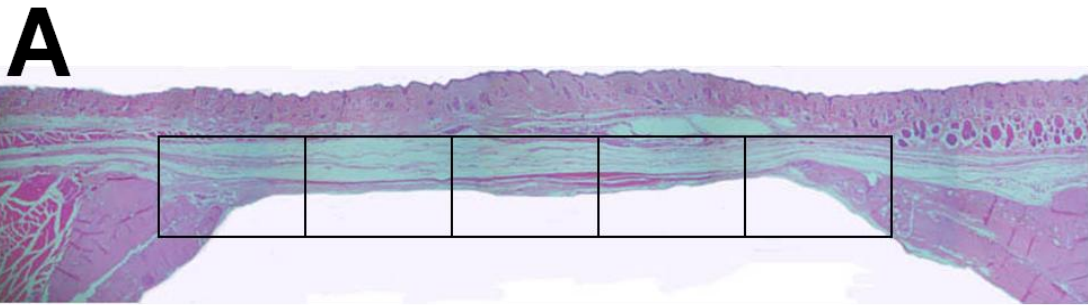


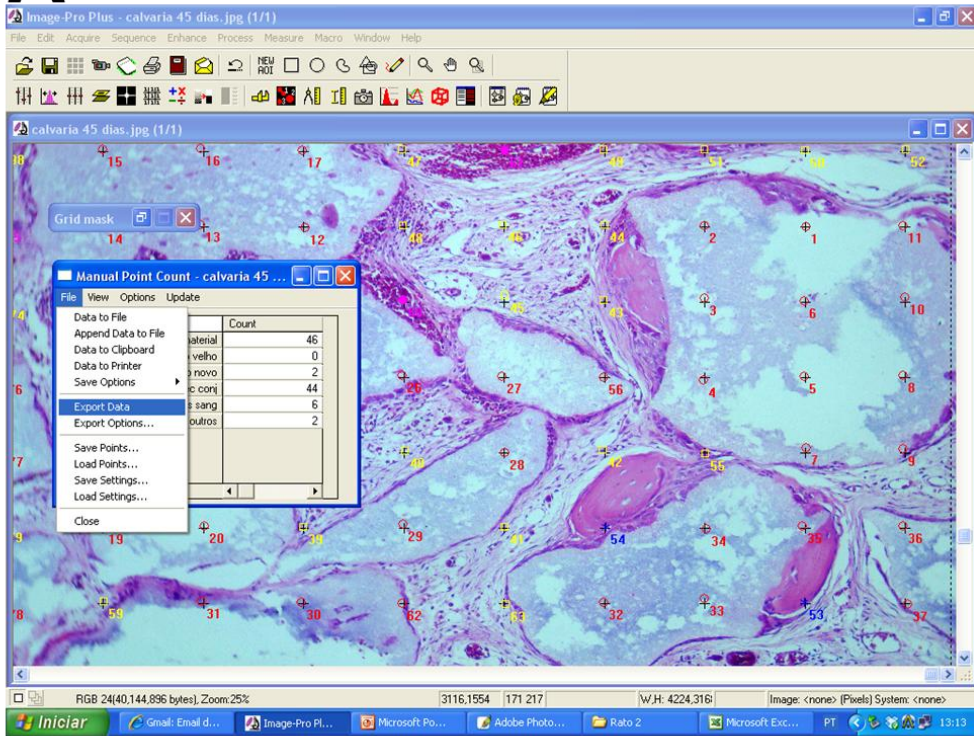
FIGURA 14

FIGURA 15: Histomorfometria de calvária de ratos – Parte 2.

A - Determinação de classes de interesse para a contagem dos fenômenos biológicos, no programa Image ProPlus.

B - Plotagem direta dos resultados obtidos no programa Image ProPlus para programa de editoração de planilhas eletrônicas (MS Excel)

A



B

The screenshot shows a Microsoft Excel spreadsheet with the following data:

Name	Count	% of Total	Symbol
biomaterial	46	46	Red Circle
osso velho	0	0	Green Cross
osso novo	2	2	Blue Star
tec conj	44	44	Yelw. Square
vasos sang	6	6	Mgnta. Dot
outros	2	2	Cyan Triangle

FIGURA 15

FIGURA 16: Tecido subcutâneo de ratos, 15 dias – Parte 1.

A - 15 dias, grupo β TCP:HA sem células. Presença de tecido conjuntivo (CT) e vaso sanguíneo (asterisco) interpondo grânulos de BCP. Notar a presença de algumas células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho (setas). Coloração: Hematoxilina-Eosina. A barra representa 60 μ m.

B - 15 dias, grupo β TCP:HA com células. Presença de maior celularidade ao redor dos grânulos de BCP, interpostos por tecido conjuntivo (CT) e vaso sanguíneo (asterisco). Notar a presença de algumas células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho (setas). Coloração: Hematoxilina-Eosina. A barra representa 60 μ m.

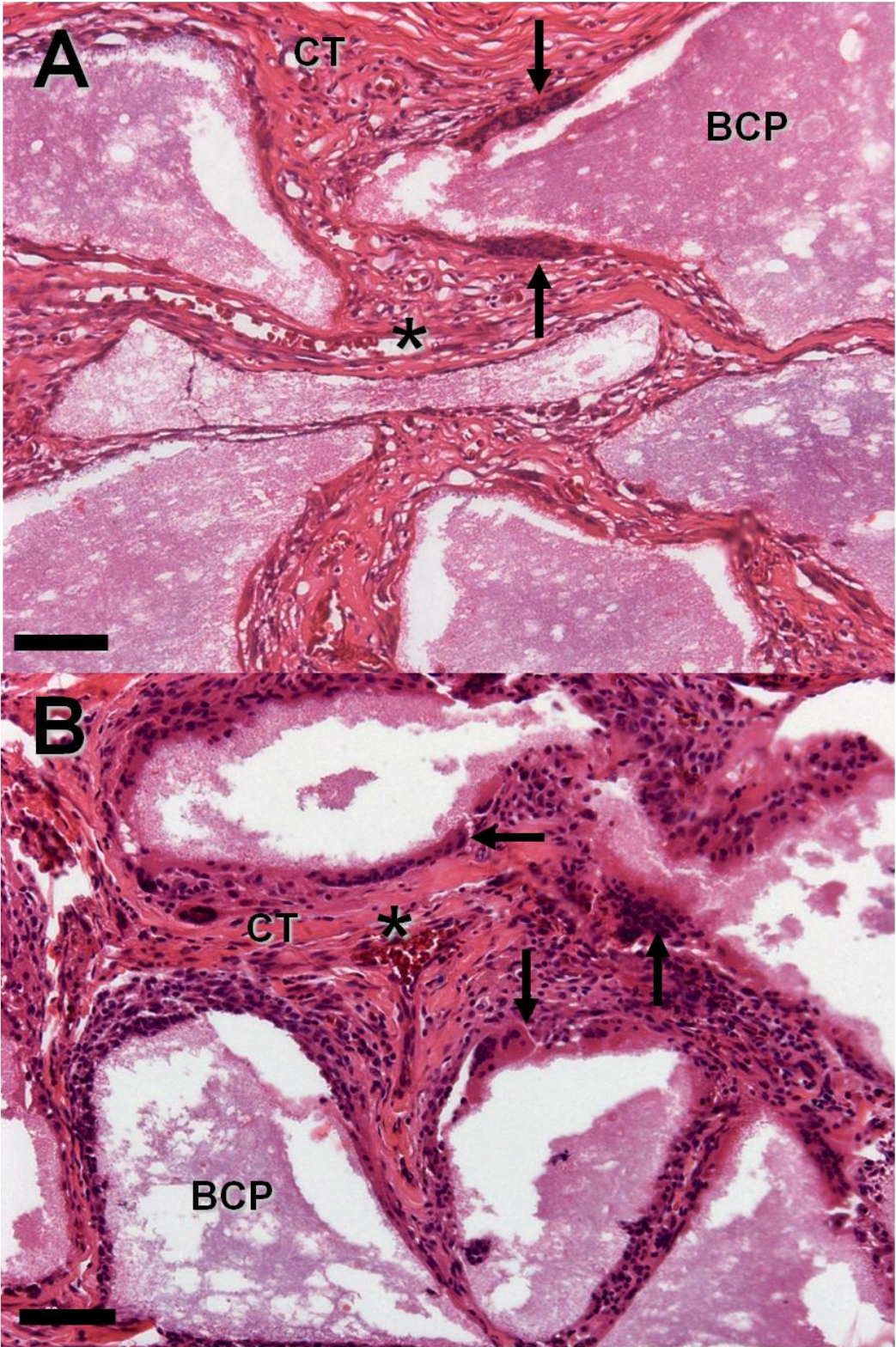


FIGURA 16

FIGURA 17: Tecido subcutâneo de ratos, 15 dias – Parte 2.

A - 15 dias, grupo β TCP:HA sem células. Presença de célula gigante (seta) formada por poucos núcleos referentes a fusão de macrófagos constituintes do infiltrado inflamatório envolvendo partícula do material (BCP), de vasos sanguíneos (asteriscos) e de tecido conjuntivo (CT) interpondo os seus grânulos. O mesmo comportamento biológico foi observado no grupo com células. Coloração: Hematoxilina-Eosina. A barra representa 10 μ m.

B - 15 dias, grupo β TCP:HA sem células. Presença de célula gigante (seta) formada por muitos núcleos envolvendo um fragmento maior do material (BCP), de vaso sanguíneo (asterisco) e de tecido conjuntivo (CT) interpondo os seus grânulos. O mesmo comportamento biológico foi observado no grupo com células. Coloração: Hematoxilina-Eosina. A barra representa 30 μ m.

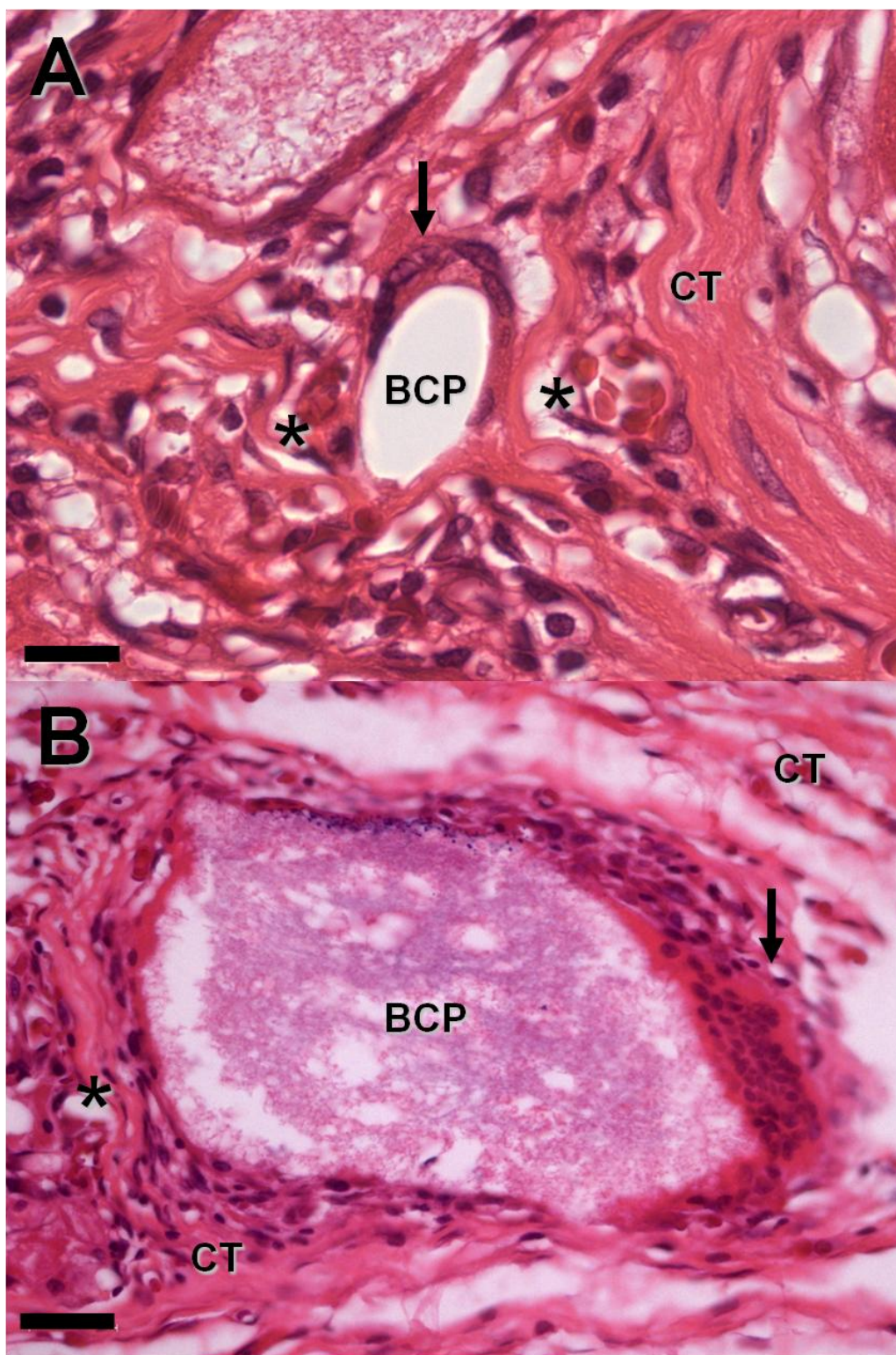


FIGURA 17

FIGURA 18: Tecido subcutâneo de ratos, 45 dias – Parte 1.

A - 45 dias, grupo β TCP:HA sem células. Presença de tecido conjuntivo (CT) com maior matriz extracelular colagenosa interpondo os grânulos de β TCP:HA e de vaso sanguíneo (asterisco). Presença moderada de células gigantes do tipo corpo estranho (setas) envolvendo o material (BCP). Coloração: Tricrômio de Masson. A barra representa 60 μ m.

B - 45 dias, grupo β TCP:HA com células. Presença de tecido conjuntivo (CT) com maior matriz extracelular colagenosa interpondo os grânulos de β TCP:HA e de vaso sanguíneo (asterisco). Presença moderada de células gigantes do tipo corpo estranho (setas) envolvendo o material (BCP). Coloração: Tricrômio de Masson. A barra representa 60 μ m.

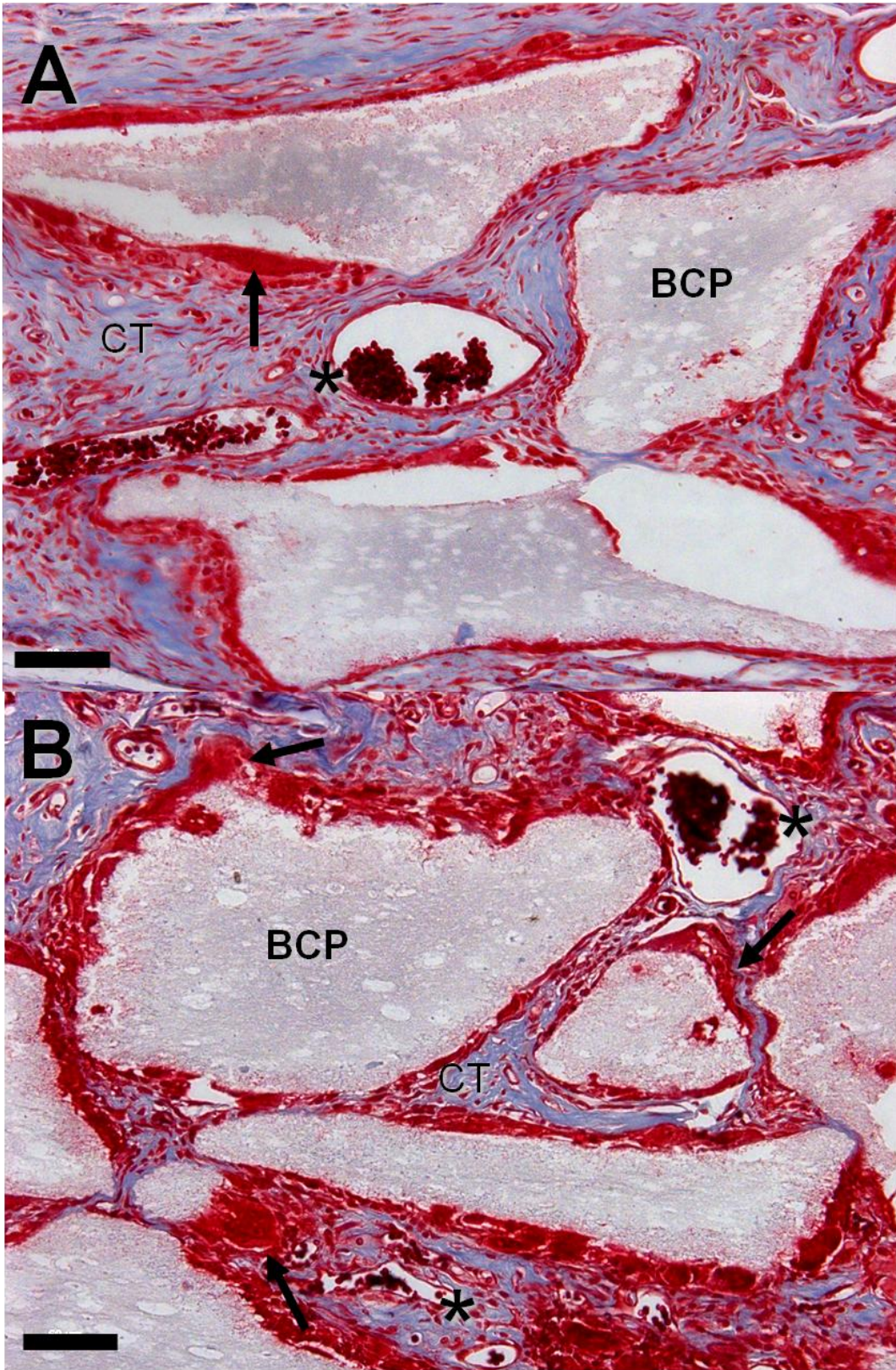


FIGURA 18

FIGURA 19: Tecido subcutâneo de ratos, 45 dias – Parte 2.

A - 45 dias, grupo β TCP:HA (BCP) com células. Uma das amostras apresentou foco de metaplasia conjuntiva, com transdiferenciação do tecido muscular (M) abaixo do tecido conjuntivo (CT) subcutâneo em tecido cartilaginoso (CA) hialino. Coloração: Tricrômio de Masson. A barra representa 100 μ m.

B - 45 dias, grupo β TCP:HA com células. Detalhe do tecido cartilaginoso hialino. Coloração: Tricromio de Masson. A barra representa 30 μ m.

