

Renata dos Santos Almeida



**AVALIAÇÃO DA IMPLANTAÇÃO DE  
GRÂNULOS DE  $^2$ -TCP ASSOCIADO OU NÃO À  
BIOVIDRO FOSFATADO PARA REGENERAÇÃO  
DE DEFEITO ÓSSEO**

Salvador  
2013

**RENATA DOS SANTOS ALMEIDA**

**AVALIAÇÃO DA IMPLANTAÇÃO DE GRÂNULOS DE  $^{25}$ -TCP  
ASSOCIADO OU NÃO À BIOVIDRO FOSFATADO PARA  
REGENERAÇÃO DE DEFEITO ÓSSEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Paim Rosa

**Co-orientador:** Prof<sup>o</sup>. Dr. Fúlvio Borges Miguel

Salvador  
2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde,  
SIBI - UFBA.

A498 Almeida, Renata dos Santos

Avaliação da implantação de grânulos de  $^2$ -TCP associado  
ou não à biovidro fosfatado para regeneração de defeito ósseo /  
Renata dos Santos Almeida. – Salvador, 2013.

82 f.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fabiana Paim Rosa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.  
Instituto de Ciências da Saúde, 2013.

1. Biomateriais. 2. Fosfatos de Cálcio. 3. Calvária. 4. Rato.  
5. Regeneração Óssea. I. Rosa, Fabiana Paim. II. Universidade  
Federal da Bahia. III. Título.

CDU 577

RENATA DOS SANTOS ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DA IMPLANTAÇÃO DE GRÂNULOS DE  $\text{Ca}_2\text{-TCP}$   
ASSOCIADO OU NÃO À BIOVIDRO FOSFATADO PARA  
REGENERAÇÃO DE DEFEITO ÓSSEO**

Dissertação aprovada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em \_\_\_\_\_.

**Banca Examinadora**

**Fabiana Paim Rosa**, Orientadora \_\_\_\_\_  
Doutora em Odontologia, pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,  
Universidade Federal da Bahia.

**Eliana Cristina da Silva Rigo** \_\_\_\_\_  
Doutora em Ciência e Engenharia dos Materiais, pela Universidade Federal de São Carlos  
Universidade de São Paulo.

**Roberto Paulo Correia de Araújo** \_\_\_\_\_  
Doutor em Odontologia, pela Universidade Federal da Bahia  
Universidade Federal da Bahia

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



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

Aos dez dias do mês de dezembro de dois mil e treze, reuniu-se em sessão pública o Colegiado do Programa de Pós- Graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas com a finalidade de apreciar a **Defesa Pública de Dissertação** da Mestranda **Renata dos Santos Almeida** através da Comissão Julgadora composta pelos **Professores Fabiana Paim Rosa, Roberto Paulo Correia de Araújo e Eliana Cristina da Silva Rigo**. O título da Dissertação apresentada foi **Avaliação de novos biomateriais fosfatados para a regeneração óssea**. Ao final dos trabalhos, os membros da mencionada Comissão Examinadora emitiram os seguintes pareceres:

Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa Aprovada  
Prof. Dr. Roberto Paulo Correia de Araújo Aprovada  
Profa. Dra. Eliana Cristina da Silva Rigo Aprovada

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

Salvador, 10 de dezembro de 2013

Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa Fabiana Paim Rosa  
Prof. Dr. Roberto Paulo Correia de Araújo Roberto Paulo Correia de Araújo  
Profa. Dra. Eliana Cristina da Silva Rigo Eliana Rigo

Dedico este trabalho a minha mãe,  
Valdete, pelo apoio incondicional.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por mostrar-se sempre presente em minha vida.

A minha mãe Valdete, pelo incentivo, pelo amor desmedido e por me fazer acreditar que sempre podemos conquistar o que desejamos.

Aos meus irmãos Jô e Iugo, por torcerem pelas minhas vitórias.

Às minhas amigas-irmãs Dacilene, Nice, Michele e Thaise, pelo carinho e cumplicidade, mesmo a distância.

À Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa, minha orientadora, pela paciência e pelos inúmeros ensinamentos que levarei para toda a vida. Você é um exemplo a ser seguido.

Ao Dr. Fúlvio Borges Miguel, meu co-orientador e amigo, por ter me colocado nesta jornada, por acreditar em minha capacidade e pela paixão na arte de ensinar. Você foi essencial em meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Dr. Aryon, pela gentileza, por fazer as análises deste trabalho e por ceder o laboratório para as técnicas histológicas.

Ao Dr. Marcelo Henrique Prado, ao Daniel Navarro, e demais pesquisadores do IME, responsáveis pela produção do biomaterial utilizado neste estudo.

Ao Prof. Dr. Roberto Paulo de Araújo, coordenador e idealizador do Programa de Pós-graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas (PIOS-UFBA).

Aos secretários do PIOS, Bruno, Célia e Marcelo, pela atenção e altruísmo.

Aos doutorandos, mestrandos e alunos de iniciação científica do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais (ICS-UFBA), por sua ajuda, seus ensinamentos e pelo valioso trabalho em equipe.

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

Aos colegas de mestrado, principalmente: Bianca, Iorrana, Janayna, Márcia, Mariana e Núbia, por compartilhar neste período muito mais que conhecimento científico.

A George e a Júnior, pela dedicação, paciência e companheirismo em dias de biotério. Vocês conseguem transformar trabalho em prazer.

À FAPESB e à UFBA pelo financiamento, que possibilitou a realização desta pesquisa.

É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas,  
mesmo expondo-se ao fracasso,  
do que alinhar-se com os pobres de espírito,  
que nem gozam muito, nem sofrem muito,  
porque vivem numa penumbra cinzenta,  
onde não conhecem nem vitória, nem derrota.

*Theodore Roosevelt*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Matriz óssea e suas células: Osteoblastos (Ob), Osteoclastos (Oc), <i>Lining cells</i> (Lc); Matriz óssea (MO); Osteócitos (Oci) e Matriz osteoide (MOT)	<b>24</b>
<b>Figura 2</b>	Representação da evolução dos biomateriais em função do tempo	<b>28</b>
<b>Figura 3</b>	Característica da interface entre o biomaterial/tecido ósseo, sendo os biomateriais bioinertes (a) bioativos (b)	<b>29</b>
<b>Figura 4</b>	Diagrama esquemático de volume específico x temperatura de um vidro	<b>37</b>
<b>Figura 5</b>	Cerâmicas porosas de $\beta$ -TCP com diferentes tamanhos de poros e um diâmetro igual a: (a) 100-200 $\mu\text{m}$ , (b) 300-400 $\mu\text{m}$ , (c) 500-600 $\mu\text{m}$ e (d) 700-800 $\mu\text{m}$	<b>39</b>
<b>Figura 6</b>	Acondicionamento do biomaterial em <i>ependorfs</i> e imagem dos grânulos	<b>49</b>
<b>Figura 7</b>	Passo a passo do procedimento cirúrgico..	<b>51</b>
<b>Figura 8</b>	(A) Calvária removida após sacrifício e redução das regiões laterais e inferiores; (B) Divisão da calvária em porção anterior e posterior.	<b>52</b>
<b>Figura 9</b>	Desenho esquemático da disposição em que os cortes histológicos foram realizados	<b>53</b>
<b>Figura 10</b>	(A) GTP-BV - matriz osteoide neoformada (MON) próxima à borda óssea do defeito (BO) – Hematoxilina e Eosina (HE). (B) GTP – borda óssea (BO), matriz osteoide neoformada (MON), preenchimento do defeito pelo biomaterial (GR) e por tecido conjuntivo frouxo (TC) - Picrossírius-Red (PIFG)	<b>56</b>
<b>Figura 11</b>	(A) CON – matriz osteoide neoformada (MON) restrita a região de borda óssea (BO) - (PIFG). (B) CON - preenchimento de toda extensão do defeito por tecido conjuntivo fibroso (TCF), com espessura inferior ao osso remanescente. Vaso sanguíneo (VS) no centro de defeito – (HE)	<b>57</b>
<b>Figura 12</b>	(A e B) GTP-BV - matriz osteoide neoformada (MON) próxima à borda óssea do defeito (BO) e entre as partículas, em direção centrípeta. Preenchimento do defeito pelo biomaterial (GR) e por tecido conjuntivo frouxo (TC) – (HE / PIFG)	<b>58</b>
<b>Figura 13</b>	(A e B) GTP-BV – neoformação de matriz osteoide (MON) entre as partículas do biomaterial, em direção centrípeta. Preenchimento do defeito pelos grânulos do biomaterial (GR) e por tecido conjuntivo frouxo (TC), com formação de septos de tecido fibroso (SF) entre as partículas. (B) – Presença de discreto infiltrado inflamatório mononuclear, distribuído de forma difusa – (PIFG / HE)	<b>59</b>

- Figura 14** (A) GTP-BV – preenchimento de toda extensão do defeito pelos grânulos do biomaterial (GR) e por tecido conjuntivo frouxo (TC). Espaços deixados pelos grânulos (GR) de tamanho pouco desigual, com distribuição em duas a três camadas – (HE). (B) GTP – preenchimento de toda extensão do defeito pelos grânulos do biomaterial (GR) e tecido conjuntivo frouxo (TC) com espessura similar a borda óssea adjacente – (HE) **60**
- Figura 15** (A) CON – preenchimento de toda extensão o defeito por um tecido conjuntivo frouxo (TC) com abundante neoformação vascular (VS) – (PIFG). (B) GTP – preenchimento do defeito por tecido conjuntivo frouxo (TC), pouco edemaciado, bem vascularizado (VS), com proliferação de células fusiformes e com formação de septos fibrosos (SF), circundando as partículas do biomaterial (GR) – (HE) **61**
- Figura 16** (A e B) GTP-BV – organização dos grânulos (GR) no defeito com formação de septos de tecido fibroso, preenchendo o interstício entre as partículas. Presença de tecido conjuntivo frouxo (TC), altamente vascularizado (VS) – (PIFG / HE) **62**
- Figura 17** (A) GTP – Estroma na área de preenchimento do defeito. Presença de tecido conjuntivo frouxo (TC), pouco edemaciado, com muitos vasos sanguíneos (VS), proliferação de fibroblastos e células fusiformes mesenquimais – (HE). (B) - Grânulos do biomaterial (GR) envoltos por septos de tecido fibroso (SF). Presença de tecido conjuntivo frouxo (TC), com abundante neoformação vascular (VS) – (HE) **63**
- Figura 18** (A e B) GTP-BV - presença de infiltrado inflamatório mononuclear (IFM) distribuído de forma difusa. Presença de discreta reação inflamatória granulomatosa, com células gigantes multinucleadas (CG), em torno das partículas dos biomateriais. Neoformação de matriz osteoide (MON) entre as partículas do biomaterial (GR) – (HE) **64**

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Relação entre Ca / P em diversos tipos de fosfato de cálcio	<b>34</b>
<b>Quadro 2</b>	Tipos de <sup>2</sup> -TCP disponíveis comercialmente	<b>35</b>
<b>Quadro 3</b>	Distribuição dos animais de acordo com os grupos, no ponto biológico de 15 dias	<b>47</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS E SÍMBOLOS

ACP	Fosfato de cálcio amorfo
BCP	Fosfato de cálcio bifásico
BO	Borda óssea
BPLS	Manual de Biossegurança e Boas Práticas Laboratoriais
BPM	Proteína morfogênica óssea
BV	Biovidro
°C	Graus Celsius
Ca	Cálcio
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Fosfato monocálcico monohidratado
$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	Metafosfato de cálcio
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hidroxiapatita
$\text{Ca}_{10x}\text{H}_{2x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Fosfato de cálcio amorfo
$\text{Ca}^{2+}$	Íon de cálcio
$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	Pirofosfato de cálcio
$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Pirofosfato de cálcio dihidratado
$\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$	Citrato de cálcio
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Fosfato tricálcico
$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	Fosfato óxido de cálcio
$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	Fosfato tetracálcico
$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	Fosfato heptacálcio
$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Fosfato octacálcico
$\text{CaF}_2$	Fluoreto de cálcio
$\text{CaHPO}_4$	Fosfato dicálcico
$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Dicálcico dihidratado
CaO	Óxido de cálcio