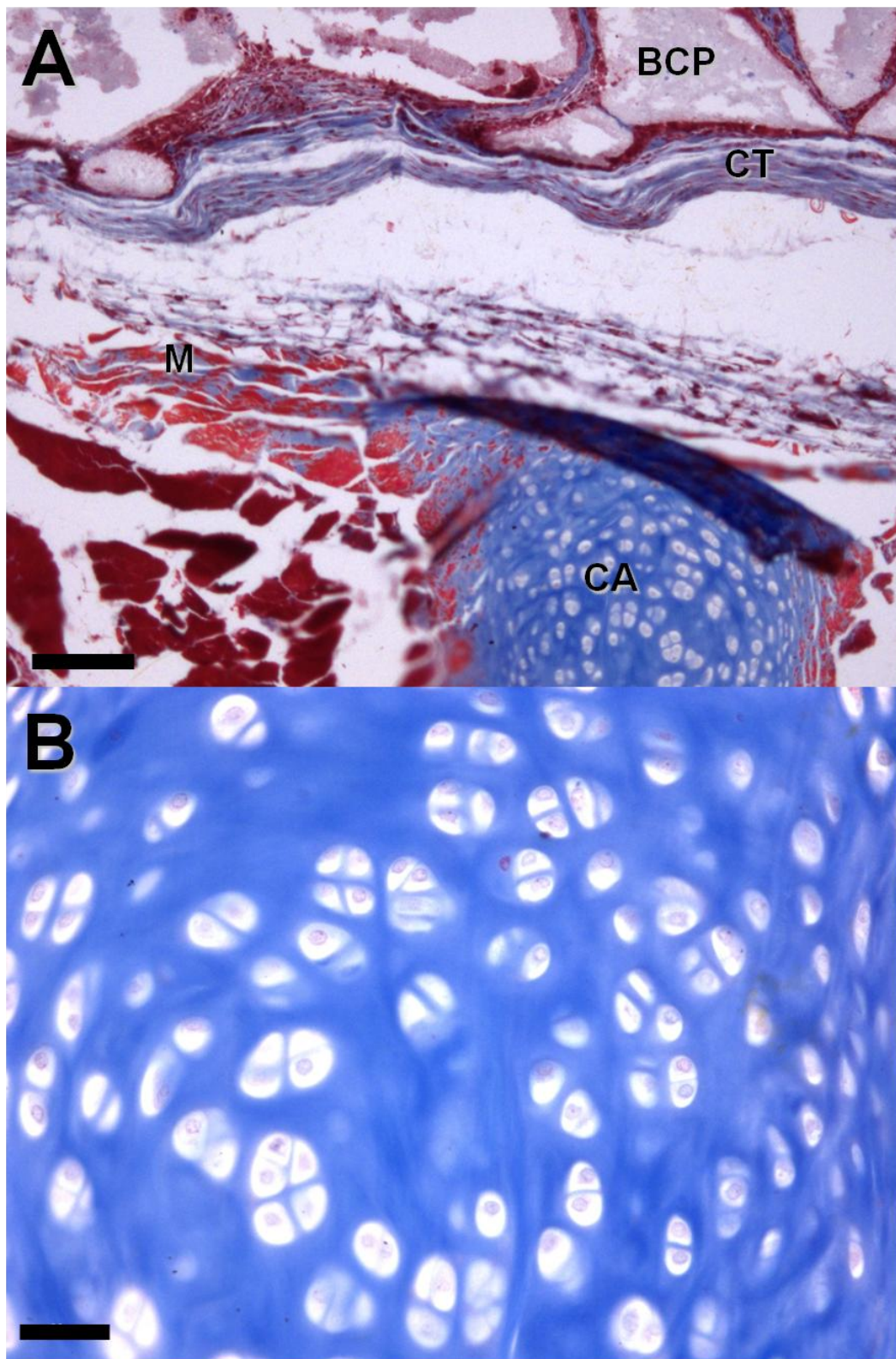


FIGURA 19

FIGURA 20: Calvária de ratos. Coágulo sanguíneo – Parte 1.

A - 15 dias, grupo Coágulo Sanguíneo. Tecido conjuntivo (CT) frouvo e denso, abundante vascularização (asterisco). Coloração: Hematoxilina-Eosina. A barra representa 60µm.

B - 45 dias, grupo Coágulo Sanguíneo. Tecido conjuntivo (CT) denso, abundante vascularização (asterisco). Coloração: Hematoxilina-Eosina. A barra representa 60µm.

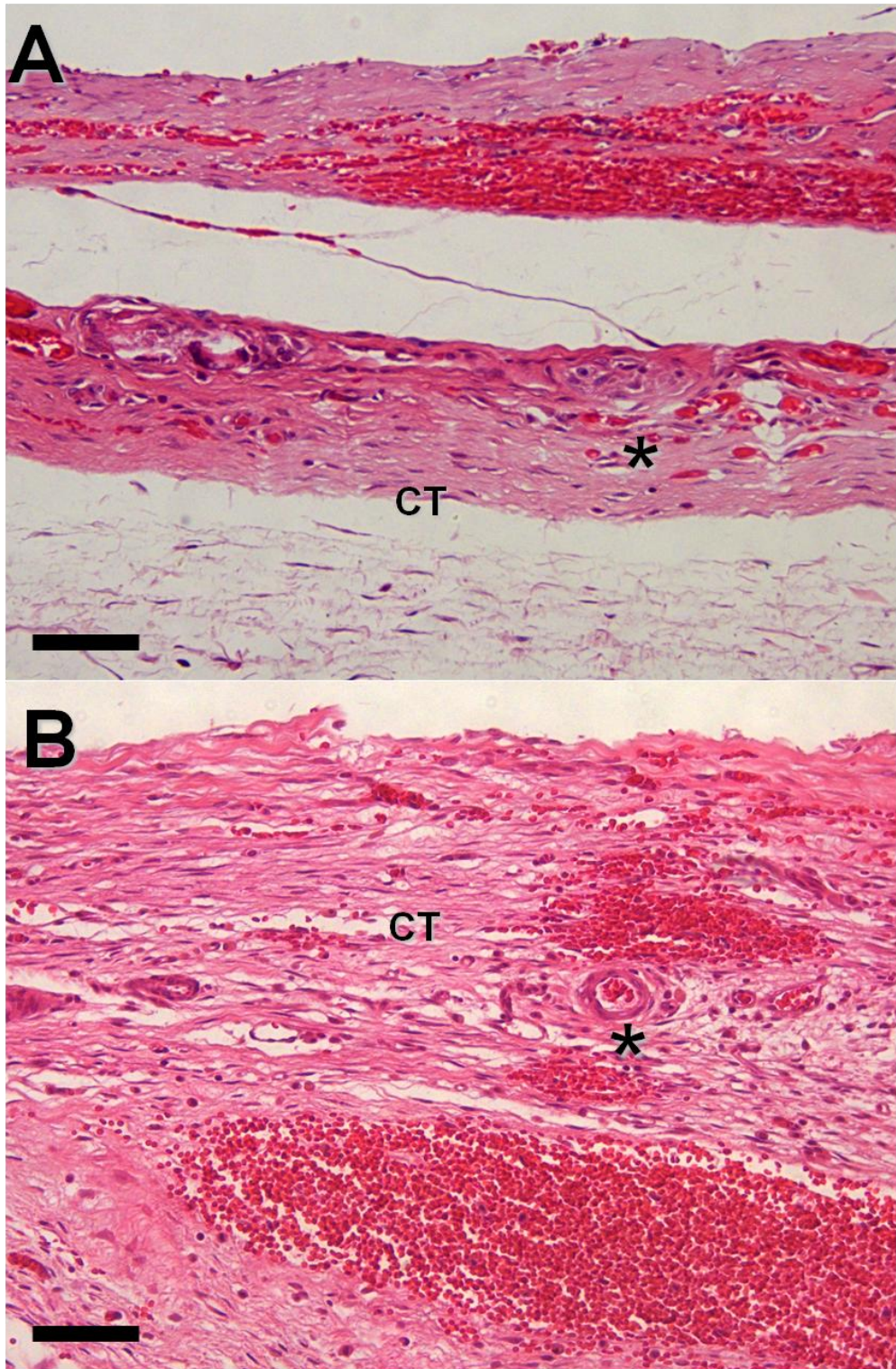


FIGURA 20

FIGURA 21: Calvária de ratos. Coágulo sanguíneo – Parte 2.

45 dias, grupo Coágulo Sanguíneo. Presença de osso neoformado (NB) somente na borda do defeito ósseo constituído de osso velho (OB), enquanto o resto do defeito foi preenchido por tecido conjuntivo (CT) e vasos sanguíneos (asterisco). Todos os demais grupos experimentais apresentaram tanto osteogênese marginal quanto central. Coloração: Hematoxilina-Eosina. A barra representa 60µm.

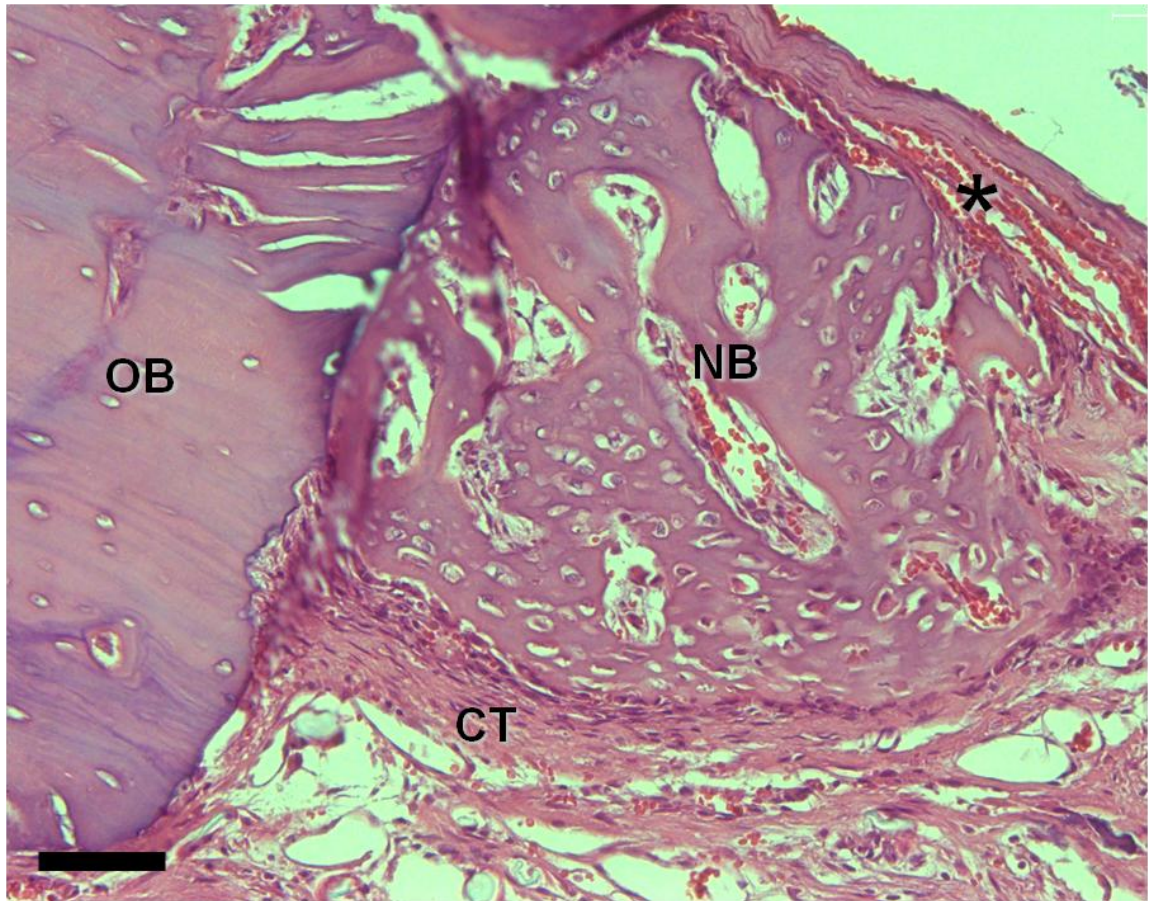


FIGURA 21

FIGURA 22: Calvária de ratos. Osso Autógeno – Parte 1.

A - 15 dias, grupo Osso Autógeno. Fragmentos de osso velho (OB) da própria calota craniana, envoltos por tecido conjuntivo (CT) em formação. Coloração: Hematoxilina-Eosina. A barra representa 60 μ m.

B - 15 dias, grupo Osso Autógeno. Substituição do tecido de granulação que circunda os fragmentos de osso velho (OB) por tecido conjuntivo (CT) e presença de novos vasos sanguíneos (asterisco). Coloração: Hematoxilina-Eosina. A barra representa 10 μ m.

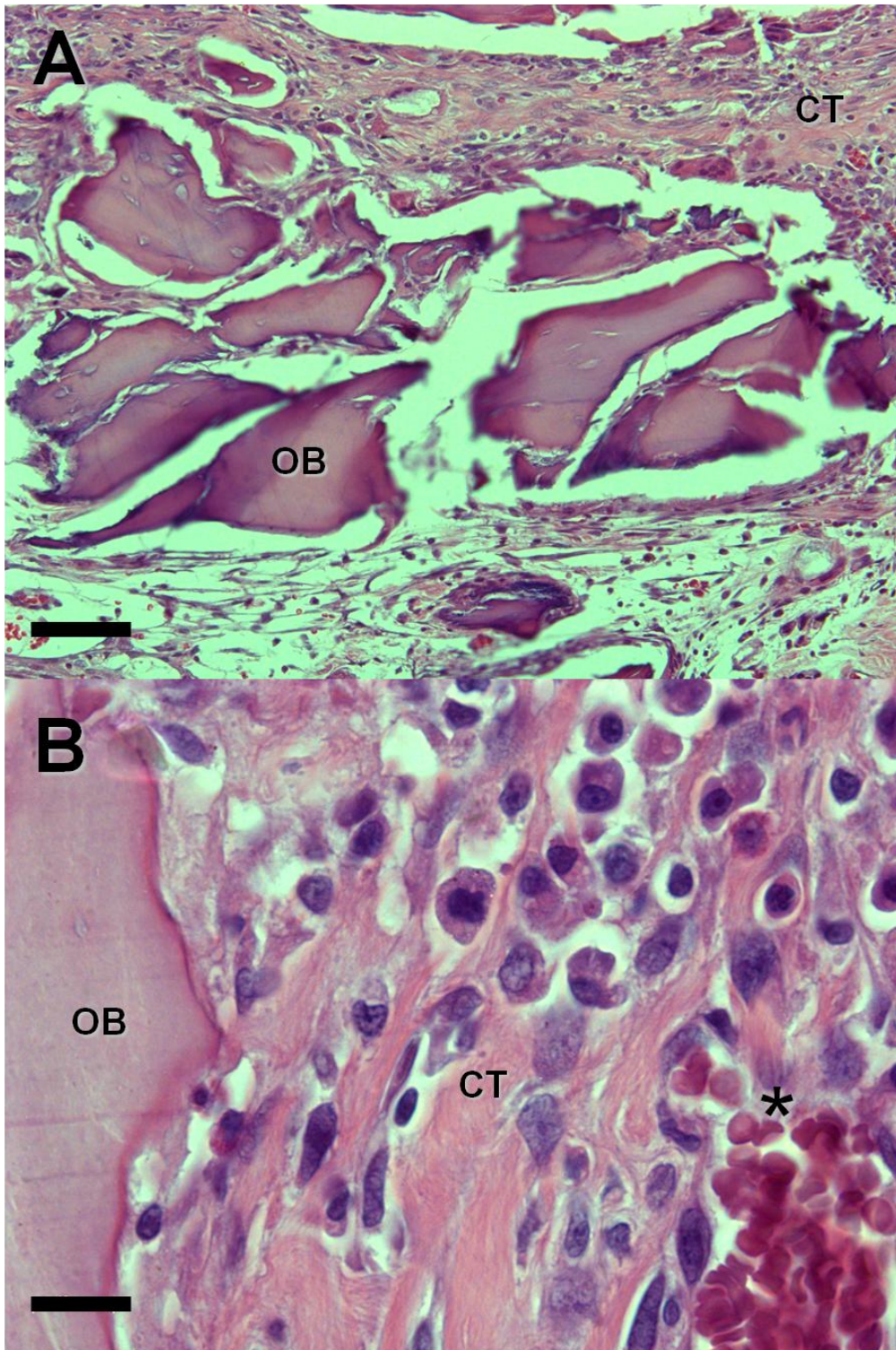


FIGURA 22

FIGURA 23: Calvária de ratos. Osso Autógeno – Parte 2.

A - 45 dias, grupo Osso Autógeno. Fragmentos de osso velho (OB) envoltos por tecido conjuntivo (CT) com maior matriz extracelular colagenosa e vasos sanguíneos (asterisco). Coloração: Hematoxilina-Eosina. A barra representa 50µm.

B - 45 dias, grupo Osso Autógeno. Detalhe de pequeno fragmento de osso velho (OB) e de vaso sanguíneo (asterisco) estimulando a formação de novo osso (NB), representando o processo de osteocondução. O espaço entre os fragmentos autógenos continua interposto por tecido conjuntivo (CT). Coloração: Hematoxilina-Eosina. A barra representa 50µm.

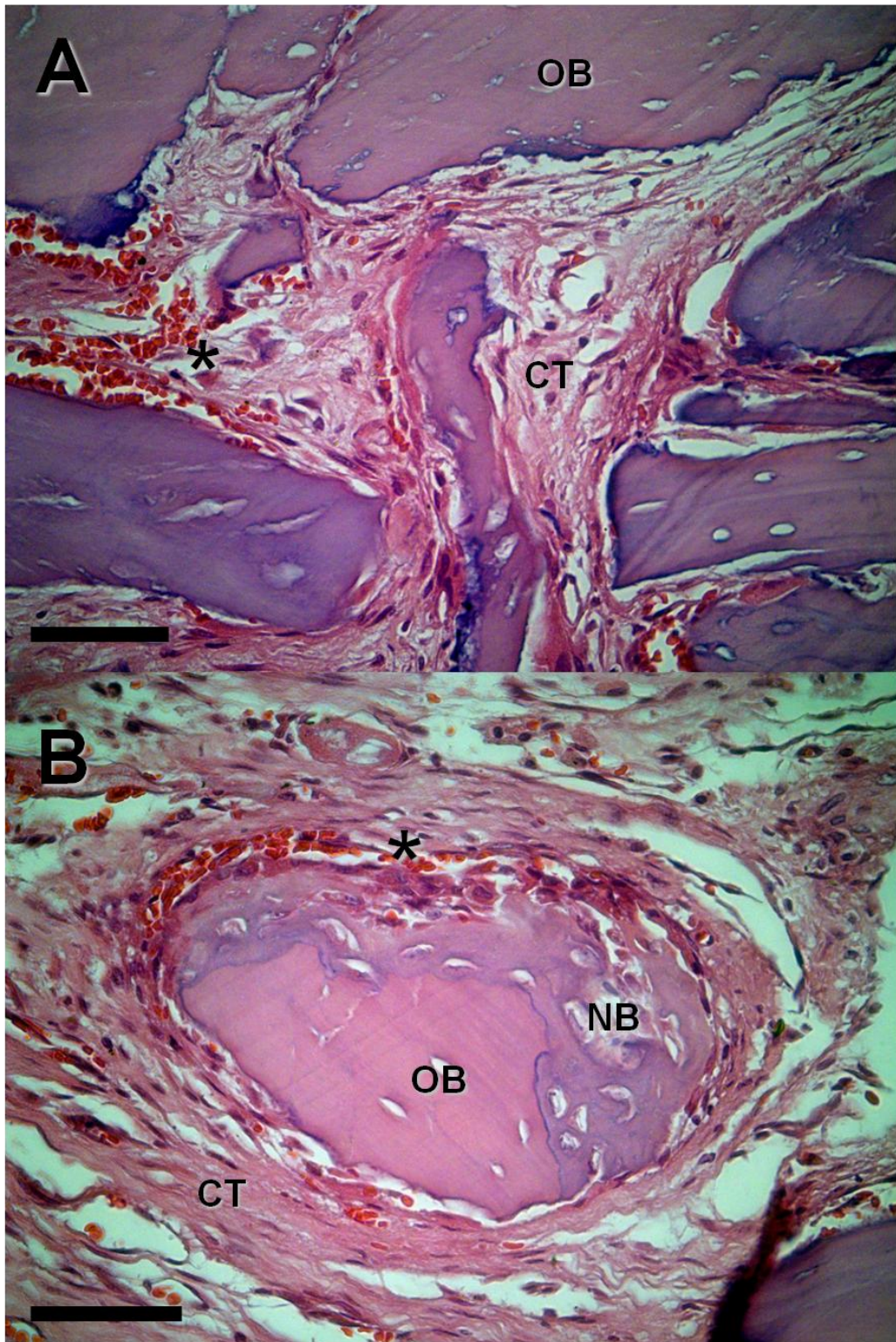


FIGURA 23

FIGURA 24: Calvária de ratos. β TCP:HA – Parte 1.