CaP	Fosfato de cálcio
CEUA	Comitê de Ética em Pesquisas no Uso de Animais
CG	Célula gigante multinucleada
COM	Grupo controle - defeito vazio
CPC	Cimento de fosfato de cálcio
CPP	Pirofosfato de cálcio
CPPD	Pirofosfato de cálcio dihidratado
DCPA	Fosfato dicálcico
DCPD	Dicálcico dihidratado
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Monetita
GR	Grânulo do biomaterial
GTP	Grupo experimental - grânulos de <sup>2</sup> -TCP
GTP-BV	Grupo experimental - grânulos de <sup>2</sup> -TCP + Biovidro
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácido fosfórico
HÁ	Hidroxiapatita
HAp	Hidroxiapatita precipitada
HCA	Hidroxicarbonato de apatita
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonato
HE	Coloração Hematoxilina – Eosina
I <sub>b</sub>	Índice de bioatividade
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
IFM	Infiltrado inflamatório mononuclear
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IME	Instituto Militar de Engenharia
IPAC	Instituto de Patologia Geral e Cutânea
K	Potássio
KGy	Quilogray

KOH	Hidróxido de potássio
Lc	<i>Linning cells</i>
MCPM	Fosfato monocálcico monohidratado
Mg	Magnésio
MOL	Massa Molar
MON	Matriz osteoide neoformada
Na	Sódio
Na <sub>2</sub> O	Óxido de sódio
NIH	National Institutes of Health
Ob	Osteoblasto
Oc	Osteoclasto
Oci	Osteócito
OCP	Fosfato octacálcico
P	Fósforo
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Pentóxido de fósforo
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> CaOCaF <sub>2</sub>	Biovidro de fosfato de cálcio
PGA	Ácido poliglicólico
pH	Potencial hidrogeniônico
PIFG	Coloração Picrossírius-Red
PLA	Ácido polilático
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Fosfato
Rpm	Rotação por minuto
SF	Septo de tecido fibroso
SiO <sub>2</sub>	Dióxido de silício
Sr	Estrôncio
SUS	Sistema Único de Saúde
TC	Tecido conjuntivo frouxo
TCP	Fosfato tricálcico

TCP – BV	Fosfato tricálcico associado à biovidro
TF	Tecido conjuntivo fibroso
TTCP	Fosfato tetracálcico
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
UFBA	Universidade Federal da Bahia
VS	Vaso sanguíneo
±-TCP	Fosfato tricálcico tipo ±
<sup>2</sup> -Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Cristais de fosfato tricálcico tipo <sup>2</sup>
β-TCP	Fosfato tricálcico tipo <sup>2</sup>
45S5	Bioglass®

ALMEIDA, Renata dos Santos. **Avaliação da implantação de grânulos de  $^2$ -TCP associado ou não à biovidro fosfatado para regeneração de defeito ósseo.** 82 f. il. 2013. Dissertação (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

## RESUMO

Em decorrência de perdas ósseas extensas, os procedimentos de enxertia são amplamente utilizados. Como alternativa a estas técnicas, a bioengenharia tecidual busca desenvolver um biomaterial ideal, que atue como substituto ósseo e induza a um processo de regeneração. Os biomateriais são classificados em diversas classes, composições e formatos. A aplicabilidade destes depende de suas propriedades biológicas, físico-químicas e mecânicas. Dentre os biomateriais cerâmicos, dois são considerados muito promissores, por se ligarem quimicamente ao tecido ósseo, sem formar tecido de interposição: o  $^2$ -fosfato tricálcico ( $^2$ -TCP), amplamente utilizado nas técnicas regenerativas, devido à sua semelhança com componentes inorgânicos do tecido ósseo, por não apresentar risco de transmissão de doenças, ser biodegradável e participar do equilíbrio cálcio e fósforo do organismo; e o Biovidro fosfatado (BV), que possui excelente bioatividade, o que estimula a neoformação tecidual e a regeneração óssea. Ademais, adaptam-se facilmente ao sítio de implantação. **Objetivos:** Este trabalho avaliou a biocompatibilidade e biofuncionalidade de novos biomateriais para a regeneração óssea. **Metodologia:** Para realização dos testes *in vivo*, foram utilizados 15 *rattus norvegicus* da linhagem Wistar, albinos, machos, adultos, no qual foi confeccionado defeito crítico, com diâmetro médio de 8,5mm, na região da calvária. Estes animais foram distribuídos aleatoriamente para composição de 3 grupos: GTP (implantação de grânulos de  $^2$ -TCP); GTP-BV (implantação de grânulos de  $^2$ -TCP associado à biovidro) e CON (sem implantação de biomaterial, preenchimento apenas com coágulo sanguíneo). Ao final de 15 dias pós-operatório, os animais foram eutanasiados, a calvária foi removida, processada e analisada histologicamente por microscopia óptica. **Resultados:** Os biomateriais desencadearam uma discreta reação inflamatória crônica granulomatosa. Nos grupos experimentais (GTP e GTP-BV), houve um reparo tecidual em extensão e espessura e a neoformação óssea foi incipiente e relacionada a um reparo reacional nas regiões de borda óssea, e por condução, entre as partículas do biomaterial. O estroma formado na área de preenchimento do defeito consistiu em um tecido conjuntivo frouxo. No grupo CON, a neoformação óssea foi restrita as regiões de bordas ósseas e o defeito foi preenchido por um delgado tecido conjuntivo fibroso. **Conclusão:** Para as condições deste estudo, os biomateriais foram biocompatíveis, os grânulos atuaram como arcabouços tridimensionais e apresentaram potencial osteocondutor, sem diferenças entre os si, pois a adição do biovidro não aumentou a bioatividade do  $^2$ -TCP.

**Palavras-chave:** Biomateriais. Fosfatos de Cálcio. Calvária. Rato. Regeneração óssea.

ALMEIDA, Renata dos Santos. **Evaluating  $^2$ -TCP granule implants with or without phosphate bioglass for regeneration of bone defects.** 82 p. ill. 2013 ̄  
Dissertation (MSc in Interactive Process of Organs and Systems) - Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador.

## ABSTRACT

As a result of extensive bone loss, the grafting procedures are widely used. As an alternatives to these techniques in tissue, bioengineering seeks to develop an ideal biomaterial, acting as a bone substitute and inducing a regeneration process. Biomaterials are classified into several classes, compositions and shapes. The applicability of these depends on the biological, physical, chemical and mechanical properties. Among the ceramic biomaterials, two are considered very promising, once chemically binding to bone without forming tissue interposition:  *$^2$ -tricalcium phosphate* ( $^2$ -TCP), widely used in regenerative techniques, due to its similarity to the inorganic components bone tissue, as it does not present a risk of diseases transmission, it is biodegradable and participate in the calcium and phosphorus balance of the body. *Phosphate Bioglass* (BV), shows excellent bioactivity, which stimulates new tissue formation and bone regeneration. Moreover, they easily adapt to the implantation site. **Objective:** Therefore, this study evaluated the biocompatibility and biofunctionality of new biomaterials for bone regeneration. **Methodology:** To perform the tests *in vivo*, 15 Wistar adult male rats, on which was made a critical defect in the calvarial region with average diameter of 8.5 mm were used. These animals were randomly assigned to a 3 group composition: GTP (implantation of  $^2$ -TCP granules); GTP-BV (implantation of  $^2$ -TCP granules associated with bioglass) and CON (without implantation of biomaterial, just filled with blood clot). At the end of 15 days after surgery, animals were euthanized, the calvaria region removed and histologically assessed through optical microscopy. **Results:** Biomaterials triggered a mild chronic granulomatous inflammatory reaction, appropriate to the repair process. In the experimental groups (GTP and GTP-BV) there was tissue repair in extent and thickness, and the stroma formed in the fill area of the defect consisted of a loose connective tissue, while the CON group formed a thin fibrous tissue. New bone formation was poor and related to a repair reaction in the edges regions of bone, and by conduction between the particles of biomaterial in groups GTP and GTP-BV. **Conclusion:** For the conditions of this study, the biomaterials were biocompatible, granules acted as three-dimensional scaffolds and showed osteoconductive potential without differences among them, because the addition of bioglass did not increase the bioactivity of  $^2$ -TCP.

**Keywords:** Biomaterials. Calcium Phosphates. Calvaria. Rats. Bone regeneration.

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>20</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>23</b>
2.1 TECIDO ÓSSEO	23
2.2 BIOENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA	26
2.3 BIOMATERIAIS	27
<b>2.3.1 <math>\text{Ca}^{2+}</math> - Fosfato Tricálcico (<math>\text{Ca}^{2+}</math>-TCP)</b>	<b>33</b>
<b>2.3.2 Biovidro ou Vidro Bioativo</b>	<b>36</b>
<b>2.3.3 Apresentação do biomaterial – Grânulos</b>	<b>39</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>45</b>
<b>4 METODOLOGIA</b>	<b>47</b>
4.1 AMOSTRA	47
4.2 BIOMATERIAIS	48
<b>4.2.1 Grânulos de biovidro a base de fosfato de cálcio</b>	<b>48</b>
<b>4.2.2 Grânulos de <math>\text{Ca}^{2+}</math>-TCP</b>	<b>49</b>
4.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	50
4.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	52
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>55</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>66</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b>	<b>70</b>
<b>6 REFERÊNCIAS</b>	<b>72</b>
<b>ANEXO</b>	<b>82</b>

# *Introdução*

## 1 INTRODUÇÃO

Em situações clínicas nas que ocorrem grandes perdas ósseas, como, por exemplo, após as ressecções de tumores e fraturas extensas, o reparo tecidual ocorre de forma limitada. (CRUZ et al., 2006) Nessas situações, a técnica mais empregada para substituição óssea é a utilização de enxerto autógeno, padrão-ouro devido às suas propriedades osteogênicas. (ALMEIDA FILHO et al., 2007; LIU; XIA; CZERNUSZKA, 2007) Todavia, este tipo de enxerto apresenta algumas desvantagens, a exemplo da necessidade de procedimento cirúrgico adicional, área doadora limitada e risco de infecção trans e pós-cirúrgica. (APELT et al., 2004)

Como alternativa ao uso desse tipo de enxerto, pesquisadores da área da Bioengenharia Tecidual, mediante os avanços técnico-científicos observados nas últimas décadas, têm desenvolvido novos biomateriais para atuar como substitutos ósseos e, assim, proporcionar o restabelecimento funcional e estético; melhoria da qualidade de vida; reinserção social e laboral desses indivíduos.

Esses biomateriais são definidos como uma substância ou combinação de substâncias que não drogas ou fármacos, de origem natural ou sintética, que podem ser usados como parte ou todo de um sistema, tratando, aumentando ou substituindo qualquer tecido, órgão ou função do corpo. (GUTIERRES et al., 2006; SILVA, 2007)

Durante a produção desses materiais, podem ser utilizadas matérias-primas de origem metálica, polimérica, cerâmica ou uma combinação delas denominada compósitos. Dentre os biomateriais cerâmicos, dois têm sido considerados muito promissores, por apresentarem bioatividade – capacidade de se ligar quimicamente ao tecido ósseo, sem formar tecido de interposição: o  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP), amplamente utilizado nas técnicas regenerativas, devido à sua semelhança com componentes inorgânicos do tecido ósseo, por não apresentar risco de transmissão de doenças, ter boa biocompatibilidade e participar do equilíbrio cálcio (Ca) e fósforo (P) do organismo (KAWACHI et al., 2000; LeGEROS, 2002; VALLET-REGI; GONZÁLEZ-CALBET, 2004; FONSECA et al., 2011); e o biovidro (BV), que tem excelente bioatividade, o que estimula a neoformação tecidual e a regeneração óssea. Ademais, ambos se adaptam facilmente ao sítio de implantação. (CRUZ et

al., 2006; GINEBRA; TRAYKOVA; PLANELL, 2006; LIANG et al., 2008; LIU; TAN; CHENG, 2008)

Esses biomateriais podem ser fabricados em diversos formatos, como cilindros, microesferas, discos, blocos, grânulos, dentre outros, de acordo com a aplicabilidade clínica. (ANDRADE, 2006) Os grânulos servem de arcabouço para a adesão e a migração celular, necessária durante a neoformação óssea; são de fácil manuseio e capazes de preencher o defeito por completo, porém podem se deslocar da região de implante. (CARLO et al., 2007)

Tendo em vista atender ao requisito que os arcabouços devem ser fabricados a partir de biomateriais com propriedades adequadas aos tecidos que se pretende reparar, juntamente com as exigências geométricas, a fabricação do arcabouço tornou-se um processo complexo, que exige conhecimentos sobre como as características dos materiais podem interferir nas células, na interface biomaterial-tecido. (KARAGEORGIU; KAPLAN, 2005) Diante do exposto, este trabalho avaliou a biocompatibilidade e a biofuncionalidade de novos biomateriais, grânulos de  $\beta$ -TCP e de  $\beta$ -TCP associado a um biovidro fosfatado, implantados em defeito crítico, na calvária de rato, para regeneração óssea.

*Revisão da literatura*

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Para um melhor entendimento sobre o processo de reparo ósseo, é preciso ter pleno conhecimento dos aspectos biológicos do osso e de como a utilização de biomateriais pode auxiliar neste mecanismo. Este capítulo inclui do ponto de vista teórico, os seguintes temas: tecido ósseo, bioengenharia tecidual óssea e biomateriais.

### 2.1 TECIDO ÓSSEO

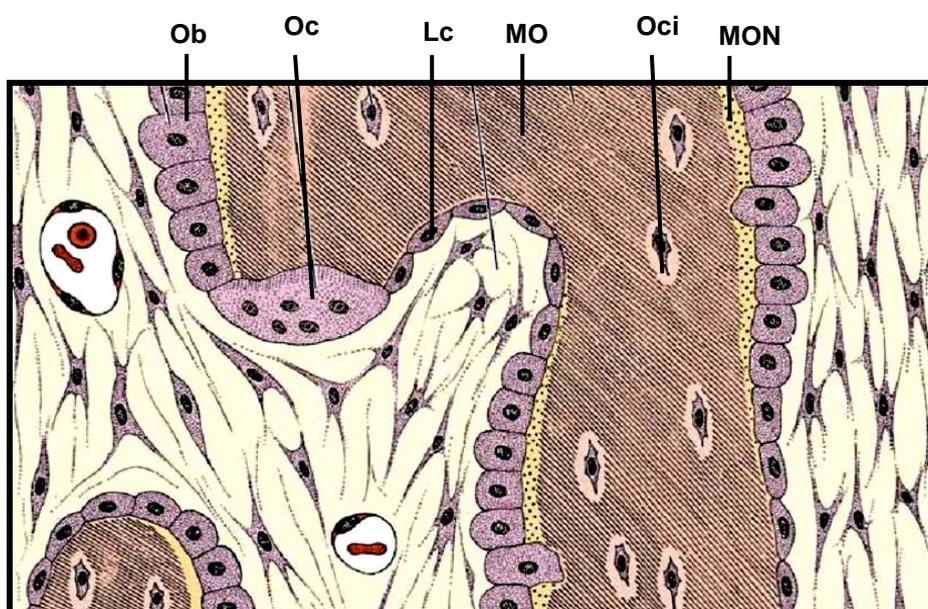
Conhecer o comportamento do tecido ósseo é imprescindível para desenvolver os implantes e os biomateriais; para aperfeiçoar técnicas de engenharia tecidual (FISHER; REDDI, 2003); e para avaliar os efeitos físicos e mecânicos que ocorrem durante a reparação, de forma a garantir a autonomia e a qualidade de vida dos indivíduos. (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005; ANDRADE et al., 2007)

O osso é classificado como um tecido conjuntivo especializado, formado por uma matriz extracelular mineralizada (orgânica e inorgânica) e células (osteócitos, osteoblastos e osteoclastos). A matriz óssea orgânica é formada por colágeno do tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas adesivas, que proporciona ao tecido ósseo certa maleabilidade, isto é, algumas possibilidades de extensão e flexão. (JUDAS et al., 2012)

Na porção inorgânica do tecido ósseo, encontra-se o maior reservatório de íons do organismo, os quais participam ativamente da manutenção da homeostase, principalmente dos níveis de Ca e P no sangue e, conseqüentemente, em todos os fluidos tissulares, condição essencial para a preservação da vida. (JUDAS et al., 2012) Além disso, podem ser encontrados o bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), o magnésio (Mg), o estrôncio (Sr), o potássio (K), o sódio (Na) e o citrato de cálcio ( $\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$ ). Os íons Ca e P se organizam em forma de cristais, apresentam a estrutura de uma hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) e são revestidos por uma camada de água e íons, chamada capa de hidratação. (VIEIRA, 1999; CARLO et al., 2003; VALLET-REGI; GONZÁLEZ-CALBET, 2004)

As células – osteócitos, osteoblastos, osteoclastos (Figura 1) – têm função de manutenção, síntese e reabsorção da matriz óssea, respectivamente. (VIEIRA, 1999; ANDRADE et al., 2007) Além destes três principais grupos de células, podem ser encontradas ao longo do endóstio, células de revestimento ósseo, as *lining cells* (Figura 1), que são consideradas quiescentes, porém, reconvertem-se em osteoblastos quando estimuladas. (JUDAS et al., 2012)

**Figura 1:** Matriz óssea e suas células: Osteoblastos (Ob), Osteoclastos (Oc), *Lining cells* (Lc); Matriz óssea (MO); Osteócitos (Oci) e Matriz osteoide neoformada (MON)



**Fonte:** Adaptado de Araújo Júnior (2005)

Este tecido se organiza estruturalmente, em nível molecular como um conjunto de moléculas de tropocolágeno e cristais de apatita; em nível ultraestrutural, como um conjunto de trabéculas e, em nível microestrutural, como osso não lamelar, cortical ou esponjoso. (ANDRADE et al., 2007) O conjunto de hidroxiapatita (HA) com fibras colágenas conferem ao tecido ósseo propriedades únicas, que o tornam muito resistente às trações mecânicas e dão-lhe mais resistência e plasticidade. (CARLO et al., 2003)

No osso cortical, pode-se encontrar uma porosidade média de 10%, enquanto que o osso esponjoso tem de 50 a 90% de porosidade. Este elevado índice faz com que o osso esponjoso apresente uma tensão mecânica inferior, quando comparado

ao cortical. (ARAÚJO JÚNIOR, 2005) Devido à alta complexidade do tecido ósseo, ainda não houve a descoberta de um biomaterial que atendesse a todos os requisitos de tolerância fisiológica, biocompatibilidade, estabilidade em longo prazo e tensão mecânica ideal. (VALLET-REGI; GONZÁLEZ-CALBET, 2004)

O tecido ósseo é aparentemente inerte, mas está em constante metabolismo. Os ossos são estruturas altamente dinâmicas, crescem, remodelam-se e se mantêm ativos durante toda a vida. (COSTA; MIGUEL; ROSA, 2005) Em situação de lesões ou defeitos, é necessário um processo de reparo tecidual e, a depender da magnitude da lesão, o osso se regenera de forma completa em pequenas fraturas, devido a sua alta atividade fisiológica, por meio da interação de células osteogênicas que favorecem este mecanismo.

Em testes *in vivo*, os estudos têm demonstrado que a regeneração óssea depende da localização, do tamanho do defeito, da espécie e da idade do animal utilizado. (SCHMITZ et al., 1990; SCHLEGEL et al., 2006; DÖRING et al., 2011; APELT et al., 2004) A fim de mimetizar lesões ósseas extensas, Takagi e Urist (1982) criaram defeitos de tamanho crítico, posteriormente revalidados por Schmitz e Hollinger (1986) que, a fim de padronizar os estudos dos biomateriais para reparação óssea, propuseram um modelo experimental de defeito crítico em calvária de rato. Esses defeitos foram definidos como o menor tamanho de lesão intraóssea, em um osso em particular, que não vai se regenerar de forma espontânea durante a vida do animal.

Mas, recentemente, esse conceito foi reformulado, considerando tratar-se de uma região que não se regeneraria espontaneamente durante o período do estudo. (SCHLEGEL et al., 2006; SCHMITZ et al., 1990; SCHMITZ; HOLLINGER; MILAM, 1999) Uma vantagem do modelo de defeito de calvária é que ele envolve a reparação de sítios ósseos ortotópicos, o que torna os resultados fisiologicamente relevantes em relação aos obtidos em locais ectópicos, como músculos ou locais subcutâneos. (COOPER et al., 2010) Portanto perdas ósseas maiores (defeitos críticos), a regeneração ocorre de forma limitada, com formação de tecido fibroso e demanda procedimentos de enxertia e substituição óssea. (COSTA; MIGUEL; ROSA, 2005; MIGUEL et al., 2013) Os enxertos podem ser agrupados em:

- **Autógeno** – proveniente do próprio indivíduo, com resposta biológica previsível, porém a sua utilização é restrita, devido à limitação de áreas doadoras, há necessidade de um procedimento cirúrgico adicional e risco de infecção pós-cirúrgica, o que aumenta a morbidade do paciente (ALMEIDA FILHO et al., 2007);
- **Alógeno** – oriundo de um doador da mesma espécie, está associado a reações de imunogenicidade e precisa de um tratamento prévio para evitar o risco de transmissão de doenças; além disso, tem capacidade osteogênica reduzida e elevado custo. Como vantagem, ao contrário do enxerto autógeno, há uma maior disponibilidade e dispensa procedimento cirúrgico adicional no paciente (SILVA et al., 2011);
- **Xenógeno** – procedente de outras espécies animais, por exemplo, de bovinos, necessita de tratamento antigênico, de deslipidização e desproteínização, o que reduz a capacidade osteoindutora. (GUTIERRES et al. 2006)

Diante das dificuldades encontradas nos enxertos supracitados e com a finalidade de superar essas limitações, foi criada uma nova categoria de enxertos, os **aloplásticos** ou **biomateriais**, em crescente processo de desenvolvimento e produção. (COSTA; MIGUEL; ROSA, 2005; LIMA et al., 2011; SILVA et al., 2011)

## 2.2 BIOENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA

A Bioengenharia Tecidual congrega conhecimentos de diversas áreas como a Medicina, a Biologia, a Química, a Morfologia e as Engenharias. É um campo surgido há cerca de duas décadas e está em grande expansão científica. Visa à obtenção de biomateriais, com características semelhantes ao tecido ósseo e que atua na recuperação de defeitos críticos. (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005; ANDRADE, 2006; DOROZHKIN, 2010)

Essa área objetiva desenvolver novos e sofisticados biomateriais com alta bioatividade, de modo a promover a adesão e a migração celular, fornecer fatores bioquímicos para a difusão de nutrientes necessários à célula, além de ter funções

mecânicas. Este processo pode ser avaliado tanto *in vitro* como *in vivo*. (BONASSAR; VACANTI, 1998; VALLET-REGI; GONZÁLEZ-CALBET, 2004)

A fase primordial para a Bioengenharia Tecidual óssea se inicia com o desenvolvimento, a seleção e o processamento de arcabouços (*scaffolds*, suportes, matrizes tridimensionais, dentre outros), cuja função é fornecer suporte ao crescimento celular e atuar como substituto mecânico-estrutural até a formação do novo tecido e sua completa bioreabsorção. (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005) Esses biomateriais devem ser escolhidos após análise da associação da Engenharia de Materiais, do tipo de tecido e do reparo necessário.