A - 15 dias, grupo β TCP:HA. Presença de tecido conjuntivo (CT) ainda com pouca matriz extracelular envolvendo o material teste (BCP) e foco de tecido ósseo neoformado (NB). Presença de vaso sanguíneo (asterisco) e de célula gigante multinucleada do tipo corpo estranho (seta) em proximidade ao BCP. Coloração: Hematoxilina-Eosina. A barra representa 30 μ m.

B - 15 dias, grupo β TCP:HA. Migração e adesão de células do tecido conjuntivo (CT) do animal hospedeiro ao material teste (BCP). Coloração: Hematoxilina-Eosina. A barra representa 10 μ m.

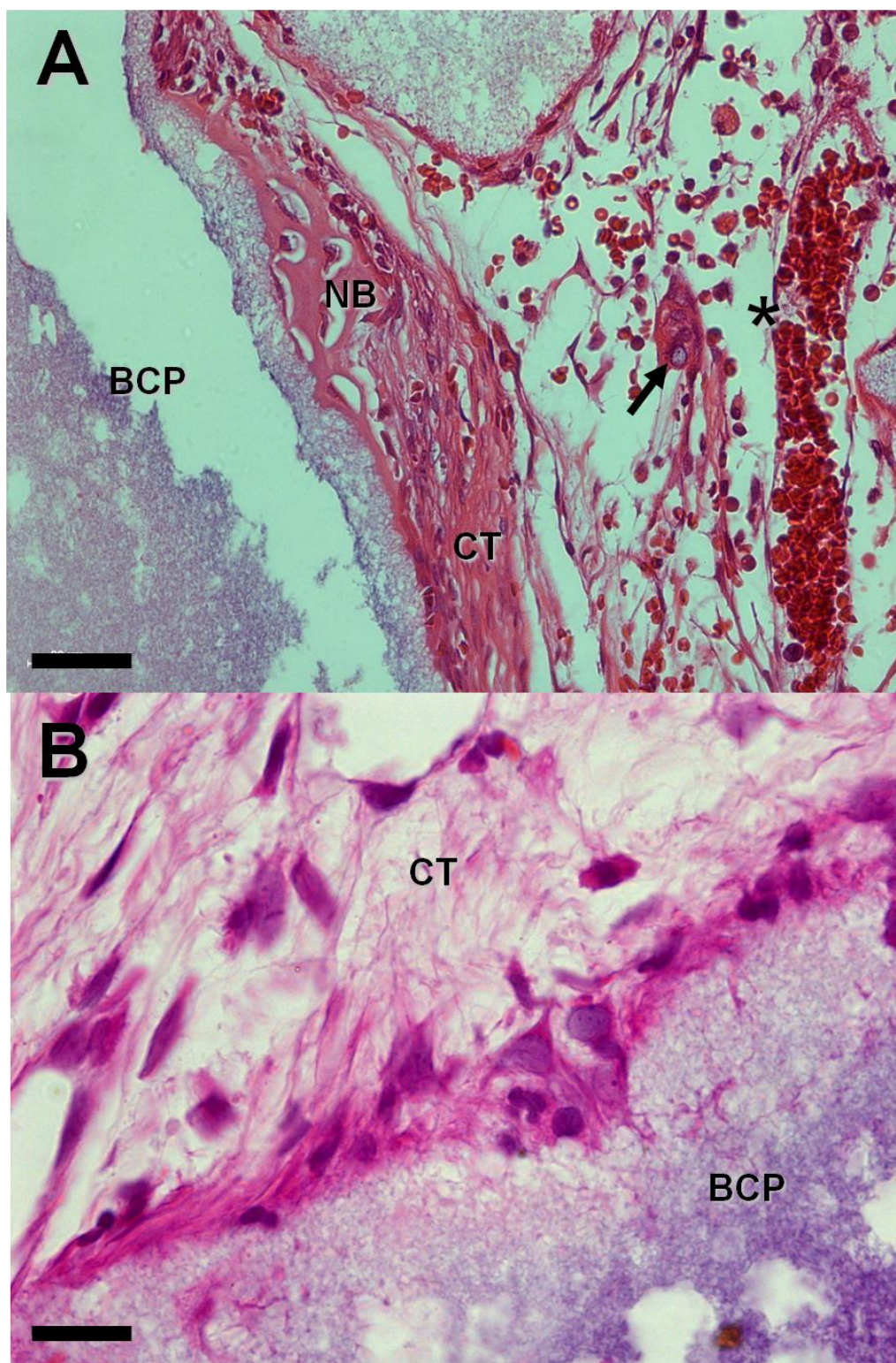


FIGURA 24

FIGURA 25: Calvária de ratos. β TCP:HA – Parte 2.

A - 45 dias, grupo β TCP:HA. Presença de osso neoformado (NB) em contato direto com o material (BCP), cujos grânulos se mantêm interpostos por tecido conjuntivo (CT) com vasos sanguíneos (asterisco). Coloração: Hematoxilina-Eosina. A barra representa 100 μ m.

B - 45 dias, grupo β TCP:HA. Detalhe da figura anterior. Presença de osso neoformado (NB) em contato direto com o material (BCP), cujos grânulos se mantêm interpostos por tecido conjuntivo (CT) com abundantes vasos sanguíneos (asteriscos). Notar numa extremidade acicular do BCP a presença de células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho (setas), envolvidas com o processo de substituição do material. Coloração: Hematoxilina-Eosina. A barra representa 30 μ m.

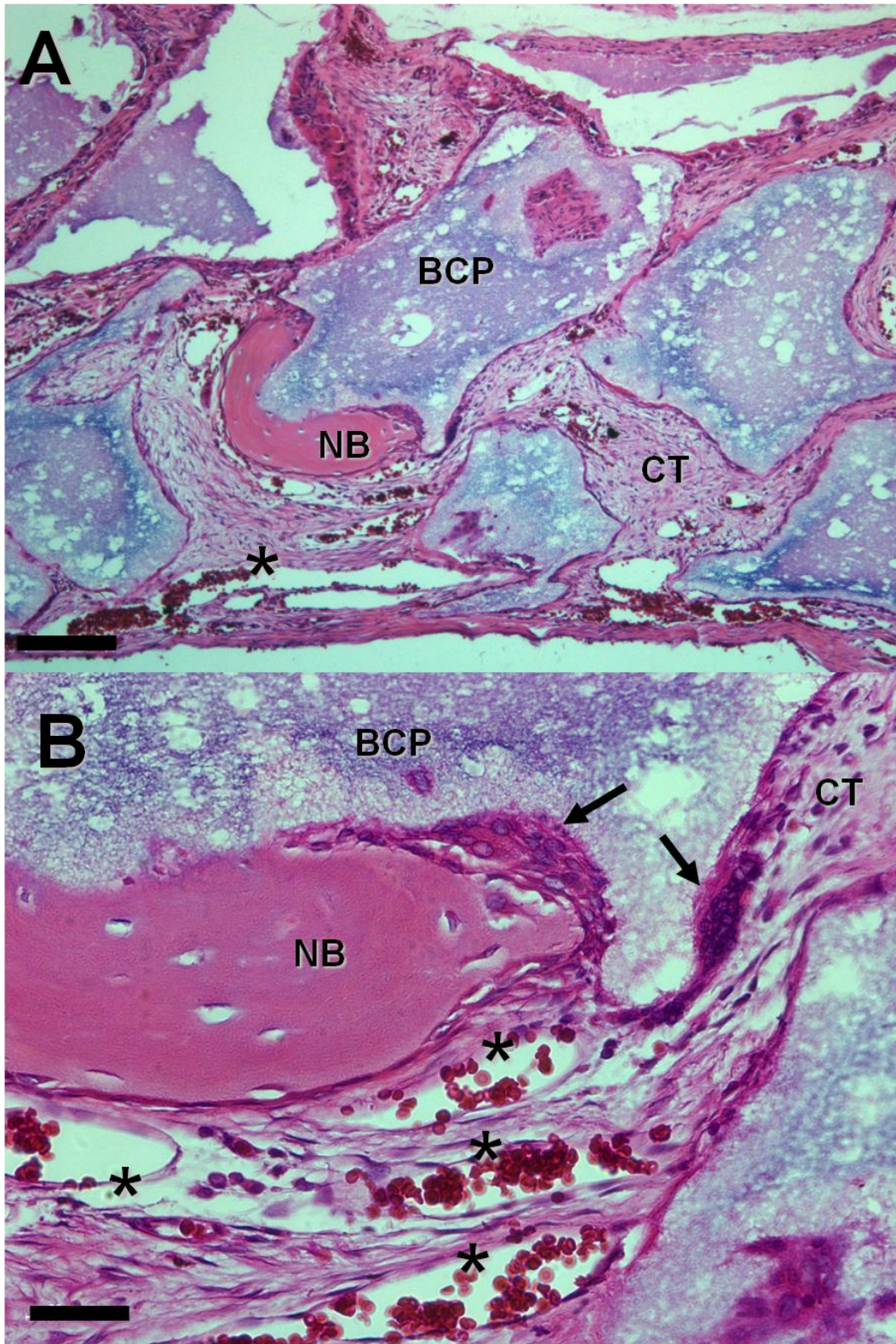


FIGURA 25

FIGURA 26: Calvária de ratos. β TCP:HA + células humanas – Parte 1.

A - 15 dias, grupo β TCP:HA com células. Presença de mono ou dupla camada de células com núcleo cuboidal a esférico e citoplasma hialino (setas) em íntimo contato com vasos sanguíneos (asteriscos) e aderidas ao material (BCP), cujos grânulos mantêm-se interpostos por tecido conjuntivo (CT). Coloração: Hematoxilina-Eosina. A barra representa 30 μ m.

B - 15 dias, grupo β TCP:HA com células. Detalhe da figura anterior. Presença de mono ou dupla camada de células com núcleo cuboidal a esférico e citoplasma hialino (setas) em íntimo contato com vasos sanguíneos (asteriscos) e aderidas ao material (BCP), cujos grânulos mantêm-se interpostos por tecido conjuntivo (CT). Coloração: Hematoxilina-Eosina. A barra representa 10 μ m.

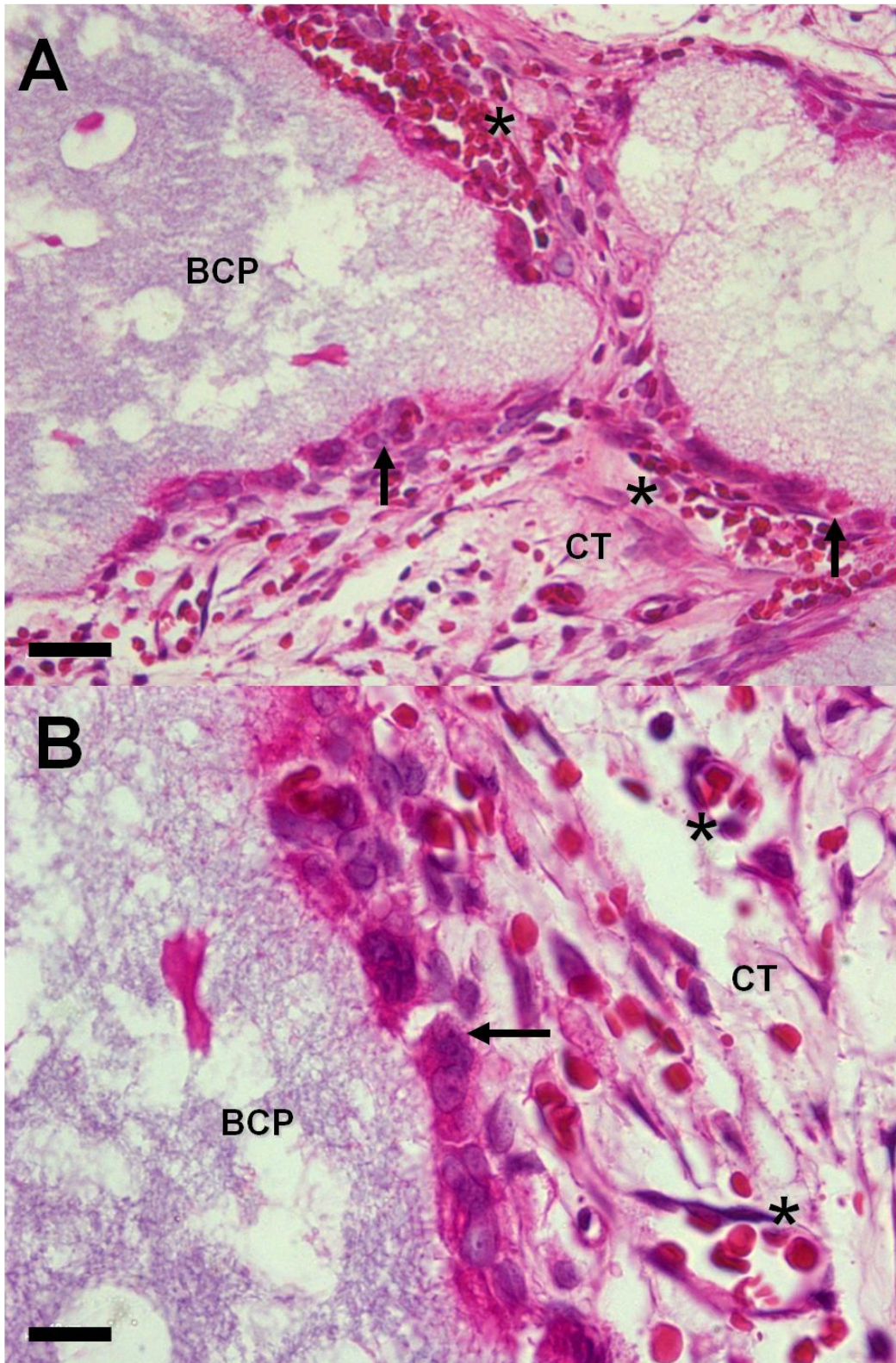


FIGURA 26

FIGURA 27: Calvária de ratos. β TCP:HA + células humanas – Parte 2.

A - 45 dias, grupo β TCP:HA com células. Presença de moderado osso neoformado (NB) ao redor do material (BCP), com interposição de seus grânulos por tecido conjuntivo (CT) e vasos sanguíneos (asterisco). Coloração: Hematoxilina-Eosina. A barra representa 300 μ m.

B - 45 dias, grupo β TCP:HA com células. Presença de intenso osso neoformado (NB) ao redor do material (BCP), com interposição de seus grânulos por tecido conjuntivo (CT) e vasos sanguíneos (asterisco). Coloração: Hematoxilina-Eosina. A barra representa 100 μ m.

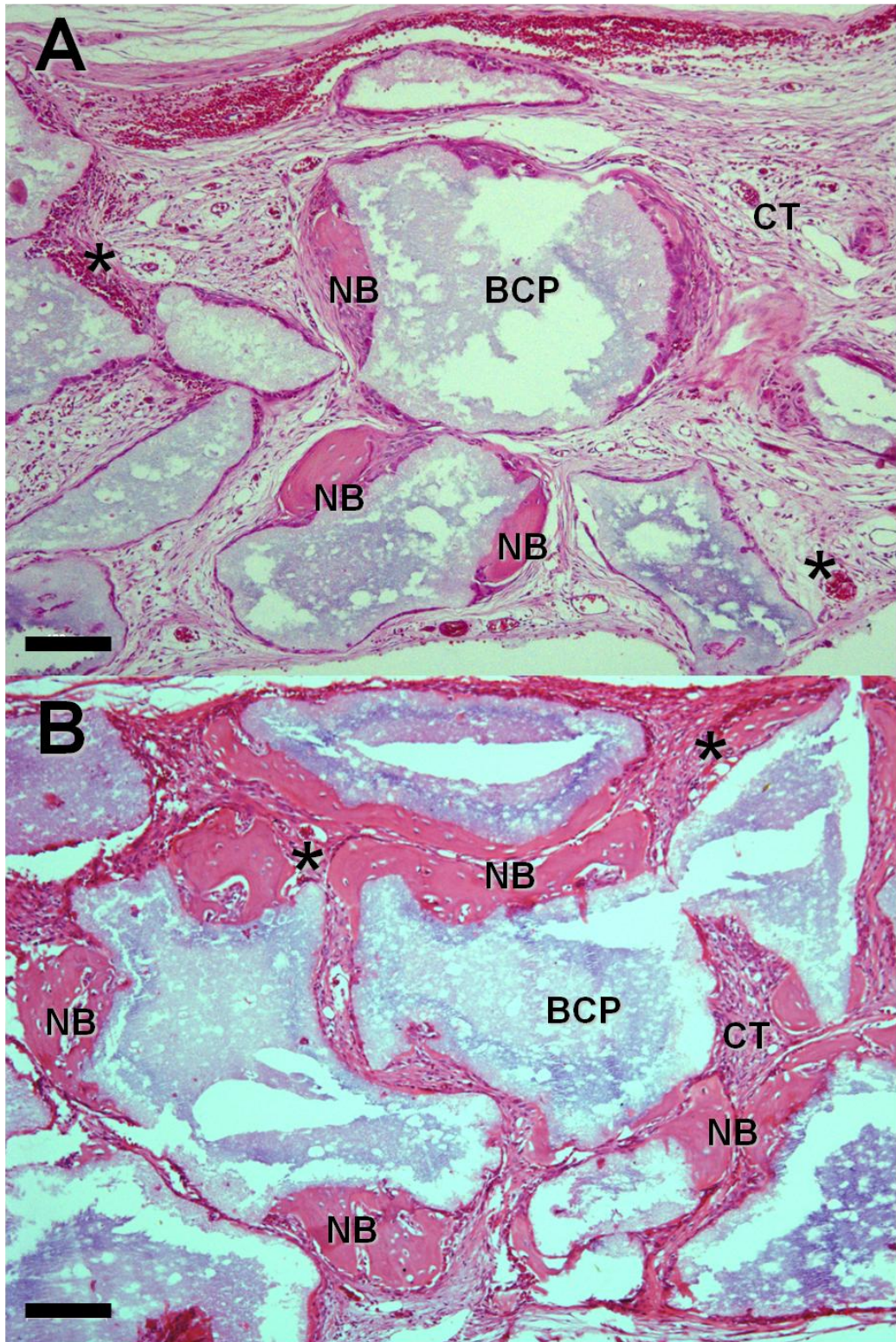


FIGURA 27

FIGURA 28: Calvária de ratos. β TCP:HA + células humanas – Parte 3.

A - 15 dias, grupo β TCP:HA com células. Interface célula-material, mostrando uma camada composta por células aderentes ao BCP, com núcleo cuboidal e citoplasma hialino intenso, e a presença de vasos sanguíneos (setas). Coloração: Hematoxilina-Eosina. A barra representa 10 μ m.

B - 15 dias, grupo β TCP:HA com células. Interface célula-material, mostrando mudança do fenótipo celular com camada composta por células aderentes ao BCP, de citoplasma basofílico intenso e em lacuna circular, sugerindo a diferenciação em osteoblastos, e a presença de vasos sanguíneos (setas) no tecido conjuntivo (CT). Coloração: Hematoxilina-Eosina. A barra representa 10 μ m.

C - 15 dias, grupo β TCP:HA com células. Interface célula-material, mostrando camada justaposta ao BCP de osteócitos (asterisco) aprisionados pela matriz mineralizada do osso neoformado (NB) e presença de vasos sanguíneos (setas) no tecido conjuntivo (CT). Coloração: Hematoxilina-Eosina. A barra representa 10 μ m.

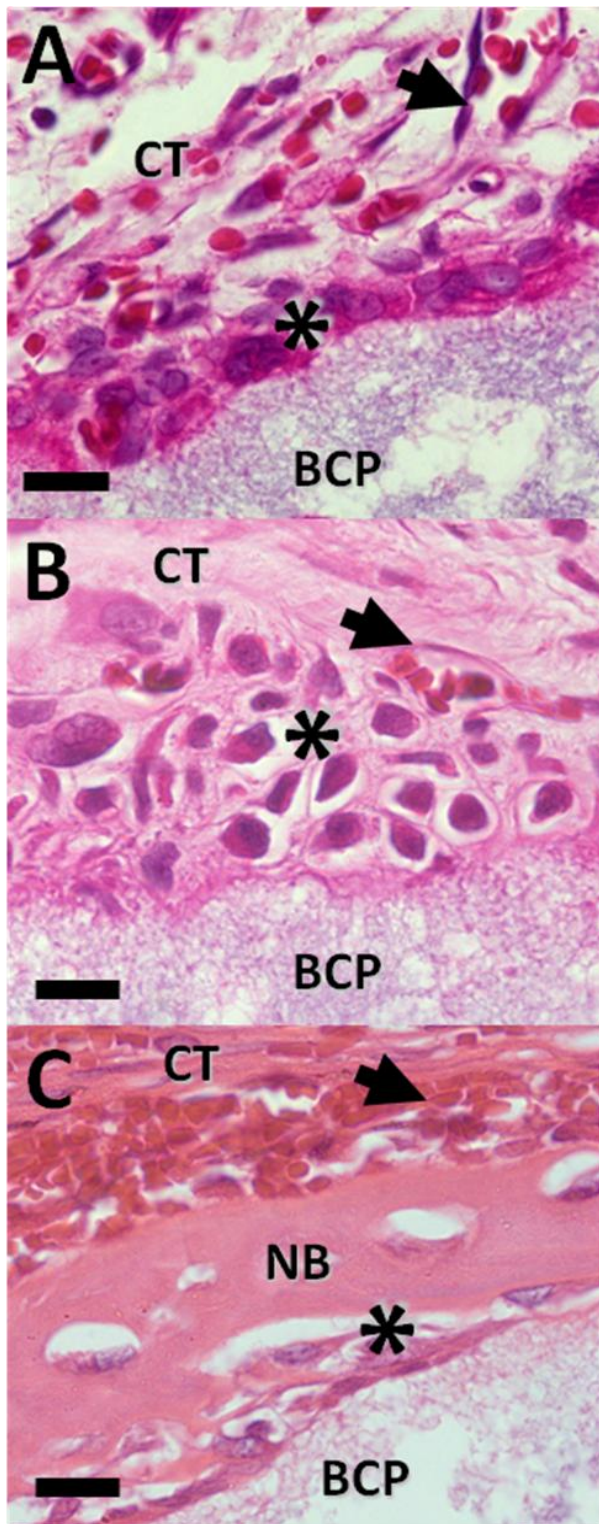


FIGURA 28

FIGURA 29: Calvária de ratos. β TCP:HA + células humanas – Parte 4.

A - 45 dias, grupo β TCP:HA com células. O material (BCP) ora foi circundado por células em formato cuboidal (CC) e formadoras de vasos sanguíneos (asterisco) semelhante a pericitos ora por células fibroblastóides (FC). Presença de tecido conjuntivo interpondo os grânulos da BCP. Coloração: Hematoxilina-Eosina. A barra representa 10 μ m.

B - 45 dias, grupo β TCP:HA com células. Presença de células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho (setas), tecido conjuntivo (CT) e vasos sanguíneos (asterisco) circundando o material (BCP). Coloração: Hematoxilina-Eosina. A barra representa 10 μ m.

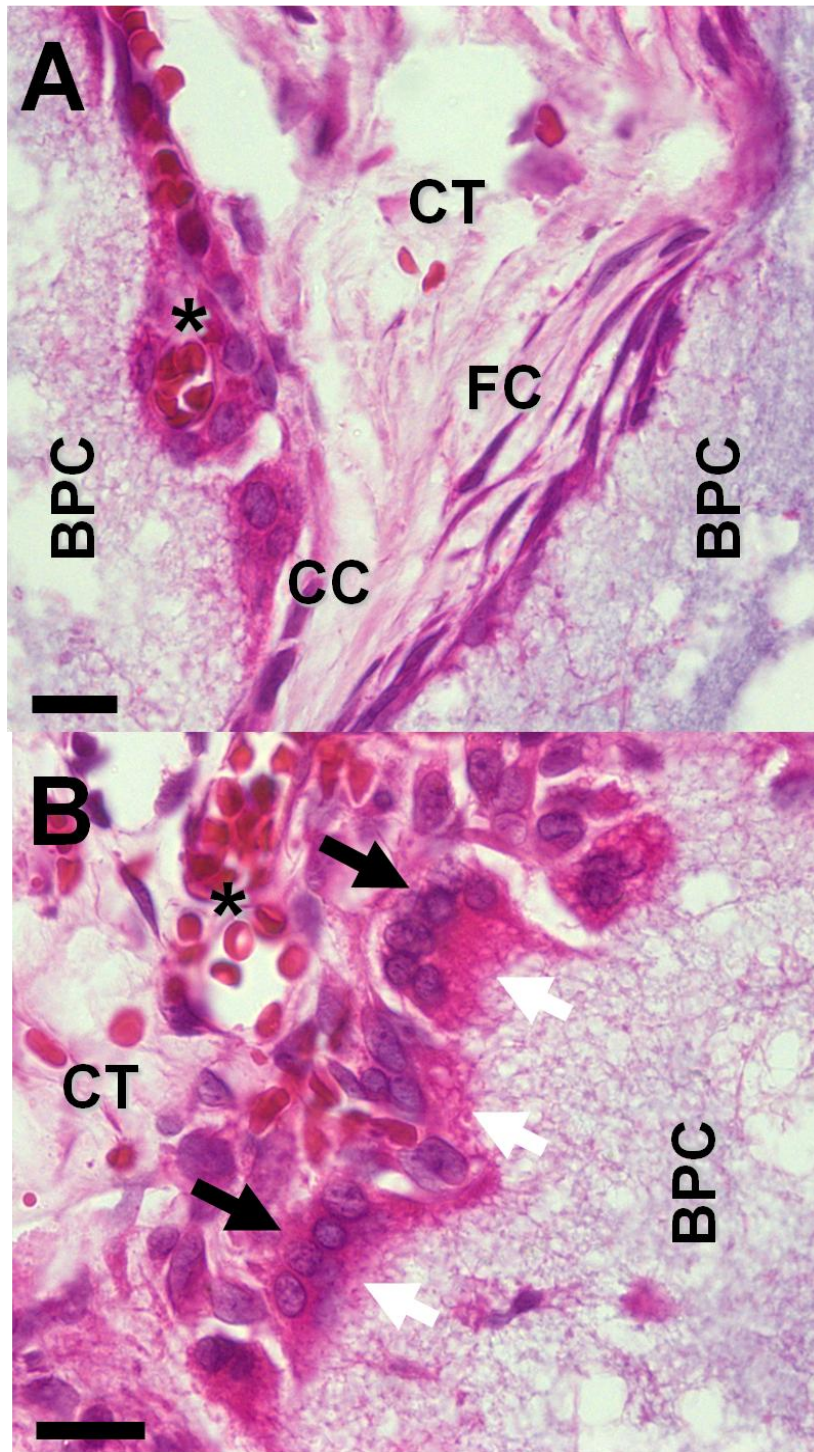


FIGURA 29

TABELA 2: Dados histomorfométricos de calvária de ratos.

Dados obtidos nos diferentes grupos experimentais, considerando como parâmetros: Novo Tecido Ósseo (NTO), Novo Tecido Conjuntivo (NTC), Novos Vasos Sanguíneos (NVS), Biomaterial (B), Outras Estruturas (OE) (osso velho + espaços vazios + infiltrado inflamatório + derme). Observação: osso velho foi considerado o biomaterial no Grupo 2.

	15 dias pós-enxerto					45 dias pós-enxerto				
	NTO	NTC	NVS	B	OE	NTO	NTC	NVS	B	OE
Grupo 1	2.60	36.20	0.40	0.00	60.80	2.20	49.60	1.20	0.00	47.00
	1.75	52.50	2.50	0.00	43.25	2.75	30.25	2.00	0.00	65.00
	0.75	44.25	3.75	0.00	51.25	3.20	38.00	1.00	0.00	57.80
	4.25	43.00	0.75	0.00	52.00	1.50	42.75	1.00	0.00	54.75
	1.50	38.75	5.25	0.00	54.50	1.50	37.75	0.75	0.00	60.00
Grupo 2	0.60	33.60	1.60	12.00	52.20	8.50	35.25	1.25	14.50	40.50
	5.00	27.00	2.67	28.33	37.00	2.00	32.75	3.50	11.50	50.25
	5.17	16.67	1.50	12.33	64.33	7.25	28.50	1.00	14.50	48.75
	3.25	23.75	1.50	5.50	66.00	5.60	35.20	1.20	13.20	44.80
	3.20	41.80	2.80	13.20	39.00	9.60	27.80	3.80	13.80	45.00
Grupo 3	0.80	33.20	3.80	23.20	39.00	4.20	28.60	1.00	20.00	46.20
	1.20	30.20	4.00	26.20	38.40	4.20	42.60	2.00	22.00	29.20
	5.60	41.20	2.00	28.40	22.80	1.00	36.80	0.60	19.80	41.80
	2.00	31.60	3.20	37.80	25.40	4.00	29.00	2.80	26.80	37.40
	5.60	34.80	2.60	27.00	30.00	5.80	31.00	0.60	25.40	37.20
Grupo 4	4.60	38.60	2.60	25.80	28.40	8.40	26.80	3.00	30.80	31.00
	1.40	41.80	3.60	25.40	27.80	4.20	34.80	3.40	26.60	31.00
	1.00	40.20	0.80	22.80	35.20	10.20	27.80	2.20	25.00	34.80
	0.20	33.20	1.40	29.80	35.40	7.00	26.20	6.40	24.60	35.80
	1.80	32.80	3.20	35.40	26.80	3.40	33.60	2.00	27.00	34.00

TABELA 2

GRÁFICO 4: Histomorfometria de calvária de ratos – Parte 1.

A - Densidade de volume de tecido ósseo neoformado nos diferentes grupos experimentais. As barras representam a média (\pm desvio padrão) dos dados obtidos na TABELA 2.

B - Densidade de volume de tecido conjuntivo neoformado nos diferentes grupos experimentais. As barras representam a média (\pm desvio padrão) dos dados obtidos na TABELA 2.

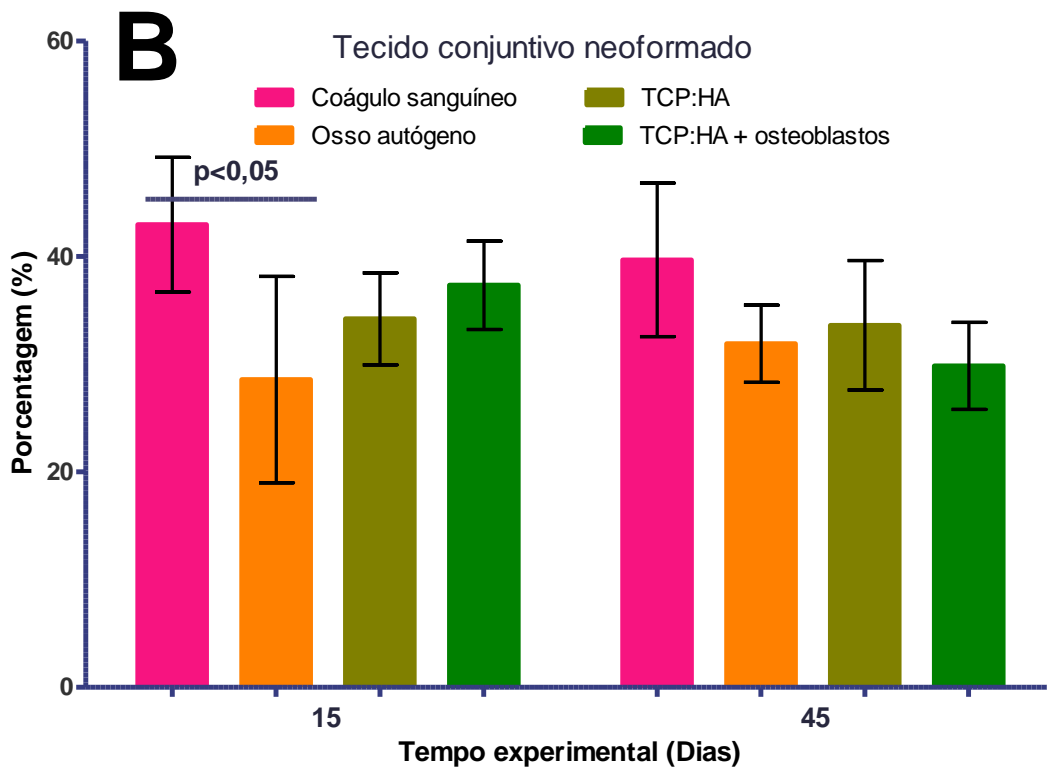
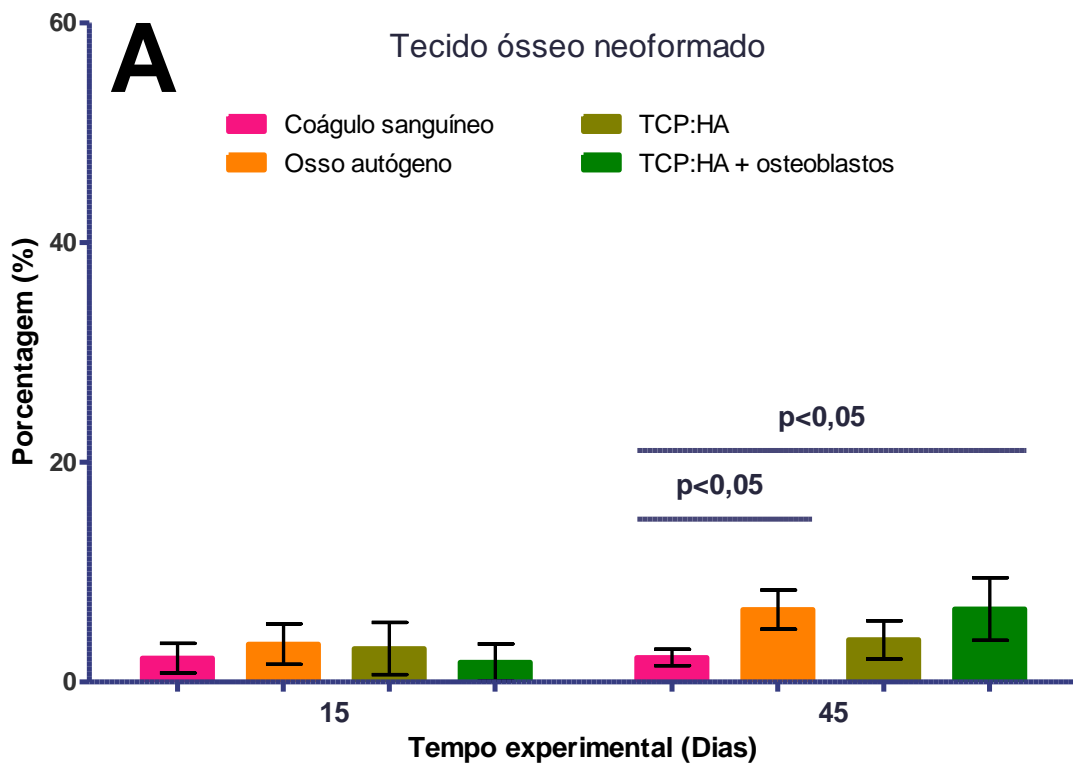


GRÁFICO 4

GRÁFICO 5: Histomorfometria de calvária de ratos – Parte 2.

A - Densidade de volume de vasos sanguíneos neoformados nos diferentes grupos experimentais. As barras representam a média (\pm desvio padrão) dos dados obtidos na Tabela 2.

B - Densidade de volume de biomaterial nos diferentes grupos experimentais. As barras representam a média (\pm desvio padrão) dos dados obtidos na Tabela 2.

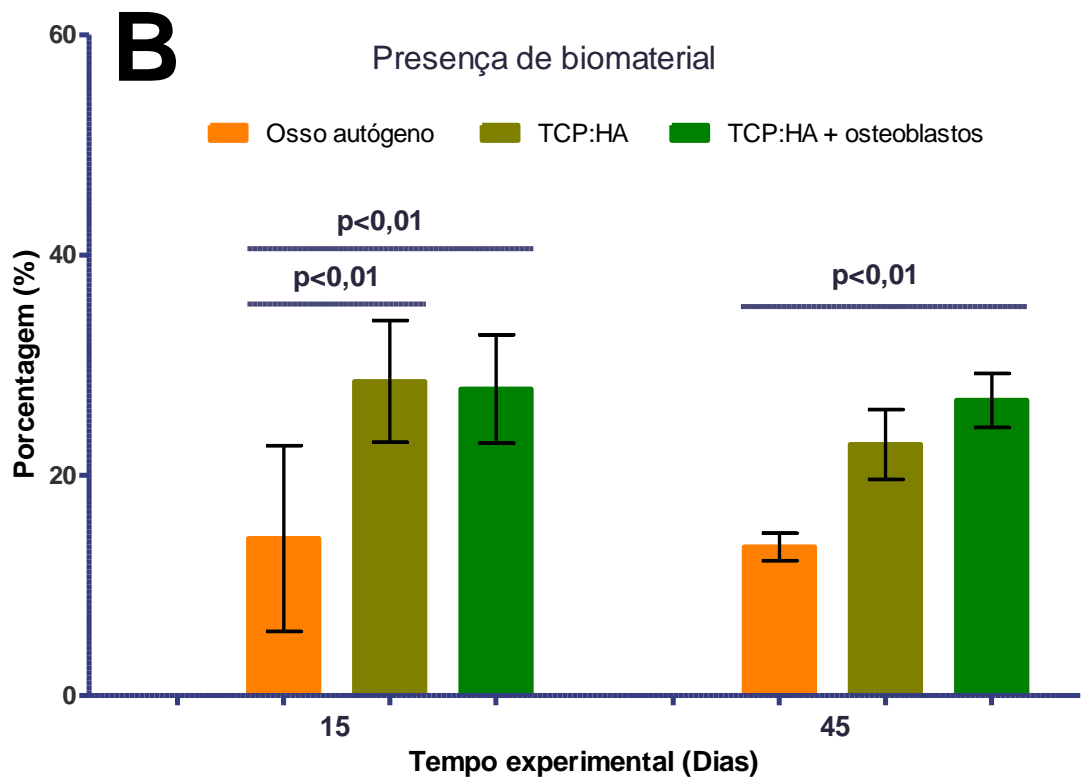
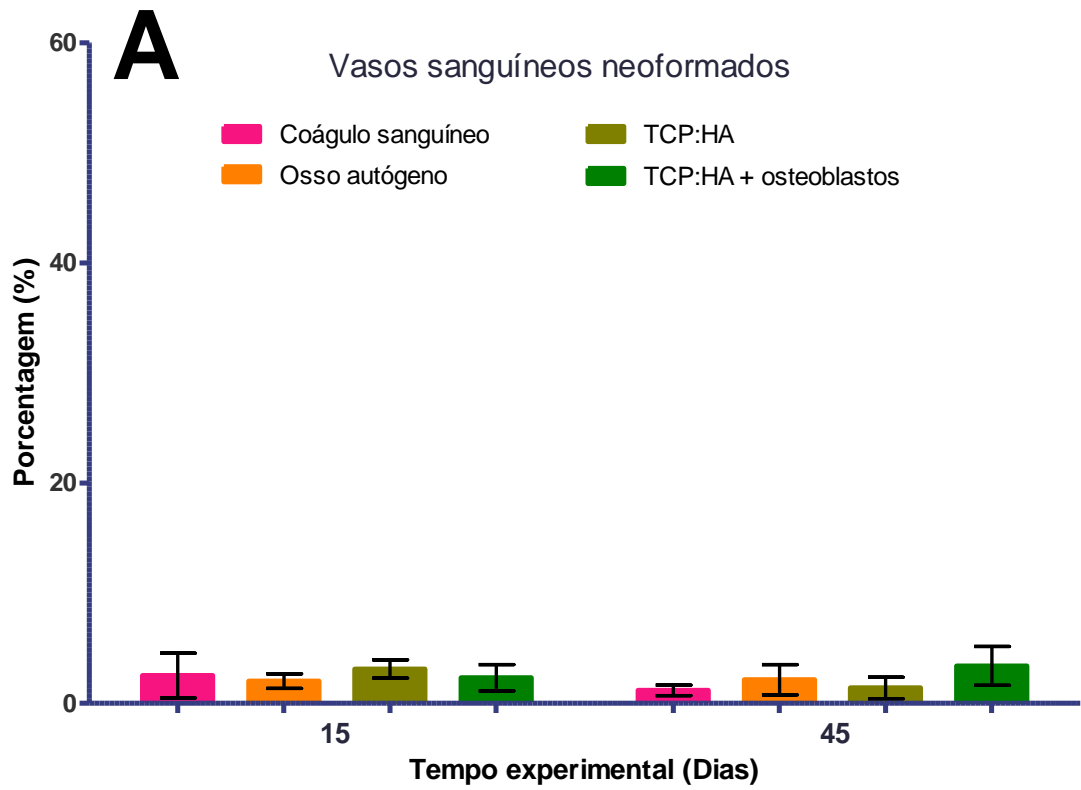


GRÁFICO 5

6. DISCUSSÃO

Como sugere a literatura, a formação óssea pode ser influenciada por parâmetros dependentes do hospedeiro, pelo biomaterial carreador e pelo comportamento das células doadoras em relação ao seu potencial osteogênico (KASTEN et al, 2005), representando uma combinação de efeitos físico-químicos, biológicos e biomecânicos no tecido (LANDIS & SILVER, 2002), como é discutido a seguir.