## 2.3 BIOMATERIAIS

O biomaterial é definido como uma substância ou combinação de substâncias, de origem natural ou sintética, que pode ser usada como parte ou como o todo de um sistema do corpo humano, e visa a avaliar, tratar, aumentar, restaurar ou substituir um tecido, órgão ou função do corpo. (WILLIAMS, 2009)

Os biomateriais, após implantação, podem permanecer no organismo, de forma permanente ou temporária. Os permanentes podem induzir processos de inflamação crônica, sendo uma resposta típica a corpo estranho, e, a depender da duração da inflamação, podem acarretar complicações clínicas mais severas, como a contração do tecido. (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005; DÖRING et al., 2011)

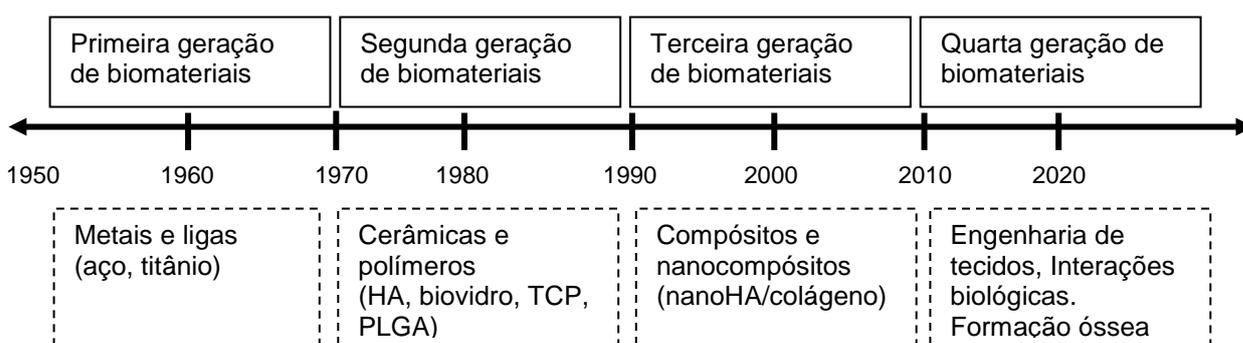
A partir dos anos de 1960, foi desenvolvida uma diversidade de implantes temporários, por meio de polímeros biorreabsorvíveis, utilizados clinicamente em suturas cirúrgicas, sistemas para liberação controlada de drogas, *stents* e dispositivos ortopédicos. Esses implantes, apesar de se apresentarem em grande variedade, não substituem completamente todas as complexas funções biológicas. (SILVA et al., 2011)

É imprescindível que os biomateriais sejam **biocompatíveis**, ou seja, devem atender ao requisito para o qual foram desenvolvidos, devem oferecer biossegurança e não estimular ou provocar o mínimo de reações alérgicas e/ou inflamatórias, além de não apresentar citotoxicidade, nem mutagêneses ou

carcinogênese. (ARAÚJO JUNIOR, 2005; MORAIS; PAPADIMITRAKOPOULOS; BURGESS, 2010) Ademais, os biomateriais que sofrem dissolução iônica em meio fisiológico, como os fosfatos de cálcio, favorecem a proliferação celular, como descrito por Orie e colaboradores (2005), em um estudo *in vivo*, onde utilizou um  $^2$ -TCP imerso em cultura de células da medula óssea por 3 horas: nesse estudo, o referido autor observou o desenvolvimento e crescimento de células sobre a superfície e para o interior do biomaterial por meio dos poros.

Outro critério relevante a ser considerado quanto ao biomaterial é a **biofuncionalidade**, ou seja, o conjunto de propriedades que dá a um determinado dispositivo a capacidade de desempenhar uma função desejada e pelo período de tempo necessário. Esta biofuncionalidade está relacionada com as propriedades mecânicas, físico-químicas e biológicas, o que permite ao implante o bom desempenho de sua função. (PROUBASTA, 1999) Outra característica dos biomateriais se relaciona com a interface implante-tecido, os **biotoleráveis**, que após implantação se isolam dos tecidos adjacentes pela formação de uma camada envoltória do tecido fibroso, pela liberação de compostos químicos, íons e produtos de corrosão por parte do material implantado. Essa categoria se refere aos polímeros sintéticos e à grande maioria dos metais. (GUTIERRES, et al, 2006) Por outra parte, considera-se **bioinertes** os biomateriais tolerados pelo organismo, mas cujo envoltório fibroso é de espessura mínima. Eles pertencem à primeira geração de biomateriais, surgidos entre as décadas de 1960 e 1970 (Figura 2), e representam essa categoria a zircônia, a alumina, o carbono e o titânio e suas ligas. (SILVA et al., 2011)

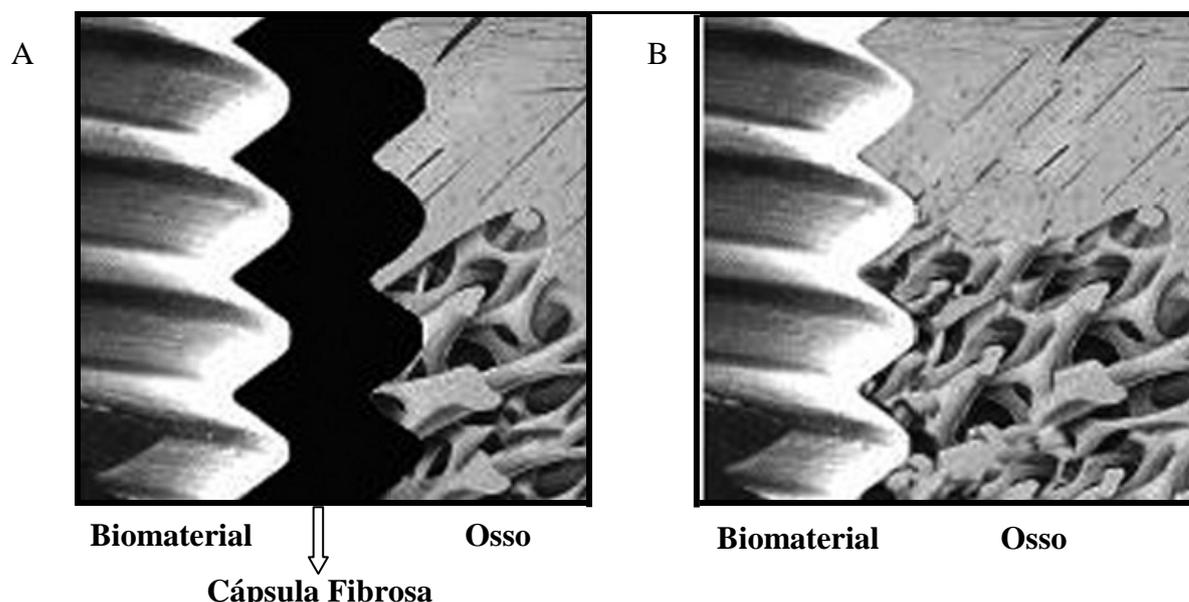
**Figura 2** - Representação da evolução dos biomateriais em função do tempo



**Fonte:** Adaptado de Murungan e Ramakrishna (2004).

A segunda geração se refere aos biomateriais **bioativos**: são aqueles que formam ligações químicas com o tecido ósseo (**osteointegração**) (Figura 3b), sem a interposição de tecido fibroso (Figura 3a) pela formação de uma camada de hidroxicarbonato apatita (HCA), o que favorece a neoformação e regeneração tecidual. Os principais materiais desta classe são os biovidros, as vitrocerâmicas a base de fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita e os compósitos de fosfato de cálcio (Figura 2). (VALLET-REGI; GONZÁLEZ-CALBET, 2004; ARAÚJO JÚNIOR, 2005) Para que haja a neoformação óssea é necessário que ocorra a mitose de células osteoprogenitoras e apenas materiais bioativos induzem à rápida neoformação de tecido ósseo *in vivo*, por meio de um processo denominado **osteoformação**. (HENCH; JONES, 2008)

**Figura 3** - Característica da interface entre o biomaterial/tecido ósseo, sendo os biomateriais bioinertes (a) e bioativos (b)



**Fonte:** Guastaldi e Aparecida (2010).

Também de acordo com a biofuncionalidade, os biomateriais podem ser considerados **ostecondutores**; isto ocorre quando sua estrutura serve de arcabouço ou estrutura favorável para a migração celular e deposição óssea oriunda do tecido ósseo presente nas proximidades; caracteriza-se, assim, por um processo de crescimento e invasão de vasos sanguíneos, de tecidos perivasculares e de

células osteoprogenitoras do sítio receptor para o enxerto, que formará um novo tecido ósseo, ao mesmo tempo em que o biomaterial será gradativamente reabsorvido. Já os biomateriais **osteoadutores** são aqueles que proporcionam uma resposta celular viável, bem como a produção de moléculas específicas do tecido em questão e induzem a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, o que possibilita a formação óssea ectópica. Este processo pode ser estimulado, por exemplo, pela inserção de proteínas ósseas morfogênicas (BMP) aos biomateriais. (ANDRADE, 2006) A nova geração de biomateriais se refere principalmente aos nanoestruturados, que são capazes de fazer ligações microestruturadas com o tecido ósseo e de favorecer a neoformação tecidual (Figura 2). Esses biomateriais são desenvolvidos em escala nanométrica, similar à organização molecular dos tecidos biológicos, com o fim de obterem potencial para a neoformação de tecidos moles ou duros. (THORWARTH et al., 2005)

Além dos conceitos supracitados, Vert e colaboradores (1992) definiram alguns termos para uniformizar a definição dos biomateriais, quais sejam: **biodegradáveis** - são os biomateriais que, devido à deterioração, sofrem dispersão *in vivo*, mas sem a eliminação dos subprodutos pelo organismo. Eles podem ser atacados por elementos biológicos de forma que a integridade do sistema seja afetada e podem formar fragmentos ou outros subprodutos de degradação que podem ser removidos do seu local de ação, mas não necessariamente do organismo. (ARAÚJO JÚNIOR, 2005); os **bioreabsorvíveis** exibem degradação por meio da diminuição de tamanho e são reabsorvidos *in vivo*, sendo eliminados por rotas metabólicas do organismo; e os **bioabsorvíveis** são os que podem se dissolver em fluidos corpóreos sem quebra estrutural ou diminuição da massa molecular. (ARAÚJO JÚNIOR, 2005)

Já Lima e colaboradores (2011) utilizam um único conceito para biodegradáveis e reabsorvíveis: os biomateriais que são degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo; e enfatiza que eles são bastante úteis em diversas aplicações, principalmente em implantes temporários, tendo como exemplo o beta-fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP), os polímeros ácido poliláctico (PLA) e ácido poliglicólico (PGA). (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005)

Quanto à origem, os biomateriais são classificados como biológicos ou sintéticos. Os **biológicos** são isolados de diferentes organismos (bactérias, algas,

corais, invertebrados, plantas e mamíferos). Dentre eles, podem-se citar o alginato, o colágeno, o ácido hialurônico, a quitosana, o ágar, os poli-hidroxicarbonatos, a cartilagem e o osso. Já os **sintéticos** são os metais e suas ligas, os polímeros, os compósitos e as cerâmicas. (ANDRADE, 2006)

Os biomateriais **metálicos** em geral são menos biocompatíveis e mais susceptíveis à corrosão no meio fisiológico, mesmo utilizando-se metais resistentes, como o aço inoxidável austenítico, a liga cobalto-cromo-molibdênio e o titânio e suas ligas. Os efeitos sistêmicos dos produtos de degradação desses metais ainda são muito discutidos entre médicos e cientistas. (LIMA et al., 2011)

Outro fator negativo da maioria das ligas metálicas é a sua alta densidade e elevado módulo de elasticidade, quando comparados com o tecido ósseo. Estes metais têm grandes desvantagens, mas, possuem propriedades mecânicas superiores aos outros biomateriais, são de fácil processamento e relativamente baratos. As principais aplicações ocorrem em próteses ortopédicas, implantes dentários, parafusos, eletrodos, fios, placas, grampos e pinos. (GUTIERRES et al, 2006)

Normalmente, os **poliméricos** têm baixa densidade e são ótimos substitutos de tecidos moles. Devem ser livres de aditivos tóxicos e de resíduos de monômeros, têm alta ductilidade, boa compatibilidade, não são corroídos, têm facilidade de fabricação e boa resiliência. Como ponto negativo, eles apresentam baixa resistência mecânica e dificuldade para esterilização. Frequentemente, são esterilizados com produtos químicos, radiação ionizante ou por plasma. Os principais polímeros são: o poliuretano, o polietileno, o polimetacrilato de metila, o nylon, o silicone e o dracon. Podem ser aplicados como cimento ortopédico, como adesivos, em superfícies articulares, em cartilagens, em vasos, em suturas, na substituição de tecidos moles e em placas de reparação óssea. (GUTIERRES et al, 2006)

Já grande parte dos **compósitos** tem boa biocompatibilidade, inércia química, resistência à corrosão e alta resistência à tração. Mas alguns têm dificuldade de fabricação. Os mais utilizados são o teflon-carbono, o carbono-carbono e o nylon-poliuretano. Estes são comumente aplicados como, válvula cardíaca artificial e implantes de articulações de joelho. (DOROZHKIN, 2010)

Outra classe de biomateriais de grande interesse científico são os **cerâmicos**. Começaram a ser pesquisados no final de 1960, como revestimento para aumentar a biocompatibilidade de implantes metálicos. Geralmente, as cerâmicas apresentam densidade moderada, elevada biocompatibilidade e boa resistência à compressão. Podem substituir tecidos duros como ossos e dentes, mas apresentam baixa tenacidade à fratura e dificuldade de processamento; ademais, algumas cerâmicas ao sofrer degradação em meio fisiológico têm perda das propriedades mecânicas. (FISHER; REDDI, 2003)

Estruturalmente, os biomateriais cerâmicos podem ser classificados como sólidos cristalinos (cerâmicos), sólidos amorfos (biovidros - BV) ou sólidos amorfos com núcleos de cristalização (vitro-cerâmicos). As principais cerâmicas são a alumina, a zircônia, o óxido de titânio, a fibra de carbono, o nitreto de titânio, a hidroxiapatita (HA) e o fosfato tricálcico (TCP). (VALLET-REGI; GONZÁLEZ-CALBET, 2004) Podem ser aplicados como substitutos de ossos, da traqueia e dos ligamentos artificiais, no preenchimento e na reconstrução óssea, na raiz de dentes e nos recobrimentos hemocompatíveis. (GUTIERRES, et al, 2006)

Assim, a seleção do biomaterial é apenas uma das etapas que garantirá – ou não – o sucesso de um procedimento. Inicia-se com a identificação das necessidades de um paciente, até o projeto e fabricação. (TIOMIS et al., 2010) A caracterização do material não o torna hábil ao uso como biocomponente, mas deve ser utilizado com uma pré-seleção de condições a serem analisadas nas próximas etapas. Os biomateriais devem ser avaliados laboratorialmente (testes *in vitro*), depois em animais e logo, mediante testes clínicos, em pessoas (testes *in vivo*), a fim de serem submetidos à aprovação das agências reguladoras para posterior comercialização e aplicação clínica. (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005)

Pelo exposto, observa-se que o biomaterial deve ser bem avaliada antes de ser escolhido, para que haja êxito no procedimento, devido à importância de suas características, como a composição química, biocompatibilidade, biofuncionalidade, tempo de degradação no organismo, propriedades mecânicas e elásticas, forma de apresentação e grau de inflamação desencadeada. (ANDRADE, 2006)

### 2.3.1 $\beta$ - Tricálcico fosfato ( $\beta$ -TCP)

Dentre as cerâmicas, os fosfatos de cálcio (CaP) têm sido os mais utilizados em diferentes técnicas regenerativas ósseas (KAWACHI et al., 2000; SILVA, 2007), em razão da sua biocompatibilidade, da semelhança com componentes inorgânicos do osso, por não transmitir doenças (BROWN et al., 1998; SANTOS et al., 2005; DUARTE et al., 2006), ser osteofílico e osteocondutor. (ZHANG et al., 2010) A biocompatibilidade dos diferentes CaP pode ser definida pelos seus componentes individuais ( $\alpha$ -TCP,  $\beta$ -TCP, HA, brushita, monetita, ACP) ou pelo produto da reação de fixação ao tecido (apatita deficiente em cálcio, carbonato de apatita ou dicálcico dihidratado). (JULIEN et al., 2007)

Alguns fosfatos de cálcio formam uma ligação com tecido ósseo em longo prazo (ALMEIDA FILHO et al., 2000; TEIXEIRA, 2009) e estimulam a adesão dos osteoblastos e a migração e proliferação celular para induzir a regeneração óssea. (VALLET-REGI; GONZÁLEZ-CALBET, 2004; CARLO et al., 2007; VOLKMER; SANTOS, 2007) Em contrapartida, devido às suas propriedades mecânicas, a porosidade e o deslocamento das partículas impossibilitam a sua aplicação em locais sujeitos a grande tração. (GUTIERRES et al., 2006; CARLO et al., 2007)

A degradação desses biomateriais no organismo depende de fatores como pH, concentração iônica do meio de teste, composição e cristalinidade. (OONISHI et al., 1997; CARLO et al., 2007) Esse mecanismo pode ser mediado por dissolução química, por ação dos osteoclastos (WHITE; SHORS, 1986) ou por fragmentação de suas partículas, acompanhada de neoformação óssea no interior dos poros. (OONISHI et al., 1997; SANTOS et al., 2005)

Há uma grande variedade de fosfatos de cálcio disponíveis para as terapias regenerativas, mas é importante saber a relação entre Ca / P, com a acidez e a solubilidade (Quadro 1). Assim, quanto menor é a proporção de Ca / P, maior é a acidez e solubilidade da mistura. Para diminuir esses parâmetros, essa relação deve ser próxima a 1,67, valor da hidroxiapatita estequiométrica ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). A classe dos fosfatos de cálcio comporta numerosas composições, que não são todas biocompatíveis. Entretanto, essas composições constituem, muitas das vezes, fases em equilíbrio estável ou metaestável com as composições utilizadas para realizar

substituições ósseas. Várias dessas composições existem em diferentes fases alotrópicas. (VALLET-REGI; GONZÁLEZ-CALBET, 2004)

Existem diferentes tipos de fosfatos de cálcio que podem ser obtidos por diferentes métodos e técnicas de síntese. Acima de 800°C, o TCP se apresenta em formas polimórficas, a forma cristalográfica <sup>2</sup>, que é a mais utilizada para a fabricação de substitutos ósseos em razão de sua taxa de adsorção em meios biológicos ou simulados, que estimula a neoformação e a reconstituição do tecido ósseo, em testes *in vitro* e *in vivo*. Ele se mantém em sua forma polimórfica no sistema romboédrico estável até temperaturas próximas a 1180° C, denominada fase beta (<sup>2</sup>-TCP); a outra forma, na fase monoclinica, estável na faixa de temperatura entre 1180 a 1430° C, é chamada fase alfa ( $\pm$ -TCP); e a terceira fase, denominada de super- $\pm$  ou  $\pm\bullet$  ( $\pm\bullet$ -TCP), encontra-se a temperaturas superiores a 1430° C. (GONZÁLEZ-CALBET, 2004)

**Quadro 1** - Relação entre Ca/P em diversos tipos de fosfato de cálcio

Relação Ca/P	NOME	FÓRMULA	SIGLA
2,0	Fosfato tetracálcico	Ca <sub>4</sub> O(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	TTCP
1,67	Hidroxiapatita	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	HÁ
1,67	Fosfato de cálcio amorfo	Ca <sub>10x</sub> H <sub>2x</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	ACP
1,50	Fosfato tricálcico ( $\pm$ , <sup>2</sup> , <sup>3</sup> )	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	TCP
1,33	Fosfato octacálcico	Ca <sub>8</sub> H <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> ·5H <sub>2</sub> O	OCP
1,0	Fosfato dicálcico dihidratado	CaHPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	DCPD
1,0	Fosfato dicálcico	CaHPO <sub>4</sub>	DCPA
1,0	Pirofosfato de cálcio ( $\pm$ , <sup>2</sup> , <sup>3</sup> )	Ca <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	CPP
1,0	Pirofosfato de cálcio dihidratado	Ca <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ·2H <sub>2</sub> O	CPPD
0,5	Fosfato monocálcico monohidratado	Ca (H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	MCPM

**Fonte:** Adaptado de Vallet-Regi e González-Calbet (2004).

O <sup>2</sup>-TCP é um fosfato de cálcio simples e barato, pode ser formado pela dissolução de cristais de <sup>2</sup>-TCP -<sup>2</sup>-Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>- em uma solução de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, o que resulta na precipitação de fosfato dicálcico dihidratado (CaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, DCPD). (CARRODÉGUAS, 2003; MOTISUKE, et al., 2005) Uma das vias de obtenção é por

reações a 650°C entre misturas equimolares de DCPD e hidroxiapatita precipitada (HAp) (com razão Ca/P=1,67). O  $\beta$ -TCP tem sido amplamente utilizado na substituição e na regeneração do tecido ósseo, normalmente como componente de cimentos biológicos ou como reforço de arcabouços poliméricos (Quadro 2). (FERREIRA, 2010) É biocompatível, sendo completamente absorvido pelo organismo num intervalo de 1 a 2 anos e possui uma taxa de dissolução de 3-12 vezes mais rápida que a da hidroxiapatita estequiométrica (ARAÚJO JÚNIOR, 2005).

**Quadro 2** - Tipos de  $\beta$ -TCP disponíveis comercialmente

Nome comercial	Fabricante	País de origem
Bioresorb <sup>®</sup>	Sybron Implant Solutions	Alemanha
Biosorb <sup>®</sup>	SBM S.A.	França
Calciresorb <sup>®</sup>	Ceraver	França
Chronos <sup>®</sup>	Synthes	EUA
Ceros <sup>®</sup>	Thommen Medical	Suíça
Cerasorb <sup>®</sup>	Curasan	Alemanha
Conduit <sup>®</sup>	DePuy Spine	EUA
JAX <sup>®</sup>	Smith and Nephew Orthopaedics	EUA
Graftys BCP <sup>®</sup>	Graftys	França
Osferion <sup>®</sup>	Olympus Terumo Biomaterials	Japão

**Fonte:** Adaptado de Dorozhkin (2010).

Devido a similaridades em sua composição, a HA e o  $\beta$ -TCP podem coexistir durante o processo de síntese em proporções diferentes. Além disso, quando a HA é aquecida a 1050 °C converte-se parcialmente em  $\beta$ -TCP. (VALLET-REGI; GONZÁLEZ, 2004) A associação de HA +  $\beta$ -TCP recebe o nome de fosfato de cálcio bifásico (BCP). Sua implantação resulta em um equilíbrio químico entre a fase mais estável, a HA, e a fase propensa à reabsorção, o  $\beta$ -TCP. Como consequência, a mistura é gradualmente dissolvida no corpo humano, serve como um arcabouço para osso recém-formado e libera  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  para o meio. (DOROZHKIN, 2010; FONSECA et al., 2011)

A capacidade de troca de íons desses biomateriais permite projetar, desenvolver e caracterizar novos e melhores fosfatos de cálcio para aplicações específicas. Sabe-se que a taxa de regeneração do osso depende de vários fatores, tais como a porosidade, a composição, a solubilidade e a presença de certos elementos que, liberados durante a reabsorção do material cerâmico, facilitam a regeneração óssea. Assim, por exemplo, pequenas quantidades de estrôncio, zinco e silicatos podem estimular a ação dos osteoblastos e, em consequência, a formação de novo osso. (VALLET-REGI; GONZÁLEZ-CALBET, 2004)

O mecanismo de ação do  $\beta$ -TCP é dependente da alta concentração de cálcio e fósforo que melhora a sua osteointegração, inicia a biomineralização, estimula os osteoclastos e influencia a diferenciação fenotípica das células osteogênicas. Sob a forma cimento, são menos eficazes por falta da porosidade necessária ao crescimento ósseo, mas há uma maior eficiência se for utilizado no formato de grânulos, porque os espaços entre as partículas aumentam a porosidade da matriz e também a sua superfície de contato. (GUTIERRES et al., 2006)

Em um estudo, Apelt e colaboradores (2004), ao implantar grânulos de  $\beta$ -TCP e de brushita em ossos longos de ovelhas, em um período de 4 a 6 meses, confirmaram que o  $\beta$ -TCP foi totalmente incorporado a uma matriz osteoide neoformada; do mesmo modo, os achados de Neamat, Gawish e Gamal-Eldeen (2009), observaram essa incorporação ao avaliar, em 3 e 6 meses, a implantação de grânulos de um  $\beta$ -TCP<sup>1</sup> em mandíbulas de cães.