6.1. Caracterização físico-química:

A análise estrutural das amostras de BCP mostrou pelo seu difratograma por raios-X (DRX) e espectro por infravermelho transformado por Fourier (FTIR) composição similar a outras cerâmicas bifásicas (SANTOS et al., 2008; LE GEROS et al., 1991; SLÓSARCZYK et al., 1998).

As propriedades físico-químicas do presente material cerâmico bifásico composto por fosfato de cálcio é semelhante à estrutura natural do osso trabecular (BIGI et al., 1997), representando uma boa perspectiva como material osteosubstituto.

6.2. Caracterização biológica *in vitro*:

O comportamento celular pode ser influenciado por características do material, como topografia (ANSELME et al. 2006; SANTOS et al. 2005), tamanho da partícula (GRANDJEAN-LAQUERRIERE et al., 2005), cristalinidade (MAXIAN et al., 1998), composição química (SANTOS et al., 2009; BAXTER et al., 2002) e

porosidade (BIGNON et al., 2003), tendo esta última grande relevância nos estudos *in vitro* e *in vivo* para materiais osteosubstitutos (ANSELME & BIGERELLE, 2006 (a)).

Desde os últimos anos o cultivo de células não está mais limitado a sistemas em monocamadas. As células podem ser semeadas em arcabouços, que refletem com maior semelhança as estruturas tridimensionais dos tecidos. Pesquisas biológicas utilizando matrizes tridimensionais de colágeno oferecem novas oportunidades para o entendimento das interações recíprocas e adaptativas que ocorrem entre as células e a matriz em um ambiente que mimetiza um tecido biológico (ABBOTT, 2003). As culturas celulares tridimensionais permitem que os osteoblastos criem um micro-ambiente suficiente para preservar a competência osteogênica, além de atingir a completa maturação com depósito de matriz extracelular. Este micro-ambiente fisiológico produzido pelos próprios osteoblastos apresenta uma quantidade e uma qualidade de componentes endógenos, celular e extracelular com uma considerada interação célula-célula e célula-matriz extracelular (FERRERA et al., 2002).

Um biomaterial ideal deve permitir a adesão das células do paciente e manter-se como um arcabouço tridimensional necessário durante todo o processo de manipulação *in vitro* e, posterior à implantação, ao período de tempo necessário à substituição pelo tecido novo natural. Adicionalmente, devem apresentar: poros, para a infiltração de vasos sanguíneos; pontos de ancoragem e sinalização celular, que irão facilitar a adesão, proliferação e diferenciação das células progenitoras da linhagem correspondente; resistência mecânica, para sustentar o tecido neoformado; e uma razão de degradação compatível com a velocidade de deposição da

matriz e formação do novo tecido. (ANSELME, 2000; ANSELME & BIGERELLE (b), 2006).

As interações na interface entre biomaterial e organismo ocorrem nas seguintes fases (ANSELME, 2000): Adsorção, que ocorre assim que a superfície do material entra em contato com o fluido corpóreo e é regida por fatores presentes entre a superfície do biomaterial e o meio biológico (pH, composição iônica, temperatura, grupos funcionais das proteínas presentes no meio e tipo de substrato /efeito Vroman); Adesão, que promove a ligação de células ao substrato (biomaterial) através de proteínas com alta afinidade a superfície (MEYER, 2005) e moléculas de adesão (integrinas, superfamília da imunoglobulina, selectinas, fatores de crescimento, citocinas, ação hormonal), em especial no tecido ósseo uma seqüência proteica RGD (Arg-Gly-Asp) que gera quimiotaxia e fixação de receptores de integrinas de membrana celular (MEYER, 2005); e por fim, Espreadimento, proliferação e migração celulares, que estão diretamente ligadas à interface presente entre a superfície do material e a célula (ANSELME, 2000), propiciando um ambiente favorável à síntese de proteínas de adesão, crescimento celular e diferenciação celular, além de mecanismos biofísicos ligados a resposta celular em reação a superfície como efeitos mecânicos como diretos e indiretos, efeitos eletromecânicos, mecanismos de transporte molecular, eventos estes explicáveis pela transferência de carregamento da superfície do material para células, provocando efeitos estimulatórios (MEYER, 2005). No presente estudo, verificou-se a adesão, migração e espreadimento de células ósseas humanas, semelhante aos achados morfológicos de KASTEN et al. (2003) com células medulares interagindo com o β TCP poroso, conferindo ao material potencialidade de uso como osteosubstituto.

Estudo com cerâmicas densas monofásicas (β TCP e HA) mostrou que mais importante que as micro rugosidades de superfície do material para os osteoblastos humanos é o tipo de fosfato de cálcio que o compõe, influenciando nos processos de adesão (espalhamento, contatos focais e reorganização do citoesqueleto), proliferação e diferenciação celulares; HA estimula maior diferenciação em detrimento da proliferação celular após 7 dias, enquanto β TCP (SANTOS et al., 2009) que mantém a viabilidade e morfologia celulares em contato direto com os osteoblastos (AYBAR et al., 2004). Cerâmicas bifásicas com proporções inversas β TCP:HA (70/30 e 30/70) apresentaram melhores resultados na taxa de dissolução e resposta proliferativa *in vitro* utilizando razão 70:30 (HAHN et al., 2009), semelhante ao citocompatível BCP do presente estudo. No entanto, em co-cultura de macrófagos humanos e osteoblastos, partículas grandes de BCP (diâmetro: 2-6mm) podem promover maior liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF α e IL1 β) sugerindo suave potencial inflamatório, assim como a proporção de β TCP no material que mostra baixa viabilidade celular em curto tempo (100 ou 80% β TCP), enquanto razões mais baixas na cerâmica bifásica (20% ou 50%) obtiveram melhor adesão e viabilidade celulares após 14 dias (CURRAN et al., 2005). Material 3D composto por β TCP aloplástico e HA bovina mostrou adesão das células do perióstio que formaram camadas cobrindo toda a superfície do carreador, após 7 dias da semeadura (BECKER et al., 2010). Porosidades interconectantes no BCP com tamanhos de 15 μ m parecem ser mais efetivos para apoiar a invasão celular, sem derrubar a resistência mecânica (BIGNON et al., 2003). Nossos resultados positivos *in vitro* corroboram que o BCP pode promover a sobrevivência e adesão de células ósseas humanas.

6.3. Caracterização biológica *in vivo*:

Deve-se evidenciar que modelos animais têm sido utilizados, por várias décadas, em experimentos para testes de medicamentos, materiais cirúrgicos e técnicas de tratamentos. Foi usado um modelo animal criado em condições laboratoriais totalmente padronizadas, seguindo condições éticas pré-estabelecidas. Entretanto, os resultados obtidos em modelos animais devem ser analisados com cautela, visto que não podem ser extrapolados diretamente para os humanos, devendo-se salientar que animais de laboratório de pequeno porte apresentam maior capacidade regenerativa óssea do que humanos. A espécie *Rattus norvegicus albinus*, avaliada neste estudo, é muito utilizada em pesquisas e aceita na comunidade científica (BOHNING et al., 1999).

A biocompatibilidade dos materiais segue uma relação particularmente estreita com o ambiente de contato e a adesão das células na superfície. Por apresentarem estruturas vivas, os estudos de determinadas interações celulares com os diversos biomateriais possuem alguns inconvenientes, como o envolvimento de muitos e simultâneos parâmetros, os quais alguns não podem ser completamente controlados (ANSELME, 2000; ANSELME & BIGERELLE, 2006 (b)).

Segundo ANDERSON et al. (2008), reações teciduais do hospedeiro frente à implantação de um biomaterial incluem: inflamação aguda, inflamação crônica, reação de corpo estranho, tecido de granulação e fibrose. A inflamação aguda normalmente se resolve em menos de uma semana, dependendo da extensão do sítio de implantação, sendo caracterizada pela presença de células polimorfonucleares (neutrófilos em maioria) e poucas mononucleares (monócitos e linfócitos). Por este motivo, pode-se explicar a não visualização de células polimorfonucleares características deste estágio inicial no tempo experimental de 15

dias. A persistência do quadro de inflamação aguda depois do período de 3 semanas é indicativo de infecção, o que não foi constatado em nenhuma das amostras. A inflamação crônica tem sido usada para descrever a reação de corpo estranho, onde ocorre adsorção de proteínas, adesão de monócitos/macrófagos e fusão de macrófagos para formar células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho, estando estas células presentes na interface do biomaterial nas primeiras duas a quatro semanas pós-implantação. Outras células mononucleares também podem estar presentes, como linfócitos e alguns plasmócitos. Os materiais biocompatíveis apresentam resolução deste quadro em algumas semanas. O tecido de granulação é identificado pela presença de macrófagos, infiltração de fibroblastos e neovascularização, precedendo a formação do tecido a ser reparado. Macrófagos e células gigantes de corpo estranho são responsáveis pela degradação do biomaterial, visto que macrófagos são capazes de fagocitar partículas muito pequenas ($<5\mu\text{m}$) enquanto partículas maiores ($>10\mu\text{m}$) induzem formação de células gigantes de corpo estranho. Estes dois tipos celulares sobre a superfície do biomaterial também são importantes por controlarem o remodelamento de matriz extracelular, afetando a performance do material. Isto se dá através da secreção de citocinas inflamatórias, que tanto influenciam no comportamento de outros leucócitos (neutrófilos, monócitos e linfócitos) quanto nas células reparativas (fibroblastos, ceratinócitos, células endoteliais).

O BCP enxertado em tecido subcutâneo atingiu os critérios morfológicos para defini-lo como material biocompatível, segundo a ISO 10993-6 (2007). A persistência de células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho pode ser interpretada como a responsividade natural do sítio heterotópico e também sugerir o processo de biodegradação para partículas de BCP (ANDERSON et al., 2008). O grupo com

células ósseas humanas não exibiu intensa xenoreatividade devido a ausência de inflamação extensa e de morte celular ou processos degenerativos (ARINZEH et al., 2005; BURNS et al., 2010; BRUDER et al., 1998; HARRIS et al., 2003; KASTEN et al., 2008; MANKANI et al., 2004; SAKATA et al., 2006) de forma similar ao observado com outra cerâmica bifásica β TCP:HA na razão 80:20 carreadora de células mesenquimais humanas e enxertada em calvárias de camundongos (CHUANG et al., 2010). Estudo preliminar *in vivo* sugere que, isoladamente, o β TCP poderia ser um bom carreador de células assim como a HA (BOO et al., 2002). β TCP:HA na razão 80:20 associado a células mesenquimais humanas estimulou sua diferenciação óssea em modelo ectópico murino, onde após 6 semanas de implantação houve mineralização subcutânea em camundongos, taxa *in vivo* mais rápida frente a demais formulações cerâmicas bifásicas (ARINZEH et al., 2005), achado este não observado no presente estudo.

Interessantemente, 1 das amostras de 45 dias de BCP com células humanas enxertada em subcutâneo exibiu uma metaplasia conjuntiva, havendo formação de tecido cartilaginoso hialino na interface do tecido subcutâneo e do plano muscular dorsal subjacente. Este achado pode sugerir a ocorrência de: (i) um processo de desdiferenciação (TAGAMI et al., 2003), onde uma célula especializada (pré-osteoblasto) retorna ao estado de células-tronco mesenquimal, podendo assim ter se diferenciado diretamente em condroprogenitores e, conseqüentemente gerado foco de cartilagem madura; ou (ii) um mecanismo parácrino (CAPLAN et al., 2006), onde as células ósseas humanas enxertadas liberaram mediadores químicos para a diferenciação de células conjuntivas do próprio hospedeiro, tendo uma participação indireta no processo.

Muitos fatores devem ser levados em consideração na avaliação de estudos *in vivo*, como a quantidade e qualidade de osso formado num defeito ósseo, pois são influenciadas pela espécie e o tipo de animal utilizado no experimento, sua idade, a estabilidade do defeito, localização anatômica do defeito, tipo de osso, presença ou ausência de perióstio e da dura-máter (TAGA, 2004).

Neste trabalho, a região anatômica escolhida para a confecção do defeito foi à calvária. A utilização da calvária para a realização de defeito de tamanho crítico deveu-se a sua pobre vascularização e relativa deficiência de medula óssea com relação a outros ossos. Na díplioe da calvária do rato, a presença do osso esponjoso entre as corticais é muito discreta. Devido às características citadas, a calvária é o local de eleição para testes de biomateriais e de estudo de regeneração óssea guiada.

O tipo de incisão usada na calvária é também um aspecto de discussão, já que deve: facilitar a visão do leito cirúrgico, gerar um retalho de fácil manejo, manter o perióstio íntegro, conter o material em experimentação no local e facilitar a sutura. Nos trabalhos de BOSCH et al. (1995); BOHNING et al. (1999); DUPOIRIEUX et al. (2001) foi utilizada a incisão sobre a sutura sagital. Contudo, acredita-se que esse tipo de incisão seja contra-indicado, uma vez que a coaptação do retalho e do perióstio, dividido no meio pela incisão, fica no meio do defeito fazendo com que os dois processos de cicatrização, o do tegumento e o do osso, fiquem sobrepostos, possibilitando a interferência entre ambos e o desvirtuamento do processo de regeneração óssea. Também pode ocorrer, neste tipo de incisão, que a sutura seja realizada de forma inadequada, promova deslocamento do material ou ainda ocorra a deiscência, o que provocaria a exposição do material, com instalação de um processo infeccioso e, conseqüentemente, alteração no resultado final do reparo.

(JOVANOVIC et al., 1992; MURPHY, 1995; NOWZARI & SLOTS, 1995; LEKOVIC et al., 1998; WANG & CAROLL, 2001). Devido a estas considerações, optou-se por realizar uma incisão em meia-lua (SCHLIEPHAKE et al., 2004), deixando o retalho e o perióstio íntegro sobre o defeito, fazendo com que a sutura fique a uma distância segura, sem a possibilidade de deslocamento do material em experimentação.

Existe uma discordância na literatura quanto ao tamanho crítico dos defeitos em calvária de ratos. Com relação ao defeito ósseo de tamanho crítico, SCHMITZ & HOLLINGER (1986), definiram-no como um defeito cujas dimensões não permitem a regeneração espontânea do tecido ósseo durante o tempo de vida do animal, a não ser que algum tipo de material osteogênico, osteoindutor ou osteocondutor seja colocado dentro ou sobre este defeito. Tais defeitos, quando não tratados, são reparados por tecido conjuntivo fibroso, embora ocorra alguma neoformação óssea nas margens do defeito. SANDBERG et al. (1993); BOSCH et al. (1995) e MARDAS et al. (2002) consideraram crítico defeitos de 5 mm de diâmetro, enquanto que para DUPOIRIEUX et al. (2001) estes são defeitos de 6 mm e para DAHLIN et al. (1991) defeitos são 8 mm. A escolha de realizar defeitos bilaterais foi baseada em trabalhos anteriores (BOSCH et al. 1995, KHOJASTEH et al., 2008; SILVA et al., 2005; GRANDI, 2007; SANTOS, 2007), onde se mostrou favorável a comparação pareada dos grupos controle e teste. Entretanto, outros pesquisadores (DAHLIN et al., 1991; KOSTOPOULOS & KARRING, 2000; MARDAS et al., 2002) questionam este procedimento pela grande proximidade dos defeitos. Os defeitos confeccionados neste trabalho distaram 1mm um do outro e o local de análise do reparo foi o centro do defeito ósseo, independentemente da proximidade de suas bordas, dessa forma validando a metodologia proposta, que foi extremamente favorável pela minimização de vidas de animais experimentais utilizados. O defeito de tamanho ósseo em

calvária aqui usado atendeu aos requisitos descritos por BOSCH et al. (1995) para testes de regeneração óssea, ou seja: a) o tamanho mínimo do defeito ósseo experimental não deve ser menor do que o defeito ósseo que não se regenera, individualizado para a espécie; b) o sítio de implantação deve incluir preferencialmente osso cortical e medular; c) o defeito deve ser estável; d) o risco de fratura deve ser mínimo; e) o modelo animal deve permitir fácil acesso à análise histológica.

A regeneração óssea guiada em relação a defeitos de calvária aumenta a osteogênese (BOSCH, 1995), como ocorreu neste trabalho. Usando o material cerâmico BCP ou o osso autógeno, obteve-se melhor padrão de reparo de defeitos ósseos em relação ao coágulo sanguíneo, corroborando os achados da literatura (OKLUND, 1986; BOO et al., 2002; MAH et al., 2004).

Em relação à osteogênese, a porcentagem de formação óssea no interior do defeito 45 dias após a enxertia foi semelhante a BCP após 10 semanas de enxerto em calvária de ratos (6,9%, FLECKENSTEIN et al., 2006). BCP com diferentes razões implantadas em defeitos extensos de outros sítios como mandíbula canina (85 β TCP/15HA, FARIÑA et al., 2008) e fêmur ovino (25 β TCP/75HA, BODDE et al., 2007) também pode atuar como material osteocondutor. Neste caminho, pesquisas clínicas utilizando BCP combinada a partículas de osso autógeno em procedimentos do aumento do soalho do seio maxilar em 28 pacientes mostraram biocompatibilidade e osteocondutividade, representando uma boa opção como material substituto ósseo (ARTZI et al., 2008).