### 2.3.2 Biovidro ou vidro bioativo

Os vidros apresentam pouca ordenação em sua estrutura atômica e são cerâmicas amorfas, semelhantes a líquidos, porém, em temperatura ambiente se apresentam em estado sólido, em função de sua rigidez mecânica. O estado vítreo é definido quando, em determinado momento, uma substância chega a uma temperatura em que a estrutura sólida e a líquida estão em equilíbrio, ou seja, têm a mesma energia livre de Gibbs (Figura 4), e após o resfriamento as moléculas do

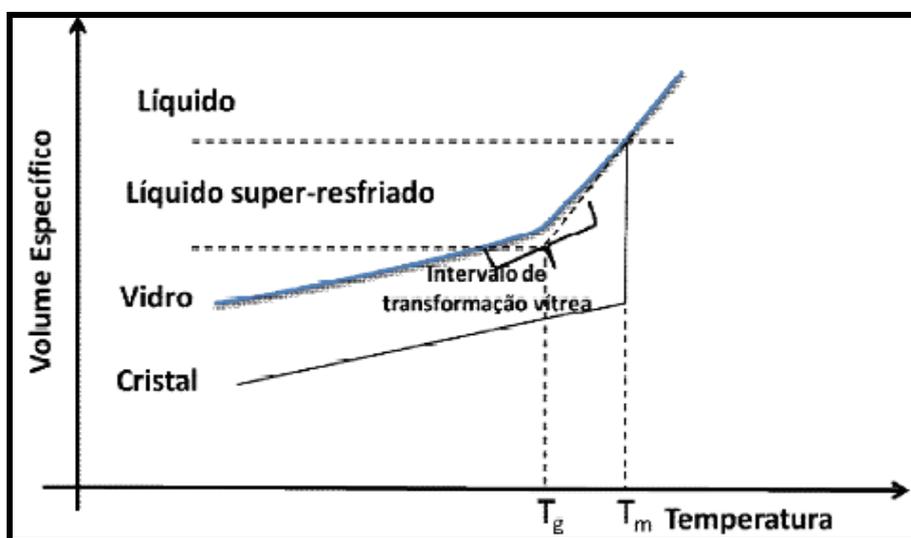
---

<sup>1</sup> Cerasorb®

material se reorganizam até se tornarem menos móveis e se comportam como um sólido. (CASTRO, 2006)

Os vidros bioativos ou biovidros para aplicação médica foram desenvolvidos por Larry Hench, no final da década de 1960. (HENCH, 2008) A principal característica desses biomateriais é a sua capacidade de promover uma rápida e durável ligação química, por uma interface com o tecido ósseo. (COSTA et al., 2003; GUTIERRES et al., 2006; TIOMIS et al., 2010)

**Figura 4** - Diagrama esquemático de volume específico x temperatura de um vidro



Fonte: Varshneya (2006).

Para a produção de um biovidro podem ser utilizadas diversas técnicas, dentre elas a fusão de diferentes pós de vidros, seguida de arrefecimento até à solidificação, sem que haja cristalização, e por via sol-gel. A escolha da técnica dependerá da composição química de cada biovidro. (GUTIERRES et al., 2006; CARLO et al., 2007)

Nos últimos anos, os biovidros têm ganhado destaque por serem biocompatíveis, bioativos e osteocondutores. (LIANG et al., 2008; LIMA et al., 2011) São compostos praticamente por sílica (silicatos) ou fósforos (fosfatados), sendo que os biovidros fosfatados são mais fáceis de fundir e quimicamente mais instáveis que os silicatos. (GUTIERRES et al., 2006)

Os biovidros, que possuem sílica em sua composição, ao entrar em contato com fluídos corporais, desencadeiam diversas reações químicas, seguidas, por dissolução e formação de um gel rico em sílica, recoberto por fosfato de cálcio, que posteriormente se cristaliza em hidroxicarbonato apatita. (ALMEIDA FILHO et al., 2000; CRUZ et al., 2006; SILVA, 2007; HENCH, 2008)

A habilidade de um biovidro se ligar ao tecido ósseo, sofrer biodegradação e formar uma camada superficial de apatita, varia em função da sua composição e relação com seus constituintes. (CARLO, et al., 2007) Os biovidros silicatos, por exemplo, têm alto nível de  $\text{Na}_2\text{O}$  e  $\text{CaO}$ , característica que os torna muito reativos quando colocados em meio aquoso. (GUTIERRES et al., 2006)

O biovidro silicato mais aplicado é o Bioglass 45S5<sup>®</sup>, desenvolvido por Hench (2008). Ele tem demonstrado formação mais rápida de osso do que a HA. No entanto, a baixa resistência mecânica também não permite a sua aplicação em locais de alta pressão. (GUTIERRES et al., 2006; HENCH, 2008)

Novos biovidros cerâmicos foram desenvolvidos de forma a manter as propriedades de osteocondução do Bioglass 45S5<sup>®</sup>, a melhorar a sua resistência e a permitir uma larga utilização, pela inserção de outros componentes químicos. Há um progresso também na fabricação de vidros fosfatados, em que o óxido formador de vidro é o  $\text{P}_2\text{O}_5$  em vez de  $\text{SiO}_2$ , o que os torna mais solúveis que os anteriores. (DA COSTA, et al., 2003; GUTIERRES et al., 2006; JONES, 2013) Os vidros que contém cálcio e fósforo na sua composição apresentam elevada bioatividade, que se evidencia pela formação de microcristais de hidroxiapatita na sua superfície, após contato com fluídos fisiológicos. Por essa razão, tais materiais são também bastante utilizados na engenharia do tecido ósseo. (ARAÚJO JÚNIOR, 2005)

Por muitos anos pensava-se que a formação de uma camada biologicamente ativa de hidroxicarbonato de apatita (HCA) superficial era requisito crítico para o comportamento bioativo (CARLO et al., 2007), mas estudos atuais mostram que a formação dessa camada de HCA é útil, mas não a fase crítica de reação para a regeneração óssea, sendo de imprescindível o controle das taxas de liberação de produtos iônicos de dissolução. O papel inicial do vidro bioativo é liberar concentrações críticas de íons biologicamente ativos, a fim de induzir a proliferação e diferenciação celular e ativar várias famílias de genes, como os que codificam fatores de transcrição nuclear e fatores de crescimento, especialmente IGF-II (induz

proliferação de osteoblastos), juntamente com IGF-ligante de proteínas e proteases que clivam o IGF-II. (HENCH, 2008)

A troca iônica que ocorre após implantação entre o biovidro e o meio biológico é importante para que o processo de dissolução do biovidro se estabilize e possibilite que os processos físico-químicos ocorram e formem ligações químicas entre a superfície vítrea e o tecido recém-formado. (HENCH, 2008), além de determinar o grau de reabsorção ou de incorporação das partículas vítreas na matriz óssea neoformada. (CRUZ, 2006; LIMA et al., 2011)

Alguns autores afirmam que a adição de vidros bioativos à hidroxiapatita estequiométrica, antes da sinterização, também demonstrou *in vivo* ser eficaz no aumento da degradação e no aumento da resistência da união osso-implante, quando comparada à hidroxiapatita pura. (SO; FUJIBAIASHI; NEO, 2006)

### 2.3.3 Apresentação do biomaterial

Os biomateriais podem ser produzidos nas mais diversas formas de apresentação (partículas – esferas e grânulos; blocos – discos; membranas, entre outras) e ter variadas composições. (ZÉTOLA, 2012) Aqueles que se apresentam em formato de microesferas preenchem o defeito ósseo e favorecem a migração celular, mas quando implantados isoladamente não são fáceis de manusear, não têm estabilidade mecânica no defeito ósseo e formam espaços vazios entre si, o que faz com que o biomaterial se desloque (RUPPRECHT et al., 2003; NIHOANNEN et al., 2006); quando implantados em defeitos críticos podem favorecer a formação de tecido fibroso. (O'KEEFE et al., 2006; KLENKE et al., 2008)

Os biomateriais que se apresentam em formato de bloco oferecem maior suporte para a migração celular, favorecem a angiogênese e preenchem todo o defeito, mesmo em tamanhos críticos. Porém, tendem a se deslocar facilmente da região do defeito e podem ter uma dissolução/fragmentação mais demorada. (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005)

Já os biomateriais em formato de grânulos apresentam maior área superficial e conseqüentemente maior energia livre de superfície; organizam-se em estrutura

semelhante a um mosaico, onde as partículas se agrupam para preencher quase todo o espaço intersticial; são estruturas tridimensionais que atuam como substitutos até o reparo/regeneração tecidual; sua bioreabsorção serve de suporte para a formação tecidual; e mimetizam o tecido adjacente. Mas esta organização espacial pode interferir na migração celular durante o reparo tecidual. (SCHEPERS; DUCHEYNE, 1997; BURG; PORTER; KELLAM, 2000)

O formato do biomaterial deve ser definido de acordo com o defeito ósseo. Reconstruções em altura, espessura ou ambas exigem arcabouços tridimensionais e suas partículas são apropriadas para preencher defeitos ósseos pré-existentes ou criados cirurgicamente. (ALBREKTSSON, 1980; PHILLIPS et al., 1992; PALLESEN et al., 2002)

Grânulos são comumente usados como materiais de enxerto ósseo em situações em que não é exigida carga mecânica. Em geral, a taxa de reabsorção de grânulos porosos é mais rápida do que os blocos porosos ou densos feitos do mesmo material. Os grânulos têm formatos aleatórios e são normalmente processados por fracionamento de blocos maiores. (GINEBRA et al., 2010)

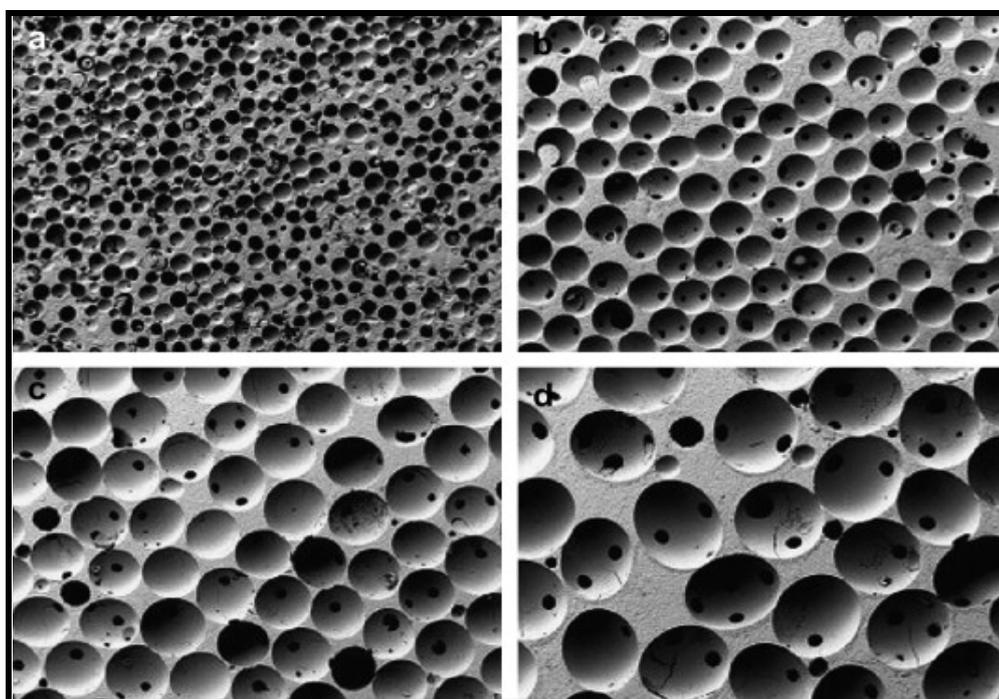
A forma e a distribuição de tamanho das partículas é um fator importante, uma vez que é conhecido que os grânulos muito variados podem provocar uma reação inflamatória ou de atraso na formação óssea. (HU, 2008; GINEBRA et al., 2010) Não há consenso na literatura em relação à distribuição de tamanho das partículas. Schepers e colaboradores (1993) propuseram que uma grande variação de distribuição do tamanho faz com que os grânulos menores ocupem os espaços entre as partículas maiores, o que reduz o interstício e o potencial regenerativo, devido à obstrução do espaço necessário para a migração celular e formação vascular. Porém, um estudo de Wheeler e colaboradores (1998) identificou que biomateriais com grande variação na distribuição do tamanho das partículas formam uma área de superfície maior, em relação a biomateriais com variação pequena, o que disponibiliza maior número de sítios de adesão para osteoblastos e favorece a regeneração óssea.