Dessa forma, comprova-se o potencial osteocondutor do material BCP (70 β TCP/30HA), verificada pela aposição de tecido ósseo neoformado diretamente na superfície dos grânulos do enxerto, assim como demais cerâmicas a base de

fosfato de cálcio (MORISHITA et al., 2006). Materiais de preenchimento em calvária de ratos Wistar favorecem o reparo dos defeitos ósseos devido a neoformação óssea seguindo as suas bordas e significativa formação óssea central comparada ao grupo controle (MARINS et al, 2004). O grande desafio das biocerâmicas sintéticas (Orthomatrix[®] HA) é a bioreabsorção, que comparada a apatitas naturais (BioOss), é muito lenta, embora apresente crescimento ósseo (também em menor escala) em defeitos cranianos de 4mm de ratos em 4 meses (MAH et al., 2004). Implante de cerâmica bifásica nacional (Genphos[®], 70%HA:30%βTCP) mostra osteocondução em defeitos femorais de ratos em 12 semanas (47,8±11,1%), similar a HA pura reabsorvível (Bionnovation[®], 39,9±5,4%), embora estes resultados ainda sejam pouco significativos em comparação ao osso autógeno (98±9,1%), padrão-ouro na reabilitação de defeitos ósseos (STEIN et al., 2009). Diferentes proporções HA:β-TCP têm sido usadas em situações experimentais (30:70) (HAHN et al., 2009) e clínicas (60:40, 70:30) (HAMADOUCHE et al., 2000), sem definição sobre a melhor até o momento diante dos resultados tão heterogêneos encontrados na literatura.

No campo do transplante celular usando biocerâmicas, fosfatos de cálcio sintéticos em diferentes proporções carreando células mesenquimais alógenas e enxertadas em subcutâneo de camundongos, mostraram, após 5 semanas, que tanto as proporções de HA:TCP, 60:40 e 20:80, exibiram osteogênese ectópica (HARRIS et al., 2003). Células humanas associadas à cerâmica HA:βTCP (60:40), formando em conjunto um “osteosferóide” com indução de meio osteogênico, quando enxertadas em camundongos e avaliadas após 8 semanas, mostram pequena formação óssea ectópica (BURNS et al., 2010). Também em modelo ectópico de camundongos, alterando a composição de HA:βTCP to 20% HA:80% βTCP e associando a células mesenquimais humanas, a osteoindução ocorreu na

taxa mais rápida *in vivo* (6 semanas) do que nas formulações de 100% HA estável, HA:βTCP (76:24, 63:37, 56:44) e 100% TCP biodegradável (12 semanas [ARINZEH et al., 2005]). Células estromais de medula óssea humana infantil quando associadas a HA/TCP com diferentes tamanhos de partícula (1,0-2,0mm, 0,5-1,0mm, 0,25-0,5mm, 0,1-0,25mm, 0,062-0,1mm, 0,044-0,062mm ou <0,044mm) mostraram em tecido subcutâneo de camundongos após 10 semanas de pós-operatório formação óssea ectópica, alcançando resultados significativos nas cerâmicas de tamanho 0,1-0,25mm, 0,25-0,5mm e 0,5-1,0mm (MANKANI et al., 2001), este último similar à granulometria encontrada na presente BCP. Diferentes padrões de células humanas medulares (de pacientes normais, com displasia fibrosa óssea, mielodisplasia ou anemia aplástica) associadas a HA/TCP, enxertadas em tecido subcutâneo de camundongos e avaliadas em 8 semanas, exibiram de forma similar extensa formação óssea (mais que metade da seção) em grande número de casos (amostra= 120 transplantes analisados) (MANKANI et al., 2004). A presença frequente na literatura de osteogênese ectópica, não encontrada em nosso estudo, se deve ao fato dos animais usados neste experimento não serem imunodeprimidos, o que restringe a resposta inflamatória e favorece as formas de reparo teciduais. Sobre a influência da porosidade na penetração e maturação das células osteocompetentes, KASTEN et al. (2008) apontou que βTCP com 65% de porosidade apresentava *in vitro* e *in vivo* em subcutâneo ancoragem de células estromais humanas e maior atividade osteogênica (processo de diferenciação indicado por atividade de fosfatase alcalina) do que nos grupos de 25% e 75% de porosidade.

Defeitos ósseos (Ø5 mm) bilaterais em calvária de ratos apresentaram no tratamento com βTCP e células mesenquimais humanas após 6 semanas um

padrão de reparo superior ao uso conjugado a PRP ou até mesmo maior que apatita (BioOss) associada à células ou PRP (KHOJASTEH et al., 2008). Em defeitos segmentares de rato, enxerto de HA/ β TCP associado a células mesenquimais autólogas promove neoformação óssea em 8 semanas (BRUDER et al., 1998). Estudo de longo prazo de transplantes de células humanas medulares e HA/TCP em defeito de calvária (Ø5 mm) de camundongos acompanhados por 96 semanas demonstraram mudança na sua morfologia mas não no conteúdo ósseo em 8 semanas, e nova formação óssea continuou a ocorrer nos transplantes ósseos, confirmados por marcação com tetraciclina, e o módulo elástico do enxerto ósseo se assemelhou ao osso normal da calvária (MANKANI et al., 2006).

Contudo, presença de foco de reação granulomatosa do tipo corpo estranho próxima ao enxerto deve ser avaliada com cautela. A presença de células gigantes multinucleadas e reação inflamatória do tipo corpo estranho são conhecidos marcadamente por inibir nova formação óssea (MARINS et al., 2004).

Foram observadas no Grupo 2 (autógeno), 3 (BCP) e 4 (BCP com células ósseas humanas) do estudo *in vivo* áreas típicas do processo de remodelação óssea, confirmando os achados descritos por HILL e ORTH (2000). Em 45 dias pós-cirurgia, pôde-se notar (i) algumas células multinucleadas (sugerindo osteoclastos ativados) reabsorvendo discretas áreas de matriz óssea mineralizada do enxerto autógeno ou da cerâmica bifásica, caracterizando a fase de reabsorção, (ii) células osteoprogenitoras ocupando espaço da lacuna de reabsorção (gerada devido a atividade osteoclástica anterior), na fase reversa; (iii) osteoblastos depositando matriz óssea nova, inicialmente não mineralizada (osteóide), preenchendo lacuna de reabsorção na fase formadora, e (iv) osteócitos aparecendo submersos no osteóide

em concomitância com células de revestimento da superfície (osteoblastos quiescentes), na fase de repouso.

Outro ponto relevante de discussão é o uso de cerâmicas como carreadores de fatores de crescimento (LE GEROS, 2003). Além do uso com células, o BCP (75 β TCP/25HA) também poderia ser usado como transportador de fatores de crescimento como rhBMP-2 no modelo de pericrânio de rato (ALAM et al., 2000) ou e rhBMP-4 em defeito craniano de rato, mostrando em 8 semanas um preenchimento de 75,9 \pm 2,3% do defeito com novo osso, valor 3,75 vezes superior ao encontrado usando apenas TCP e 9,25 vezes superior ao controle cirurgico (AHN et al., 2003), configurando uma nova perspectiva positiva em bioengenharia óssea.

7. CONCLUSÕES

De acordo com as condições experimentais propostas, foi possível concluir que:

1. O material β TCP:HA foi citocompatível;
2. O material β TCP:HA permitiu a adesão de células osteoprogenitoras humanas e consequente migração para dentro de seus poros.
3. O material β TCP:HA foi biocompatível, sozinho ou na presença de células osteoprogenitoras humanas
4. O material β TCP:HA foi osteocondutor, sozinho ou na presença de células osteoprogenitoras humanas
5. O material β TCP:HA sugere início de reabsorção, sozinho ou presença de células osteoprogenitoras humanas
6. O material β TCP:HA funciona como carreador de células ósseas humanas, constituindo possível ferramenta para propostas de terapia celular para defeitos extensos

8. REFERÊNCIAS

1. ABBOTT, A. Cell culture: Biology's new dimension. *Nature*, v. 424, n. 6951, p. 870-872, 2003.
2. AHN S.H., KIM C.S., SUK H.J., LEE Y.J., CHOI S.H., CHAI J.K. et al. Effect of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-4 with carriers in Rat Calvarial Defects. *Journal of Periodontology*, v. 74, n. 6, p. 787-797, 2003.
3. AKITA S., FUKUI M., NAKAGAWA H., FUJII T., AKINO K. Cranial bone defect healing is accelerated by mesenchymal stem cells induced by coadministration of bone morphogenetic protein-2 and basic fibroblast growth factor. *Wound Repair and Regeneration*, v. 12, n. 2, p. 252-259, 2004.
4. ALAM I., ASAHINA I., OHMAMIUDA K., ENOMOTO S. Comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics impregnated with rhBMP-2 as bone substitutes. *Journal of Biomedical Material Research*, v. 54, n.1, p. 129-138, 2001.
5. ALBREKTSSON T., JOHANSSON C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal*, v. 10, suplemento, p. S96-S101, 2001.
6. ANDERSON J.M., RODRIGUEZ A., CHANG D.T. Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in Immunology*, v. 20, n.2, p. 86-100, 2008.
7. ANSELME K. Osteoblasts Adhesion on Biomaterials. *Biomaterials*, v. 21, n. 7, p. 667-678, 2000.
8. ANSELME K., BIGERELLE M. (a) Effect of a gold-palladium coating on the long-term adhesion of human osteoblasts on biocompatible metallic materials. *Surface and Coating Technology*, v. 200, n. 22-23, p. 6325-6330, 2006.
9. ANSELME K., BIGERELLE M. (b). Modeling Approach in Cell/Material Interactions Studies. *Biomaterials*, v. 27, n. 8, p. 1187-1199, 2006.

10. ARINZEH T.L., TRAN T., MCALARY J., DACULSI G. A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. *Biomaterials*, v. 26, n. 17, p. 3631-3638, 2005.
11. ARNOLD U., LINDENHAYN K., PERKA C. In vitro-cultivation of human periosteum derived cells in bioresorbable polymer-TCP-composites. *Biomaterials*, v. 23, n.11, p. 2303-2310, 2002.
12. ARTZI Z., WEINREB M., CARMELI G., LEV-DOR R., DARD M., NEMCOVSKY C.E. Histomorphometric assessment of bone formation in sinus augmentation utilizing a combination of autogenous and hydroxyapatite/biphasic tricalcium phosphate graft materials: at 6 and 9 months in humans. *Clinical of Oral Implants Research*, v. 19, n.7, p. 686-692, 2008.
13. AYBAR B., BILIR A., AKÇAKAYA H., CEYHAN T. Effects of tricalcium phosphate bone graft materials on primary cultures of osteoblast cells in vitro. *Clinical of Oral Implants Research*, v. 15, n.1, p. 119-125, 2004.
14. BARBANTI S.H., ZAVAGLIA C.A. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.
15. BARRY F.P., MURPHY J.M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 36, n. 4, p. 568-584, 2004.
16. BAXTER L.C., FRAUCHIGER V., TEXTOR M., AP GWYNN I., RICHARDS R.G. Fibroblast and osteoblast adhesion and morphology on calcium phosphate surfaces. *European Cells and Materials*, v. 4, n. 1, p. 1-17, 2002.
17. BAXTER INTERNATIONAL. Annual report 1999, 1999. Disponível em: <http://www.baxter.com/downloads/investors/reports_and_financials/annual_report/1999/bax99ar_t.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2010.

18. BECKER S.T., DOUGLAS T., ACIL Y., SEITZ H., SIVANANTHAN S., WILTFANG J. et al. Biocompatibility of individually designed scaffolds with human periosteum for use in tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 21, n.4, p. 1255-1262, 2010.
19. BELOTI M.M., MARTINS W. JR, XAVIER S.P., ROSA A.L. In vitro osteogenesis induced by cells derived from sites submitted to sinus grafting with anorganic bovine bone. *Clinical of Oral Implants Research*, v. 19, n. 1, p. 48-54, 2008.
20. BENOIT D. S., DURNEY A.R., ANSETH K.S. The effect of heparin-functionalized PEG hydrogels on three-dimensional human mesenchymal stem cell osteogenic differentiation. *Biomaterials*, v. 28, n. 1, p. 66-77, 2007.
21. BENZAÏD W., TRIFFITT J.T., BLANCHAT C., OUDINA K., SEDEL L., PETITE H. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials*, v. 24, n. 14, p. 2497-2502, 2003.
22. BER S., TORUN-KÖSE G., HASIRCI V. Bone tissue engineering on patterned collagen films: an in vitro study. *Biomaterials*, v. 26, n. 14, p. 1977-1986, 2005.
23. BERTRAM H., MAYER H., SCHLIEPHAKE H. Effect of donor characteristics, technique of harvesting and in vitro processing on culturing of human marrow stroma cells for tissue engineered growth of bone. *Clinical Oral Implants Research*, v. 16, n. 5, p. 524-531, 2005.
24. BIGI A., COJAZZI G., PANZAVOLTA S., RIPAMONTI A., ROVERI N., ROMANELLO M. et al. Chemical and structural characterization of the mineral phase from cortical and trabecular bone. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 68, n. 1, p. 45-51, 1997.
25. BIGNON A., CHOUTEAU J., CHEVALIER J., FANTOZZI G., CARRET J.P., CHAVASSIEUX P. et al. Effect of micro- and macroporosity of bone substitutes on

their mechanical properties and cellular response. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 14, n. 12, p. 1089-1097, 2003.

26. BIOMET. Biomet Annual Report, Biomet Inc. Warsaw, Indiana, USA, 2004.

27. BODDE E.W.H., WOLKE J.G.C., KOWALSKI R.S.Z., JANSEN, J.A. Bone regeneration of porous β -tricalcium phosphate (Conduit TCP) and of biphasic calcium phosphate ceramic (Biosel) in trabecular defects in sheep. *Journal of Biomedical Material Research A*, v. 82, n. 3, p. 711-722, 2007.

28. BOHNING B.P., DAVENPORT W.D., JEANSONNE B.G. The effect of guided tissue regeneration on the healing of osseous defects in rat calvaria. *Journal of Endodontics*, v. 25, n. 2, p. 81-84, 1999.

29. BOO J.S., YAMADA Y., OKAZAKI Y., HIBINO Y., OKADA K., HATA K. et al. Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. *Journal of Craniofacial Surgery*, v. 13, n. 2, p. 231-243, 2002.

30. BOSCH G., MELSEN B., VANGERVIK K. Guided bone regeneration in calvarial bone defects using polytetrafluoroethylene membranes. *Cleft Palate Craniofacial Journal*, v. 32, n. 4, p. 311-317, 1995.

31. BRUDER S.P., JAISWAL N., RICALTON N.S., MOSCA J.D., KRAUS K.H., KADIYALA S. Mesenchymal Stem Cells in Osteobiology and Applied Bone Regeneration. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, n. 355S, p. S247-256, 1998.

32. BURNS J.S., RASMUSSEN P.L., LARSEN K.H., SCHRØDER H.D., KASSEM M. Parameters in 3D "Osteospheroids" of telomerized human mesenchymal (stromal) stem cells grown on osteoconductive scaffolds that predict in vivo bone forming potential. *Tissue Engineering Part A*, 2010 (*In press*)

33. CAHILL R.A., JONES O.Y., KLEMPERER M., STEELE A., MUELLER T.O., EL-BADRI N. et al. Replacement of recipient stromal/mesenchymal cells after bone marrow transplantation using bone fragments and cultured osteoblast-like cells. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, v. 10 n. 10, p. 709-717, 2004.
34. CAPLAN A. I, DENNIS J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 98, n. 5, p. 1076-1084, 2006.
35. CARVALHO A.C.C. Bioengenharia Tecidual: Uso de Células Tronco na Prática Médica, 2009. Disponível em: <<http://www.cggee.org.br/atividades/redirect.php?idProduto=2162>>. Acesso em: 20 jan. 2010
36. CASTRO-SILVA I.I., ZAMBUZZI W.F., GRANJEIRO J.M. Panorama atual do uso de xenoenxertos na prática odontológica. *Innovations Implant Journal Biomaterials and Esthetic*, v. 4, n. 3, p. 70-75, 2009.
37. CHAMBERLAIN G., FOX J., ASHTON B., MIDDLETON J. Mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features and potential for homing. *Stem Cells*, v. 25, n. 11, p. 2739-2749, 2007.
38. CHAMBERLAIN J.R., SCHWARZE U., WANG P.R., HIRATA R.K., HANKENSON K.D., PACE J.M. et al. Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. *Science*, v. 303, n. 5661, p. 1198-1201, 2004.
39. CHANG Y.J., SHIH D.T., TSENG C.P., HSIEH T.B., LEE D.C., HWANG S.M. Disparate Mesenchyme-Lineage Tendencies in Mesenchymal Stem Cells from Human Bone Marrow and Umbilical Cord Blood. *Stem Cells*, v. 24, n. 3, p. 679-685, 2006.
40. CHEN F., ZHOU Y., BARNABAS S.T., WOODRUFF M.A., HUTMACHER D.W. Engineering tubular bone constructs. *Journal of Biomechanics*, v. 40, suplemento 1, p. S73-S79, 2007.

41. CHUANG C.K., LIN K.J., LIN C.Y., CHANG Y.H., YEN T.C., HWANG S.M. et al. Xenotransplantation of Human Mesenchymal Stem Cells into Immunocompetent Rats for Calvarial Bone Repair. *Tissue Engineering Part A*, v. 16, n. 2, 479-488, 2010.
42. CLAUSEN C., HERMUND N.U., DONATSKY O., NIELSEN H. Characterization of human bone cells derived from the maxillary alveolar ridge. *Clinical of Oral Implant Research*, v. 17, n. 5, p. 533-540, 2006.
43. COMARCK D.H. *Ham Histologia*. 9. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1991.
44. CURRAN J.M., GALLAGHER J.A., HUNT J.A. The inflammatory potential of biphasic calcium phosphate granules in osteoblast/macrophage co-culture. *Biomaterials*, v. 26, n. 26, 5313-5320, 2005.
45. DAHLIN C., ALBERIUS P., LINDE A. Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. *Journal of Neurosurgery*, v. 74, n. 3, 487-491, 1991.
46. DAVIES J.E., HOSSEINI M.M. Histodynamics of endosseous wound healing. In: *Bone engineering*. Davies JE, editor. Toronto: Em Squared Inc., p. 1-14. 2000.
47. DE UGARTE D.A., MORIZONO K., ELBARBARY A., ALFONSO Z., ZUK P.A., ZHU M. et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues & Organs*, v. 174, n. 3, p. 101-9, 2003.
48. DONZELLI E., SALVADÈ A., MIMO P., VIGANÒ M., MORRONE M., PAPAGNA R. et al. Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: In vitro osteogenic differentiation. *Archives of Oral Biology*, v. 52, n. 1, p. 64-73, 2007.

49. DRAGOO J.L., SAMIMI B., ZHU M., HAME S.L., THOMAS B.J., LIEBERMAN J.R. et al. Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v. 85, n.5, p. 740-747, 2003.
50. DUCY P., SCHINKE T., KARSENTY G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*, v. 289, n. 5484, p. 1501-1504, 2000.
51. DUPOIRIEUX L., POURQUIER D., PICOT M.C., NEVES M. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. *International Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, v. 30, n. 1, p. 58-62, 2001.
52. ERBE E.M., MARX J.G., CLINEFF T.D., BELLINCAMPI L.D. Potential of an ultraporous beta-tricalcium phosphate synthetic cancellous bone void filler and bone marrow aspirate composite graft. *European Spine Journal*, v. 10, Suppl 2, p. S141-6, 2001.
53. FARIÑA N.M., GUZÓN F.M., PEÑA M.L., CANTALAPIEDRA A.G. In vivo behaviour of two different biphasic ceramic implanted in mandibular bone of dogs. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 19, n. 4, p. 1565-1573, 2008.
54. FERRERA D., POGGI S., BIASSONI C., DICKSON G.R., ASTIGIANO S., BARBIERI O. et al. Three-dimensional cultures of normal human osteoblasts: proliferation and differentiation potential in vitro and upon ectopic implantation in nude mice. *Bone*, v. 30, n. 5, p. 718-725, 2002.
55. FLECKENSTEIN K.B., CUENIN M.F., PEACOCK M.E., BILLMAN M.A., SWIEC G.D., BUXTON T.B. et al. Effect of a Hydroxyapatite Tricalcium Phosphate Alloplast on Osseous Repair in the Rat Calvarium. *Journal of Periodontology*, v. 77, n. 1, p. 39-45, 2006.
56. FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells. A manual of basic technique. 4. ed. U.S.A.: John Wiley & Sons, Cap. 8 e 9, 2000.

57. FUKUMOTO T., SPERLING J.W., SANYAL A., FITZSIMMONS J.S., REINHOLZ G.G., CONOVER C.A. et al. Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage*, v. 11, n. 1, p. 55-64, 2003.
58. GAASBEEK R.D., TOONEN H.G., VAN HEERWAARDEN R.J., BUMA P. Mechanism of bone incorporation of b-TCP bone substitute in open wedge tibial osteotomy in patients . *Biomaterials*, v. 26, n. 33, p. 6713-6719, 2009.
59. GONÇALVES F., HOHN A., GRANJEIRO J.M., SILVA I.I.C., TAGA R., CESTARI T.M. et al. Regeneração óssea em Odontologia com a utilização do substituto ósseo composto xenogênico Gen Mix. *ImplantNews*, v. 6, n. 4, p. 373-379, 2009.
60. GOSAIN A.K., RIORDAN P.A., SONG L., AMARANTE M.T., KALANTARIAN B., NAGY P.G. et al. A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part II. Bioengineering implants to optimize bone replacement in reconstruction of cranial defects. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 114, n. 5, p. 1155-1165, 2004.
61. GRANDI 2007. Análise histomorfométrica comparativa entre o cimento de α -TCP e os grânulos de β -TCP/HA no reparo ósseo de calotas cranianas de ratos. 2007. 77p. Dissertação (Mestrado em Odontologia), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
62. GRANDJEAN-LAQUERRIERE A., LAQUERRIERE P., LAURENT-MAQUIN D., GUENOUNOU M., PHILLIPS TM. The effect of physical characteristics of hydroxyapatite particles on human monocytes IL-18 production in vitro. *Biomaterials*, v. 25, n. 28, p. 5921-5927, 2004.

63. GRANJEIRO J.M., OLIVEIRA R.C., BUSTOS-VALENZUELA J.C., SOGAYAR M.C., TAGA R. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Brazilian Journal of Medicine and Biology Research*, v. 38, n. 10, p. 1463-1473, 2005.
64. GRONTHOS S., FRANKLIN D.M., LEDDY H.A., ROBEY P.G., STORMS R.W., GIMBLE J.M. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *Journal of Cellular Physiology*, v. 189, n. 1, p. 54-63, 2001.
65. HABIBOVIC P., KRUYT M.C., JUHL M.V., CLYENS S., MARTINETTI R., DOLCINI L. et al. Comparative in vivo study of six hydroxyapatite-based bone graft substitutes. *Journal of Orthopaedics Research*, v. 26, n. 10, p. 1363-1370, 2008.
66. HAHN B.-D., PARK D.-S., CHOI J.-J., RYU J., YOON W.-H., LEE B.-KUK. et al. Effect of the HA/ β -TCP Ratio on the Biological Performance of Calcium Phosphate Ceramic Coatings Fabricated by a Room-Temperature Powder Spray in Vacuum. *Journal of American Ceramics Society*, v. 92, n. 4, p. 793-799, 2009.
67. HAK D.J. The use of osteoconductive bone graft substitutes in orthopaedic trauma. *Journal of American Academy of Orthopaedic Surgery*, v. 15, n. 9, p. 525-36, 2007.
68. HAMADOUCHE M, SEDEL L. Ceramics in orthopaedics. *Journal of Bone and Joint Surgery*, v. 82, n. 8, p. 1095-1099, 2000.
69. HARDOUIN P., ANSELME K., FLAUTRE B., BIANCHI F., BASCOULERGUE G., BOUXIN B. Ingénierie tissulaire et maladies du squelette. *Revue du Rhumatisme*, v. 67, n.7, p. 498-504. 2000.
70. HARRIS C.T., COOPER L.F. Comparison of bone graft matrices for human mesenchymal stem cell-directed osteogenesis. *Journal of Biomedical Materials Research A*; v. 68, n. 4, p. 747-755, 2004

71. HARTMAN E.H.M., VEHOF J.W., SPAUWEN P.H., JANSEN J.A. Ectopic bone formation in rats: The importance of the carrier. *Biomaterials*, v. 26, n. 14, p. 1829-1835, 2005.
72. HIBI H., YAMADA Y., UEDA M., ENDO Y. Alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered osteogenic material. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, v. 35, n. 6, p. 551-555, 2006.
73. HILL P.A., ORTH M. Remodelação óssea. *Revista Dental Press Biologia Oral*, v. 1, n. 1, p. 67-75, 2000.
74. HOFMANN S., HAGENMÜLLER H., KOCH A.M., MÜLLER R., VUNJAK-NOVAKOVIC G., KAPLAN D.L. et al. Control of in vitro tissue-engineered bone-like structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds. *Biomaterials*, v. 28, n. 6, p. 1152-1162, 2007.
75. HORWITZ E.M., PROCKOP D.J., FITZPATRICK L.A., KOO W.W., GORDON P.L., NEEL M., et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature Medicine*, v. 5, n. 3, p. 309-313, 1999.
76. HOSSEINKHANI H., HOSSEINKHANI M., TIAN F., KOBAYASHI H., TABATA Y. Ectopic bone formation in collagen sponge self-assembled peptide–amphiphile nanofibers hybrid scaffold in a perfusion culture bioreactor. *Biomaterials*, v. 27, n. 29, p. 5089-5098, 2006.
77. HUTMACHER D.W., SITTINGER M. Periosteal Cells in Bone Tissue Engineering. *Tissue Engineering*, v. 9, suppl 1, p. S45-64, 2003.
78. IKEDA E., HIROSE M., KOTOBUKI N., SHIMAOKA H., TADOKORO M., MAEDA M. et al. Osteogenic differentiation of human dental papilla mesenchymal cells.

Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 342, n. 4, p. 1257-1262, 2006.

79. International Organization for Standardization. ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, 3rd edition, p. 1-34, Geneva: ISO, 2009.

80. International Organization for Standardization. ISO 10993-6. Biological evaluation of medical devices - Part 6: Tests for local effects after implantation, 2nd edition, p. 1-21, Geneva: ISO, 2007.

81. International Organization for Standardization. ISO 10993-12. Biological evaluation of medical devices - Part 12: Sample preparation and reference materials, 3rd edition, p. 1-17, Geneva: ISO, 2007.

82. JÄGER M., FESER T., DENCK H., KRAUSPE R. Proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured onto three different polymers in vitro. *Annals of Biomedical Engineering*, v. 33, n. 10, p. 1319-1332, 2005.

83. JÄGER M., KRAUSPE R. Antigen expression of cord blood derived stem cells under osteogenic stimulation in vitro. *Cell Biology International*, v. 31, n. 9, p. 950-957, 2007.

84. JIANG X., ZOU S., YE B., ZHU S., LIU Y., HU J. bFGF-Modified BMSCs enhance bone regeneration following distraction osteogenesis in rabbits. *Bone*, v. 46, n. 4, p. 1156-61, 2010.

85. JOVANOVIĆ S. A., SPIEKERMANN H., RICHTER E. J. Bone regeneration around titanium dental implants in dehiscence defect sites: a clinical study. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, v. 7, n. 2, p. 233-245, 1992.

86. JCPDS No. 09-0432: Hidroxyapatite. International Centre for Diffraction Data. Estados Unidos. Disponível em: <<http://www.icdd.com/>>. Acesso em: 12 out. 2010.
87. JCPDS No. 09-0169: Beta tricalcium phosphate. International Centre for Diffraction Data. Estados Unidos. Disponível em: <<http://www.icdd.com/>>. Acesso em: 12 out. 2010.
88. KADOWAKI A., TSUKAZAKI T., HIRATA K., SHIBATA Y., OKUBO Y., BESSHO K. et al. Isolation and characterization of a mesenchymal cell line that differentiates into osteoblasts in response to BMP-2 from calvariae of GFP transgenic mice. *Bone*, v. 34, n. 6, p. 993-1003, 2004.
89. KANCZLER J.M., GINTY P.J., WHITE L., CLARKE N.M., HOWDLE S.M., SHAKESHEFF K.M. et al. The effect of the delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenic protein-2 to osteoprogenitor cell populations on bone formation. *Biomaterials*, v. 31, n. 6, p. 1242-1250, 2010.
90. KANNO T., TAKAHASHI T., ARIYOSHI W., TSUJISAWA T., HAGA M., NISHIHARA T. Tensile mechanical strain up-regulates Runx2 and osteogenic factor expression in human periosteal cells: Implications for distraction osteogenesis. *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, v. 63, n. 4, p. 499-504, 2005.
91. KARTOSOGIANNIS V., NG K. W. Cell lines and primary cell culture in the study of bone cell biology. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 228, n. 1-2, p. 79-102, 2004.
92. KASTEN P., LUGINBÜHL R., VAN GRIENSVEN M., BARKHAUSEN T., KRETTEK C., BOHNER M. et al. Comparison of human bone marrow stromal cells seeded on calcium-deficient hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate and demineralized bone matrix. *Biomaterials*, v. 24, n. 15, p. 2593-2603, 2003.

93. KASTEN P., VOGEL J., LUGINBÜHL R., NIEMEYER P., TONAK M., LORENZ H. et al. Ectopic bone formation associated with mesenchymal stem cells in a resorbable calcium deficient hydroxyapatite carrier. *Biomaterials*, v. 26, n. 29, p. 5879-5889, 2005.
94. KASTEN P., BEYEN I., NIEMEYER P., LUGINBÜHL R., BOHNER M., RICHTER W. Porosity and pore size of beta-tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: an in vitro and in vivo study. *Acta Biomaterialia*, v. 4, n. 6, p. 1904-1915, 2008.
95. KATCHBURIAN E., ARANA, V. *Histologia e Embriologia Oral*. São Paulo: Medicina Panamericana Editora do Brasil. In: Tecidos mineralizados, p. 23-38, 1999.
96. KHOJASTEH A., ESLAMINEJAD M.B., NAZARIAN H. Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defects more than platelet-rich plasma. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, v. 106, n. 3, p. 356-362, 2008.
97. KIM J.W., KIM S.Y., PARK S.Y., KIM Y.M., KIM J.M., LEE M.H. et al. Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord. *Annals of Hematology*, v. 83, n. 12, p. 733-738, 2004.
98. KITAMURA S., OHGUSHI H., HIROSE M., FUNAOKA H., TAKAKURA Y., ITO H. Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Cells Cultured on Alumina Ceramics. *Artificial Organs*, v. 28, n. 1, p. 72-82, 2004.
99. KITO H., KITAKOJI T., TSUCHIYA H., MITSUYAMA H., NAKAMURA H., KATO M. et al. Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis – a preliminary result of three cases. *Bone*, v. 35, n. 4, p. 892-898, 2004.

100. KOBAYASHI H., GAO Y., UETA C., YAMAGUCHI A., KOMORI T. Multilineage differentiation of Cbfa1-deficient calvarial cells in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 273, n. 2, p. 630-636, 2000.
101. KOK I.J., PETER S.J., ARCHAMBAULT M., VAN DEN BOS C., KADIYALA S., AUKHIL I. et al. Investigation of allogeneic mesenchymal stem cell-based alveolar bone formation: preliminary findings. *Clinical Oral Implants Research*, v. 14, n. 4, p. 481-489, 2003.
102. KOSTOPOULOS L., KARRING T. Regenerations of the sagittal suture by GTR and its impact on growth of the cranial vault. *Journal of Craniofacial Surgery*, v. 11, n. 6, p. 553-561, 2000.
103. KOTOBUKI N., HIROSE M., TAKAKURA Y., OHGUSHI H. Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: Preparation and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Artificial Organs*, v. 28, n. 1, p. 33-39, 2004.
104. KREBSBACH P.H., MANKANI M.H., SATOMURA K., KUZNETSOV S.A., ROBEY P.G. Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells. *Transplantation*, v. 66, n. 10, p. 1272-1278, 1998.
105. KULTERER B., FRIEDL G., JANDROSITZ A., SANCHEZ-CABO F., PROKESCH A., PAAR C. et al. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics*, v. 8, n. 70, p. 1-15, 2007.
106. LAINO G., CARINCI F., GRAZIANO A., D'AQUINO R., LANZA V., DE ROSA A. et al. In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. *Journal of Craniofacial Surgery*, v. 17, n. 3, p. 511-515, 2006.

107. LANDIS W.J., SILVER F.H. The structure and Function of Normally Mineralizing Avian Tendons. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, v. 133, n. 4, p. 1135-1157, 2002.
108. LANGER R., VACANTI J.P. Tissue Engineering. *Science*, v. 260, n. 5110, p. 920-926, 1993.
109. LECHNER S., HUSS R. Bone engineering: combining smart biomaterials and the application of stem cells. *Artificial Organs*, v. 30, n. 10, p. 770-774, 2006.
110. LE GEROS R.Z.. Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine. *Monographs in Oral Science*, v. 15, S. Karger, Switzerland, 1991.
111. LE GEROS R.Z., LIN S., ROHANIZADEH R., MIJARES D., LE GEROS J.P. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 14, n. 3, p. 201-209, 2003.
112. LEKOVIC V., CAMARGO P.M., KLOKKEVOLD P.R., WEINLAENDER M., KENNEY E.B., DIMITRIJEVIC B. et al. Preservation of alveolar bone in extraction sockets using bioabsorbable membranes. *Journal of Periodontology*, v. 69, n. 9, p. 1044-1049, 1998.
113. LIN Y., WANG T., WU L., JING W., CHEN X., LI Z. et al. Ectopic and in situ bone formation of adipose tissue-derived stromal cells in biphasic calcium phosphate nanocomposite. *Journal of Biomedical Materials Research A*, v. 81, n. 4, p. 900-910, 2007.
114. LOGEART-AVRAMOGLU D., ANAGNOSTOU F., BIZIOS R., PETITE H. Engineering bone: challenges and obstacles. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 9, n. 1, p. 72-84, 2005
115. LU F.Z., FUJINO M., KITAZAWA Y., UYAMA T., HARA Y., FUNESHIMA N. et al. Characterization and gene transfer in mesenchymal stem cells derived from human

umbilical-cord blood. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 146, n. 5, p. 271-278, 2005.

116. MACKIE E.J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *International Journal of Biochemical and Cellular Biology*, v. 35, n. 9, p. 1301-1305, 2003.

117. MAH J., HUNG J., WANG J., SALIH E. The efficacy of various alloplastic bone grafts on the healing of rat calvarial defects. *European Journal of Orthodontics*, v. 26, n. 5, p. 475-482, 2004.

118. MANDARIM-DE-LACERDA C.A. Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 75, n. 4, p. 469-486, 2003.

119. MANKANI M.H., KUZNETSOV S.A., AVILA N.A., KINGMAN A., ROBEY P.G. Bone formation in transplants of human bone marrow stromal cells and hydroxyapatite-tricalcium phosphate: prediction with quantitative CT in mice. *Radiology*, v. 230, n. 2, p. 369-376, 2004.

120. MANKANI M.H., KUZNETSOV S.A., FOWLER B., KINGMAN A., ROBEY P.G. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: effect of carrier particle size and shape. *Biotechnology & Bioengineering*, v. 72, n. 1, p. 96-107, 2001.

121. MANKANI M.H., KUZNETSOV S.A., WOLFE R.M., MARSHALL G.W., ROBEY P.G. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: reconstruction of the mouse calvarium and mandible. *Stem Cells*, v. 24, n. 9, p. 2140-2149, 2006.

122. MARDAS N., KOSTOPULOS L., KARRING T. Bone and suture regeneration in calvarial defects by e-PTFE-membranes and demineralized bone matrix and the impact on calvarial growth: an experimental study in the rat. *Journal of Craniofacial Surgery*, v. 13, n. 3, p. 453-462, 2002.

123. MAREI M.K., SAAD M.M., EL-ASHWAH A.M., EI-BACKLY R.M., AL-KHODARY M.A. Experimental formation of periodontal structure around titanium implants utilizing bone marrow mesenchymal stem cells: a pilot study. *Journal of Oral Implantology*, v. 35, n. 3, p. 106-129, 2009.
124. MARINS L.V., CESTARI, T.M., SOTTOVIA A.D., GRANJEIRO J.M., TAGA R. Radiographic and histological study of perennial bone defect repair in rat calvaria after treatment with blocks of porous bovine organic graft material. *Journal Applied Oral Science*, v. 12, n. 1, p. 62-69, 2004.
125. MARKES S. C., HERMEY D. C. Principles of bone biology. In: *The structure and development of bone*. New York: Academic Press, p. 3-14, 1996.
126. MAXIAN S.H., DI STEFANO T., MELICAN M.C., TIKU M.L., ZAWADSKY J.P. Bone cell behavior on Matrigel-coated Ca/P coatings of varying crystallinities. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 40, n. 2, p. 171-179, 1998.
127. MEINEL L., HOFMANN S., BETZ O., FAJARDO R., MERKLE H.P., LANGER R. et al. Osteogenesis by human mesenchymal stem cells cultured on silk biomaterials: Comparison of adenovirus mediated gene transfer and protein delivery of BMP-2. *Biomaterials*, v. 27, n. 28, p. 4993-5002, 2006.
128. MEYER U., BÜCHTER A., WIESMANN H.P., JOOS U., JONES D.B. Basic reactions of osteoblasts on structured material surfaces. *European Cells & Materials*, v. 26, n. 9, p. 39-49, 2005.
129. MIURA M., GRONTHOS S., ZHAO M., LU B., FISHER L.W., ROBEY P.G. et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 10, p. 5807-5812, 2003.
130. MOORE D.C., CHAPMAN M.W., MANSKE D. The evaluation of a biphasic

- calcium phosphate ceramic for use in grafting long-bone diaphyseal defects. *Journal of Orthopaedics Research*, v. 5, n. 3, p. 356-365, 1987.
131. MORISHITA T., HONOKI K., OHGUSHI H., KOTOBUKI N., MATSUSHIMA A., TAKAKURA Y. Tissue Engineering Approach to the Treatment of Bone Tumors: Three Cases of Cultured Bone Grafts Derived From Patients' Mesenchymal Stem Cells. *Artificial Organs*, v. 30, n. 2, p. 115-121, 2006.
132. MRG. Latin America market for orthopedic devices. Millenium Research Group, Toronto, Canada, v. 130 (5S Suppl), p. 1500S-8S, 2004.
133. MURPHY K.G. Postoperative healing complications associated with Gore-Tex Periodontal Material. Part I. Incidence and characterization. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, v. 15, n. 4, p. 363-375, 1995.
134. NA K., KIM S.W., SUN B.K., WOO D.G., YANG H.N., CHUNG H.M. et al. Osteogenic differentiation of rabbit mesenchymal stem cells in thermo-reversible hydrogel constructs containing hydroxyapatite and bone morphogenic protein-2 (BMP-2). *Biomaterials*, v. 28, n. 16, p. 2631-2637, 2007.
135. NAKAHARA H., BRUDER S.P., HAYNESWORTH S.E., HOLECEK J.J., BABER M.A., GOLDBERG V.M. et al. Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone*, v. 11, n. 3, p. 181-188, 1990.
136. NEFUSSI J.R., BRAMI G., MODROWSKI D., OBOEUF M., FOREST N. Sequential expression of bone matrix proteins during rat calvaria osteoblast differentiation and bone nodule formation in vitro. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 45, n. 4, p. 493-503, 1997.
137. NEREM R.M. Tissue Engineering in the USA. *Medical & Biological Engineering & Computing*, v. 30, n. 4, complement, p. CE8-12, 1992.