Além da variedade de formatos, os biomateriais podem se apresentar de forma densa ou porosa. A região esponjosa do tecido ósseo tem porosidade de 70-90% e de 5-10% no osso compacto. (BEST et al., 2008) A fim de mimetizar a geometria óssea, a porosidade e a morfologia dos arcabouços são fatores que

influenciam na indução do crescimento celular e na velocidade de degradação. (KARAGEORGIU; KAPLAN, 2005)

A penetração e o crescimento celular em arcabouços porosos estão intrinsicamente relacionados à distribuição e ao tamanho dos poros: quanto maior o tamanho do poro (macroporos), maior é a taxa de crescimento celular (KAWACHI et al., 2000; BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005), por causa da facilidade de difusão dos nutrientes e dos fluidos orgânicos locais (Figura 5). E quanto maior a espessura, menor a difusão dos produtos ácidos de degradação e conseqüentemente maior a velocidade de perda de massa. Vale ressaltar que o aumento da porosidade diminui a resistência mecânica do biomaterial. (KAWACHI et al., 2000) Já os poros muito pequenos auxiliam na inclusão de agentes reguladores ou fármacos, apresentam boa taxa de degradação, porém não possibilitam a infiltração celular. (MIKOS et al., 1993)

**Figura 5** - Cerâmicas porosas de  $\beta$ -TCP com diferentes tamanhos de poros e um diâmetro igual a: (a) 100-200  $\mu\text{m}$ , (b) 300-400  $\mu\text{m}$ , (c) 500-600  $\mu\text{m}$  e (d) 700-800  $\mu\text{m}$



Fonte: Descamps (2008)

Também não há um consenso sobre o tamanho ideal dos poros para que haja crescimento tecidual/celular, mas há uma concordância que esse tamanho depende do tecido que se deseja substituir, desde que exista uma comunicação entre eles;

isto porque essa comunicação facilita a vascularização e a remoção dos resíduos. (KARAGEORGIU; KAPLAN, 2005; KLENKE et al., 2008) O tamanho dos poros está diretamente relacionado com a formação óssea, uma vez que eles proporcionam espaço para a superfície e a adesão celular e o crescimento ósseo. As conexões entre os poros fornecem direcionamento para a migração e a distribuição das células e permitem a formação de novos vasos sanguíneos. (DOROZHKIN, 2010)

Os arcabouços com formato denso possuem força de compressão que proporciona estabilidade durante o reparo, porém, sua aplicação é limitada aos locais sem grande carga funcional e são menos solúveis em fluídos biológicos. (KAWACHI et al., 2000)

Muitos fosfatos de cálcio para aplicação clínica são encontrados em forma de cimentos. O termo cimentos de fosfato de cálcio (CPC) é descrito como uma mistura de pós que, ao adicionar uma solução aquosa, forma uma pasta que reage à temperatura-ambiente, precipita como cristais de fosfatos de cálcio e endurece pelo seu entrelaçamento, além de apresentar uma excelente osteocondutividade. (SCHMITZ; HOLLINGER; MILAM, 1999; BOHNER; GBURECK; BARRALET, 2005; MOTISUKE, et al., 2005; XU et al., 2006) No entanto, a falta de macroporosidade para crescimento ósseo e a baixa resistência têm limitado o uso clínico dos CPC. Mas há tentativas de se desenvolver matrizes porosas a fim de facilitar a infiltração celular e o crescimento interno de tecido. (DRIESSENS et al., 2002; XU et al., 2006)

Durante sua fabricação, os biomateriais utilizados neste estudo - grânulos de  $\beta$ -TCP e de  $\beta$ -TCP+BV - foram submetidos ao processo de sinterização. A sinterização é um tratamento térmico aplicado em algumas cerâmicas que pode acarretar diminuição da área de superfície, aumento da fase cristalina, da porosidade e das propriedades mecânicas. (ROSA; SHAREEF; VAN NOORT, 2000) Além disso, a umidade, os carbonatos e todos os resíduos químicos voláteis, como a amônia, os nitratos e os compostos orgânicos, são removidos na forma de gases. (DOROZHKIN, 2010)

As pesquisas com biomateriais visam a recuperar danos decorrentes de situações clínicas em que há perdas ósseas extensas, com comprometimento funcional e/ou estético e psicológico, e a melhorar a qualidade de vida e a inserção social dos indivíduos. Sempre que esses biomateriais são produzidos é necessário

avaliar suas interações, quando em contato com células e/ou tecidos. Assim, estudos *in vivo* utilizando defeitos ósseos críticos possibilitam estudar a biocompatibilidade, bem como o potencial osteogênico dos biomateriais. Desse modo, é de se esperar que os biomateriais compostos de  $\beta$ -TCP e de  $\beta$ -TCP associados a um biovidro fosfatado, após implantação em defeitos ósseos, sejam biocompatíveis e biodegradáveis, e que o biovidro aumente a bioatividade do  $\beta$ -TCP, de forma a ter uma boa aplicabilidade clínica.

# *Objetivos*

### 3 OBJETIVOS

- Avaliar se o formato dos biomateriais favorece o reparo ósseo.
- Analisar o reparo ósseo após implantação de grânulos de  $\beta$ -TCP e de  $\beta$ -TCP + biovidro.
- Avaliar a biocompatibilidade e a biofuncionalidade dos biomateriais para a regeneração de defeitos ósseos.
- Comparar o efeito da adição do biovidro ao  $\beta$ -TCP para a regeneração óssea, quanto à osteoformação, à osteocondução e à bioatividade.
- Avaliar se o formato dos biomateriais favoreceu o reparo ósseo.

*Metodologia*

## 4 METODOLOGIA

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas no Uso de Animais (CEUA), do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia (ICS-UFBA), sob o protocolo 038/2012, e seguiu as Normas Éticas de Pesquisas em Animais (Lei nº. 11.794 de 2008), bem como as Normas Nacionais de Biossegurança e as diretrizes do Instituto Nacional de Saúde para o cuidado e uso de animais de laboratório (NIH Publicação n<sup>o</sup> 85-23 Rev. 1985).

Os procedimentos cirúrgicos e a eutanásia foram realizados no Biotério Central da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

### 4.1 AMOSTRA

Foram utilizados 15 ratos (*Rattus norvegicus* Wistar), albinos, machos, com peso entre 350 a 400 gramas, fornecidos pelo biotério da UEFS. Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, para composição de três grupos: GTP (preenchimento com grânulos de <sup>2</sup>-TCP); GTP-BV (preenchimento com grânulos de <sup>2</sup>-TCP + biovidro); e CON (defeito vazio, preenchimento apenas com o coágulo sanguíneo); portanto, atribuiu-se 5 animais a cada grupo, em um ponto biológico de observação de 15 dias pós-operatório.

**Quadro 3** - Distribuição dos animais de acordo com os grupos, no ponto biológico de 15 dias, sendo **GTP** Grânulos de <sup>2</sup>-TCP e **GTP-BV** Grânulos de <sup>2</sup>-TCP + Biovidro, **CON** Controle – sem implantação de biomaterial, preenchimento apenas com coágulo sanguíneo

Grupos	Animais
GTP	5
GTP - BV	5
CON	5
<b>Total</b>	<b>15</b>

Fonte: Elaboração da autora.

## 4.2 BIOMATERIAIS

Os biomateriais (grânulos de  $^2$ -TCP e grânulos de  $^2$ -TCP-BV) utilizados neste estudo foram produzidos, caracterizados e cedidos pelo Laboratório de Cerâmicas do Instituto Militar de Engenharia (IME, RJ).

### 4.2.1 Grânulos de biovidro a base de fosfato de cálcio

O biovidro utilizado neste trabalho foi projetado para ter a seguinte composição (em MOL): 60%  $P_2O_5$ , 20% CaO e 20%  $CaF_2$ . A fonte do  $P_2O_5$  utilizada foi o ácido ortofosfórico ( $H_3PO_4$ ), enquanto a fonte de CaO foi o carbonato de cálcio ( $CaCO_3$ ), e utilizou-se o fluoreto de cálcio puro.

A homogeneização dos reagentes químicos para a produção do vidro bioativo foi feita em uma placa com agitação magnética por 24 horas, seguida de secagem em estufa a 60 °C por 6 horas. A mistura foi fundida a 1400°C, usando um cadinho de platina, com patamar de 2 horas e taxa de aquecimento de 5 °C por minuto, em um forno<sup>1</sup>, no Laboratório de Materiais Cerâmicos (IME) (PINTO; SILVA, 2012)

O fundido foi retirado rapidamente do forno e vertido para um recipiente contendo água destilada. Assim, formaram-se grânulos de vidro (frita). A frita foi triturada em um moinho de bolas<sup>2</sup>. Posteriormente, as partículas do vidro bioativo foram classificadas em um sistema de peneiras da série *Tyler*, para então selecionarem-se partículas com distribuição de tamanhos inferiores a 20 µm (500 Mesh). O vidro bioativo foi peneirado em fluxo contínuo de álcool etílico para facilitar a passagem do material pela peneira. (SILVA et al., 2011)

---

<sup>1</sup> Modelo LF914, JUNG®

<sup>2</sup> Modelo MA 350, MARCONI®.

#### 4.2.2 Grânulos de $\beta$ -TCP

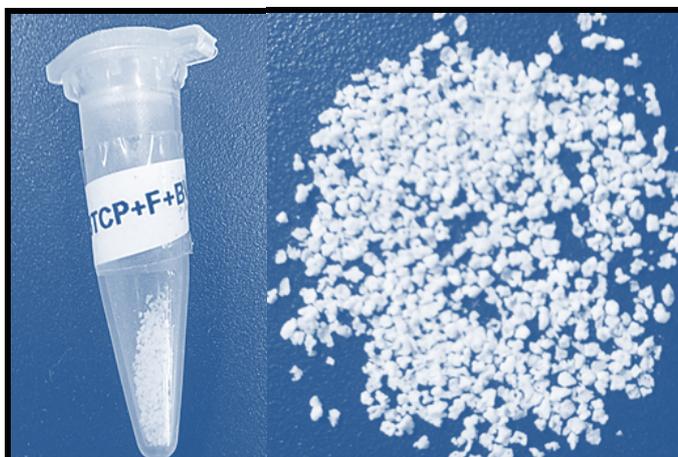
Os grânulos foram fabricados pelo método de deposição hidrotérmica, onde esponjas poliméricas de fosfato de cálcio foram imersas em uma solução rica em íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ , com razão molar  $\text{Ca/P}=1,67$ , a  $80^\circ\text{C}$ , com trocas durante três dias até a completa deposição de monetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) em sua superfície.

Após a deposição, foi realizada a etapa de conversão alcalina, onde as esponjas recobertas pela monetita foram imersas em solução  $\text{KOH}$  a  $60^\circ\text{C}$  por 24 horas. Após essa etapa, foram levadas ao forno e aquecidas até  $900^\circ\text{C}$ , onde a esponja polimérica foi volatilizada, dando origem ao arcabouço cerâmico poroso de hidroxiapatita. Após esse tratamento térmico, parte da hidroxiapatita se decompôs em fosfato tricálcico do tipo beta ( $\beta$ -TCP). (SILVA et al., 2008; SILVA; APARECIDA; BRAGA, 2010; SILVA et al., 2011)

À metade do material produzido, foram adicionados 5% do biovidro de fosfato de cálcio ( $\text{P}_2\text{O}_5\text{CaOCaF}_2$ ). Por fim, todos os materiais (com e sem biovidro) foram sinterizados a  $1200^\circ\text{C}$  para consolidação da estrutura cerâmica. Os arcabouços formados foram posteriormente fragmentados e classificados, utilizando-se peneiras na faixa de 0,5 a 0,7mm.

Em seguida, os grânulos de  $\beta$ -TCP e de  $\beta$ -TCP+BV foram acondicionados em *ependorfs*, com alíquota de 24g em cada, e esterilizados por irradiação de raios gama a 15K Gy (Figura 6).