138. NOTH U., OSYCZKA A.M., TULI R., HICKOK N.J., DANIELSON K.G., TUAN R.S. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 20, n. 5, p. 1060-1069, 2002.
138. NOWZARI H., SLOTS J. Microbiologic and clinical study of expanded polytetrafluorethylene membranes for guided bone regeneration around implants. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, v. 10, n. 1, p. 67-73, 1995.
140. NUSS K.M.R., RECHENBERG B.V. Biocompatibility Issues with Modern Implants in Bone - A Review for Clinical Orthopedics. *The Open Orthopaedics Journal*, v. 2, p. 66-78, 2008.
141. O'DRISCOLL S.W., SARIS D.B., ITO Y., FITZIMMONS J. The chondrogenic potential of periosteum decreases with age. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 19, n. 1, p. 95-103, 2001.
142. OKLUND, S. A., PROLO, D. J., GUTIERREZ, R. V. Quantitative comparisons of healing in cranial fresh autografts, frozen autografts and processed autografts, and allografts in canine skull defects. *Clinical Orthopaedics & Related Research*, n. 205, p. 269-291, 1986.
143. Organização das Nações Unidas (United Nations - Department of Economic and Social Affairs). *World Population Prospects - The 2008 Revision*. ONU: 2008. Disponível em: <<http://esa.un.org/unpd/wpp2008/index.htm>>. Acesso em: 20 jan. 2010.
144. OTAKI S., UESHIMA S., SHIRAISHI K., SUGIYAMA K., HAMADA S., YORIMOTO M. et al. Mesenchymal progenitor cells in adult human dental pulp and their ability to form bone when transplanted into immunocompromised mice. **Cell Biol Int**, v. 31, n. 10, p. 1191-1197, 2007.

145. PEATTIE R.A., RIEKE E.R., HEWETT E.M., FISHER R.J., SHU X.Z., PRESTWICH G.D. Dual growth factor-induced angiogenesis in vivo using hyaluronan hydrogel implants. *Biomaterials*, v. 27, n. 9, p. 1868-1875, 2006.
146. PRELE C.M., HORTON M.A., CATERINA P., STENBECK G. Identification of the molecular mechanisms contributing to polarized trafficking in osteoblasts. *Experimental Cell Research*, v. 282, n. 1, p. 24-34, 2003.
147. REDLICH A., PERKA C., SCHULTZ O., SPITZER R., HÄUPL T., BURMESTER G.R. et al. Bone engineering on the basis of periosteal cells cultured in polymer fleeces. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 10, n. 12, p. 767-772, 1999.
148. ROSADA C., JUSTESEN J., MELSVIK D., EBBESEN P., KASSEM M. The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells. *Calcif Tissue Int*, v. 72, n. 2, p. 135-142, 2003.
149. ROUABI M., GALLET O., CHAMPION E., DENTZER J., HARDOUIN P., ANSELME K. Influence of hydroxyapatite microstructure on human bone cell response. *Journal of Biomedical Materials Research A*, v. 78, n. 2, p. 222-235, 2006.
150. SAKATA Y. et al. Osteogenic potential of cultured human periosteum-derived cells – A pilot study of human cell transplantation into a rat calvarial defect model. *Journal of Craniomaxillofacial Surgery*, v. 34, n. 8, p. 461-465, 2006.
151. SANDBERG E., DAHLIN C., LINDE A. Bone regeneration by the osteopromotion technique using bioabsorbable membranes: an experimental study in rats. *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, v. 51, n. 10, p. 1106-14, 1993.
152. SANTOS S.C. Avaliação da utilização da esponja de chitosan/tricálcio fosfato no reparo de defeitos ósseos em calvária de ratos. 2007. 60p. Tese (Doutorado em Clínica Odontológica), Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba.

153. SANTOS E., LINHARES A.B.R., ROSSI A.M., FARINA M., SOARES G.A. Effects of surface undulations of biphasic calcium phosphate tablets on human osteoblast behavior. *Journal of Biomedical Materials Research A*, v. 74, n. 3, p. 315-324, 2005.
154. SANTOS E.A., FARINA M., SOARES G.A., ANSELME K. Surface energy of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate ceramics driving serum protein adsorption and osteoblast adhesion. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 19, n. 6, p. 2307-2316, 2008.
155. SANTOS E.A., FARINA M., SOARES G.A., ANSELME K. Chemical and topographical influence of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate surfaces on human osteoblastic cell behavior. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 89, n. 2, p. 510-520, 2009.
156. SCHANTZ J.T., BRANDWOOD A., HUTMACHER D.W., KHOR H.L., BITTNER K. Osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells in computer designed fibrin-polymer-ceramic scaffolds manufactured by fused deposition modeling. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 16, n. 9, p. 807-819, 2005.
157. SCHLIEPHAKE H., NEUKAM F.W., KLOSA D. Influence of pore dimension on bone ingrowth into porous hydroxyapatite blocks used as bone graft substitutes. A histometric study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 20, n. , p. 53-58, 1991.
158. SCHMELZEISEN R., SCHIMMING R., SITTINGER M. Making bone: implant insertion into tissue-engineered bone for maxillary sinus floor augmentation – a preliminary report. *Journal of Craniomaxillofacial Surgery*, v. 31, n. 1, p. 34-39, 2003.

159. SCHMITZ J.P., HOLLINGER J.O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, n. 205, p. 299-308, 1986.
160. SEEBACH C., HENRICH D., TEWKSBURY R., WILHELM K., MARZI I. Number and proliferative capacity of human mesenchymal stem cells are modulated positively in multiple trauma patients and negatively in atrophic nonunions. *Calcified Tissue International*, v. 80, n. 4, p. 294-300, 2007.
161. SILVA I.I.C., PIMENTEL-SOARES S., BITTENCOURT R.C., GRANJEIRO J.M. Natural bovine anorganic apatite and collagen presents osteoconductivity and contribute to bone repair of rat calvaria critical size defect. *Key Engineering Materials*, v. 396-398, p. 249-52, 2009.
162. SILVA R.V., CAMILLI J.A., BERTRAN C.A., MOREIRA N.H. The use of hydroxyapatite and autogenous cancellous bone grafts to repair bone defects in rats. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, v. 34, n. 2, p. 178-184, 2005.
163. SLÓSARCZYK A., BIAŁOSKÓRSKI J. Hardness and fracture toughness of dense calcium-phosphate-based materials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 9, n. 2, p. 103-108, 1998.
164. SOTTILE V., HALLEUX C., BASSILANA F., KELLER H., SEUWEN K. Stem cells characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone*, v. 30, n. 5, p. 699-704, 2002.
165. STEIN R.S., SILVA J.B., SILVA V.D. Estudo comparativo da neoformação óssea utilizando-se o enxerto autógeno e três substitutos: defeitos ósseos em ratos. *Revista Brasileira de Ortopedia*, v. 44, n. 4, p. 330-335, 2009.
166. STITZEL J.D., CORMIER J.M., BARRETTA J.T., KENNEDY E.A., SMITH E.P., RATH A.L. et al. Defining regional variation in the material properties of human rib

cortical bone and its effect on fracture prediction. *Stapp Car Crash Journal*, v. 47, p. 243-265, 2003.

167. TACHIBANA A., KANEKO S., TANABE T., YAMAUCHI K. Rapid fabrication of keratin-hydroxyapatite hybrid sponges toward osteoblast cultivation and differentiation. *Biomaterials*, v. 26, n. 3, p. 297-302, 2005.

168. TAGA M.L.L. Análise histológica e radiográfica do potencial osteopromotor da membrana de cortical óssea bovina no reparo de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de cobaia (*Cavia Porcellus*). 2004. 149p. Dissertação (Mestrado em Odontologia), Universidade de São Paulo, Bauru.

169. TAKAGI K., URIST M.R. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Annals of Surgery*, v. 196, n. 1, p. 100-109, 1982.

170. TAGAMI M., ICHINOSE S., YAMAGATA K., FUJINO H., SHOJI S., HIRAOKA M. et al. Genetic and ultrastructural demonstration of strong reversibility in human mesenchymal stem cells. *Cell & Tissue Research*, v. 312, n. 1, p. 31-40, 2003.

171. TASSO R., FAIS F., REVERBERI D., TORTELLI F., CANCEDDA R. The recruitment of two consecutive and different waves of host stem/progenitor cells during the development of tissue-engineered bone in a murine model. *Biomaterials*, v. 31, n. 8, p. 2121-2129, 2010.

172. Tian X.F., Heng B.C., Ge Z., Lu K., RUFAlhah A.J., Fan V.T. et al. Comparison of osteogenesis of human embryonic stem cells within 2D and 3D culture systems. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, v. 68, n. 1, p. 58-67, 2008.

173. TORIGOE I., SOTOME S., TSUCHIYA A., YOSHII T., MAEHARA H., SUGATA Y. et al. Bone Regeneration with Autologous Plasma, Bone Marrow Stromal Cells,

and Porous beta-Tricalcium Phosphate in Nonhuman Primates. *Tissue Engineering Part A*, v. 15, n. 7, p. 1489-99, 2009.

174. TURHANI D., WATZINGER E., WEISSENBÖCK M., YERIT K., CVIKL B., THURNHER D. et al. Three-dimensional composites manufactured with human mesenchymal cambial layer precursor cells as an alternative for sinus floor augmentation: An in vitro study. *Clinical Oral Implants Research*, v. 16, n. 4, p. 417-424, 2005.

175. TULI R., TULI S., NANDI S., WANG M.L., ALEXANDER P.G., HALEEM-SMITH H. et al. Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone. *Stem Cells*, v. 21, n. 6, p. 681-693, 2003.

176. UEDA M., TOHNAI I., NAKAI H. Tissue engineering research in oral implant surgery. *Artificial Organs*, v. 25, n. 3, p. 164-171, 2001.

177. UEMURA T., DONG J., WANG Y., KOJIMA H., SAITO T., IEJIMA D. et al. Transplantation of cultured bone cells using combinations of scaffolds and culture techniques. *Biomaterials*, v. 24, n. 13, p. 2277-2286, 2003.

178. URIST M.R., McLEAN F.C. Recent advances in the physiology of bone. PART I. *Journal of Bone Joint Surgery*, v. 45, p. 1305-1313, 1963. apud DAHLIN, C., ALBERIUS, P., LINDE, A. Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. *Journal of Neurosurgery*, v. 74, n. 3, p. 487-491, 1991.

179. VALLET- REGÍ M. Introduction to the World of Biomaterials. *Anales de Química International Edition*, v. 93, suplemento, p. S6-S14, 1997.

180. VAN DINTHER M., VISSER N., DE GORTER D.J., DOORN J., GOUMANS M.J., DE BOER J. et al. ALK2 R206H Mutation Linked to Fibrodysplasia Ossificans Progressiva Confers Constitutive Activity to the BMP Type I Receptor and Sensitizes

Mesenchymal Cells to BMP-Induced Osteoblast Differentiation and Bone Formation.

Journal of Bone and Mineral Research, v. 25, n. 6, p. 1208-1215, 2010.

181. VELARDI F., AMANTE P.R., CANIGLIA M., DE ROSSI G., GAGLINI P., ISACCHI G. et al. Osteogenesis induced by autologous bone marrow cells transplant in the pediatric skull. Child's Nervous System, v. 22, n. 9, p. 1158-1166, 2006.

182. VERNON R.B., GOODEN M.D., LARA S.L., WIGHT T.N. Microgrooved Fibrillar Collagen Membranes as Scaffolds for Cell Support and Alignment. Biomaterials, v. 26, n. 16, p. 3131-3140, 2005.

183. WANG H.L., CAROLL W.J. Guided bone regeneration using bone grafts and collagen membranes. Quintessence International, v. 32, n. 7, p. 504-515, 2001.

184. WICKHAM M.Q., ERICKSON G.R., GIMBLE J.M., VAIL T.P., GUILAK F. Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. Clinical Orthopaedics, n. 412, p. 196-212, 2003.

185. WIESMANN H.P., NAZER N., KLATT C., SZUWART T., MEYER U. Bone tissue engineering by primary osteoblast-like cells in a monolayer system and 3-dimensional collagen gel. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, v. 61, n. 12, p. 1455-1462, 2003.

186. WILTFANG J., MERTEN H.A., SCHLEGEL K.A., SCHULTZE-MOSGAU S., KLOSS F.R., RUPPRECHT S. et al. Degradation characteristics of alpha and beta tri-calcium-phosphate (TCP) in minipigs. Journal of Biomedical Materials Research, v. 63, n. 2, p. 115-121, 2002.

187. XIE H., YANG F., DENG L., LUO J., QIN T., LI X. et al. The performance of bone-derived scaffold material in the repair of critical bone defects in the rhesus monkey model. Biomaterials, v. 28, n. 22, p. 3314-3324, 2007.

188. YOSHIMI R., YAMADA Y., ITO K., NAKAMURA S., ABE A., NAGASAKA T. et al. Self-assembling peptide nanofiber scaffolds, platelet-rich plasma, and mesenchymal stem cells for injectable bone regeneration with tissue engineering. *Journal of Craniofacial Surgery*, v. 20, n. 5, p. 1523-1530, 2009.
189. YOSHIMURA H., MUNETA T., NIMURA A., YOKOYAMA A., KOGA H., SEKIYA I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue and muscle. *Cell and Tissue Research*, v. 327, n. 3, p. 449-462, 2006.
190. ZARNETT R., SALTER R.B. Periosteal neochondrogenesis for biologically resurfacing joints: its cellular origin. *Canadian Journal of Surgery*, v. 32, n. 3, p. 171-174, 1989.
191. ZHENG Y.-X., RINGE J., LIANG Z., LOCH A., CHEN L., SITTINGER M. Osteogenic potential of human periosteum-derived progenitor cells in PLGA scaffold using allogeneic serum. *Journal of Zhejiang University Science B*, v. 7, n. 10, p. 817-824, 2006.
192. ZHOU J., LIN H., FANG T., LI X., DAI W., UEMURA T. et al. The repair of large segmental bone defects in the rabbit with vascularized tissue engineered bone. *Biomaterials*, v. 31, n. 6, p. 1171-1179, 2010.

ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina / Hospital Universitário Antônio Pedro

Herbert Praxedes - **Coordenador Geral**

Médico

Alair Augusto S.M.D. dos Santos

Médico

Ana Beatriz Monteiro Fonseca

Estatística

Carlos Brazil

Advogado

Denise Mafra

Nutricionista

José Carlos Carraro Eduardo

Médico

José Paravidino de Macedo Soares

Médico

Maria de Fátima Lopes Braga

Nutricionista

Maria Nazareth Cerqueira Pinto

Médica

Miriam Fátima Zaccaro Scelza

Cirurgiã Dentista

Nívia Valença Barros

Assistente Social

Paulo Roberto Mattos da Silva

Psicólogo

Paulo Sérgio Faitanin

Filósofo

Regina Helena Saramago Peralta

Médica

Regina Lúcia de Oliveira Caetano

Farmacêutica

Renato Augusto Moreira de Sá

Médico

Rosa Leonôra Salerno Soares

Médica

Rosângela Arrabal Thomaz

Bióloga

Rosiléa Said Amazonas

Representante dos Usuários

Simone Cruz Machado

Enfermeira

Wilson da Costa Santos

Farmacêutico

CEP CMM/HUAP nº 232/08

CAAE nº **0181.0.258.000-08**

Do: Coordenador do CEP CMM/HUAP

A(o) Sr.(a) Pesquisador(a):

Assunto: Parecer sobre Projeto de Pesquisa

Sr.(a) Pesquisador(a)

Informo a V.Sª. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina / Hospital Universitário Antônio Pedro, constituído nos termos da Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao protocolo de pesquisa e seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme abaixo discriminado:

Título do Projeto:

“Desenvolvimento e análise de biomateriais para enxerto ósseo e bioengenharia. Potencial de células progenitoras”

Pesquisador Responsável:

Adriana Brandão Ribeiro Linhares

Pesquisadores Colaboradores:

José Mauro Granjeiro e Mônica Calasans Maia

Data: 05/12/2008

Parecer: *Aprovado.*


Atenciosamente,

Prof. Herbert Praxedes
Coordenador

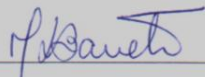
ANEXO II



Serviço Público Federal
Universidade Federal Fluminense
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética em Pesquisa Animal

ertificamos que o projeto nº 0094/09, intitulado “AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE SUBCUTÂNEA DO β -TRICALCIOFOSFATO-UFF EM RATOS” sob a orientação do Prof. Dr. José Mauro Granjeiro (pesquisador responsável) do Departamento de Biologia Celular e Molecular, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal da SBCAL e obteve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) em oito de abril de 2010.

Niterói, 08 de junho de 2010.



Presidente do C.E.P.A.

ANEXO III



Serviço Público Federal
Universidade Federal Fluminense
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética em Pesquisa Animal

Certificamos que o projeto nº 00149/09, intitulado “AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE CÉLULAS-TROCO MESENQUIMAIS ADULTAS HUMANAS E GRÂNULOS DE HA/β-TCP NA CONSOLIDAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS EXTENSOS EM RATOS” sob a **orientação** do Prof. Dr. José Mauro Granjeiro (pesquisador responsável) do DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal do COBEA e obteve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) em dezenove de novembro de 2009.

Niterói, 30 de novembro de 2009.

Presidente do C.E.P.A.



Espaço reservado para protocolo

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: **VINICIUS SCHOTT GAMEIRO**
1.2 CNPJ/CPF: **836392257-91**
1.3 Endereço completo: **RUA MIGUEL DE FRIAS 211, 1204, ICARAÍ, NITERÓI, RIO DE JANEIRO**
1.4 CEP: **24220-001**
1.5 Telefone: **(21) 27221927** 1.6 Fax: **(21) 26215509**
1.7 E-mail: **drschott@bol.com.br**

continua em folha anexa

- 2. Natureza:** Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: **INVENÇÃO**

- 3. Título da Invenção, Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição (54):**
PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOMATERIAL DE TRI-CÁLCIO FOSFATO E HIDROXIAPATITA.

continua em folha anexa

- 4. Pedido de Divisão:** do pedido N° : Data de Depósito: / /

- 5. Prioridade:** interna unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s)

Pais ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito
		/ /
		/ /
		/ /

6. Inventor (72):

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

- 6.1 Nome: **VINICIUS SCHOTT GAMEIRO**
6.2 Qualificação: **PROFESSOR UNIVERSITÁRIO** 6.3 CPF: **836392257-91**
6.4 Endereço completo: **RUA MIGUEL DE FRIAS 211, 1204, ICARAÍ, NITERÓI, RIO DE JANEIRO**
6.5 CEP: **24220-001**
6.6 Telefone: **(21) 27221927** 6.7 Fax: **(21) 26215509**
6.8 E-mail: **drschott@bol.com.br**

continua em folha anexa

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](#)