**Figura 6** - Acondicionamento do biomaterial em *ependorfs* e imagem dos grânulos



**Fonte:** Fotos da autora.

### 4.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Para realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos à sedação e anestesia geral com injeção intramuscular de cloridrato de xilazina<sup>1</sup> (0,04 mL/100 g de peso corporal) e cloridrato de cetamina<sup>2</sup> (0,1 mL/100 g de peso corporal), respectivamente (Figura 7A). Em seguida, foi feita a tricotomização na região da cabeça (Figura 7B) e antissepsia do campo operatório com álcool iodado (Figura 7C). Depois, os animais foram posicionados em decúbito ventral para início da cirurgia na calvária. (CARDOSO et al., 2006; MIGUEL et al., 2006)

Uma incisão cutânea bicoronal, com média de 3 cm foi realizada, com lâmina de bisturi nº 15, na linha média que se estende da protuberância occipital externa até a altura das orelhas (Figura 7D). O tecido subcutâneo foi divulsionado com uma tesoura reta de ponta romba para afastamento dos músculos temporais e interescutulares e elevação do retalho. O periósteo foi incisado e afastado com auxílio de uma espátula nº 07 e pinça clínica. Removeu-se um fragmento ósseo, com média de 8,5mm de diâmetro e aproximadamente 0,8 mm de espessura, da porção mediana dos ossos parietais, juntamente com a dura-máter, por meio de uma broca trefina média<sup>3</sup>, com 8 mm de diâmetro interno e 0,5 mm de espessura, associada a um contra-ângulo<sup>4</sup> com redução de 1:16 e com o auxílio de um motor<sup>5</sup> de 1500 rpm (Figuras 7E e 7F). (MIGUEL et al., 2006; ROLIM, 2010)

Os biomateriais foram implantados (média de 8 g por animal), de acordo com seus respectivos grupos experimentais (Figura 7G), exceto para o grupo controle; após procedimento cirúrgico, suturou-se o tecido subcutâneo e a pele com um fio de seda 4.0, com pontos simples (Figura 7H). Durante o período pós-operatório, os animais ficaram mantidos em caixas plásticas de 40x60x18 cm, receberam ração sólida<sup>6</sup> e água *ad libitum*, e foram mantidos com placa de identificação do peso corpóreo inicial, do grupo e da data de cirurgia e de sacrifício. (CARDOSO et al., 2006; MIGUEL et al., 2013); foi administrado o analgésico Paracetamol, na dose de 80mg/kg/dia, durante dois os dias pós-cirúrgicos. No ponto biológico de 15 dias pós-

---

<sup>1</sup> Dopalen, Ceva®

<sup>2</sup> Anasedan, Ceva®

<sup>3</sup> AOTEC®

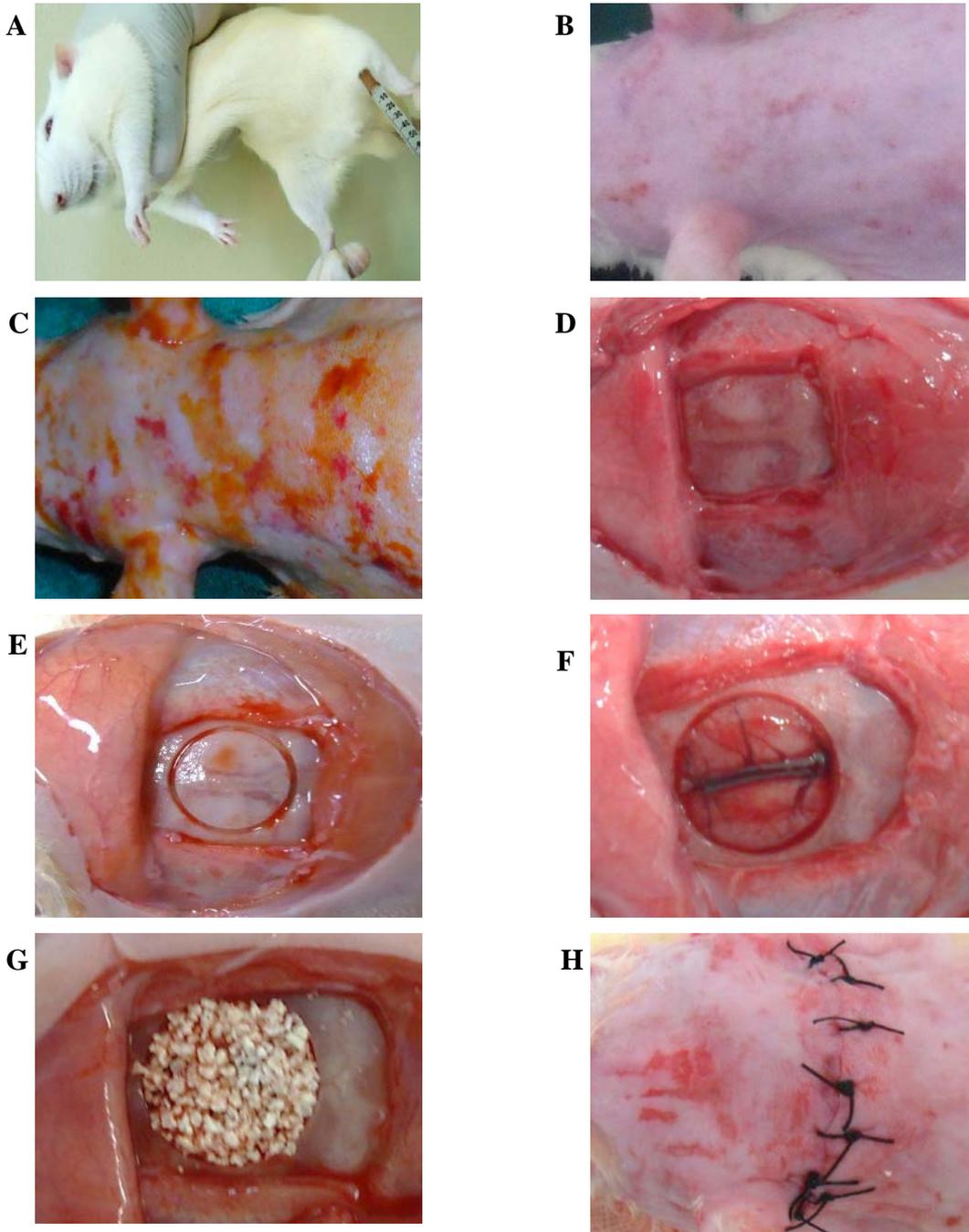
<sup>4</sup> 20.1 PB, Driller®

<sup>5</sup> BLM 600 Plus, Driller®

<sup>6</sup> Nuvital, Quimtia®

operatório, os animais foram eutanasiados, com injeção de dose letal de anestésico de cloridrato de cetamina<sup>1</sup>. Logo após, removeu-se a calvária (Figura 8A) e os tecidos moles, com auxílio de alicate de corte, tesoura e espátula nº 7. As peças foram fixadas em formalina tamponada a 4% e mantidas em coletores plásticos por 72 horas (Figura 8A).

**Figura 7** - Passo a passo do procedimento cirúrgico e remoção da calvária.



**Fonte:** Fotos da autora.

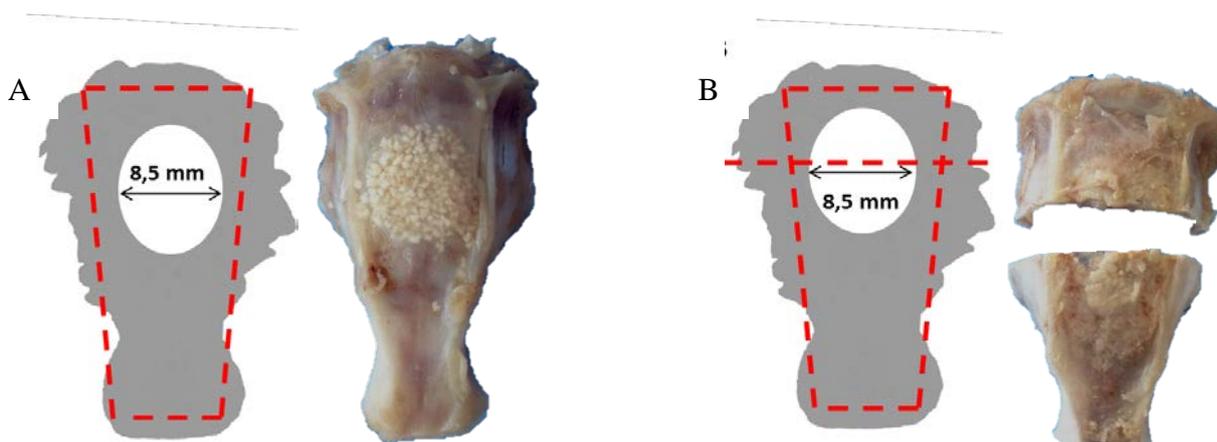
**Legenda:** (A) anestesia intramuscular; (B) tricotomia na região da cabeça; (C) antissepsia do campo operatório com álcool iodado (D) incisão cutânea bicoronal para divulsionar o tecido subcutâneo, afastar os músculos temporais, interescutulares e elevar o retalho; (E) marcação do defeito com a

broca trefina média; (F) remoção do fragmento ósseo; (G) preenchimento do defeito com biomaterial de acordo com o grupo – exceto para o grupo CON; (H) sutura do tecido subcutâneo.

#### 4.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

O processamento das peças ocorreu no Instituto de Patologia Geral e Cutânea (IPAC). Após a fixação, as peças foram reduzidas nas regiões laterais e inferior e divididas em duas porções, sendo 2/3 anterior e 1/3 posterior (Figura 8A e B), com um motor rotativo com discos de carborundum nº 409<sup>1</sup>. (MIGUEL et al., 2006) A porção anterior será destinada à inclusão em resina (armazenada para estudos futuros) e a porção posterior destinada à inclusão em parafina.

**Figura 8** - (A) Calvária removida após sacrifício e redução das regiões laterais e inferiores; (B) Divisão da calvária em porção anterior e posterior.



**Fonte:** Esquemas e fotos da autora.

A peça da porção posterior (Figura 8B), em formato retangular, foi descalcificada com ácido nítrico a 7%, durante 7 dias, com troca do ácido a cada 24 horas, em cabine de fluxo laminar<sup>2</sup>, conforme o *Manual de biossegurança e boas práticas laboratoriais* (BPLS). Depois as calvárias foram processadas em processador automático de tecido<sup>3</sup>, de acordo com os protocolos de rotina.

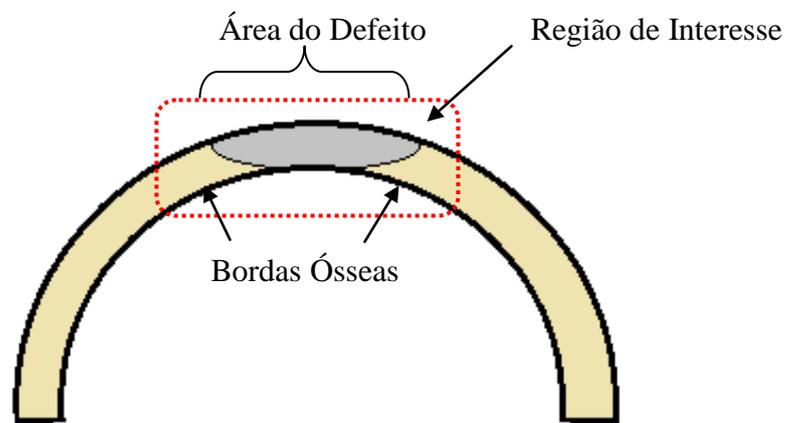
<sup>1</sup> MultiPro 395CT, Dremel®

<sup>2</sup> FLV-M CL II-A, Trox Technik®

<sup>3</sup> TP 1020, Leica®

Após a inclusão em parafina, os blocos foram cortados de forma seriada, em um micrótomo<sup>1</sup> com 7 $\mu$ m de espessura e depois os cortes histológicos (Figura 9) foram submetidos às técnicas rotineiras de coloração hematoxilina-eosina (HE) para avaliação histológica e picrossírius-red (PIFG) para identificação de proteína colagênica. A análise dos cortes histológicos foi realizada por microscopia óptica de campo claro. (BRAZ et al., 2003; MIGUEL et al., 2006)

**Figura 9** – Desenho esquemático da disposição em que os cortes histológicos foram realizados.



**Fonte:** Elaboração da autora.

---

<sup>1</sup> RM 2255, Leica®

## *Resultados*

## 5 RESULTADOS

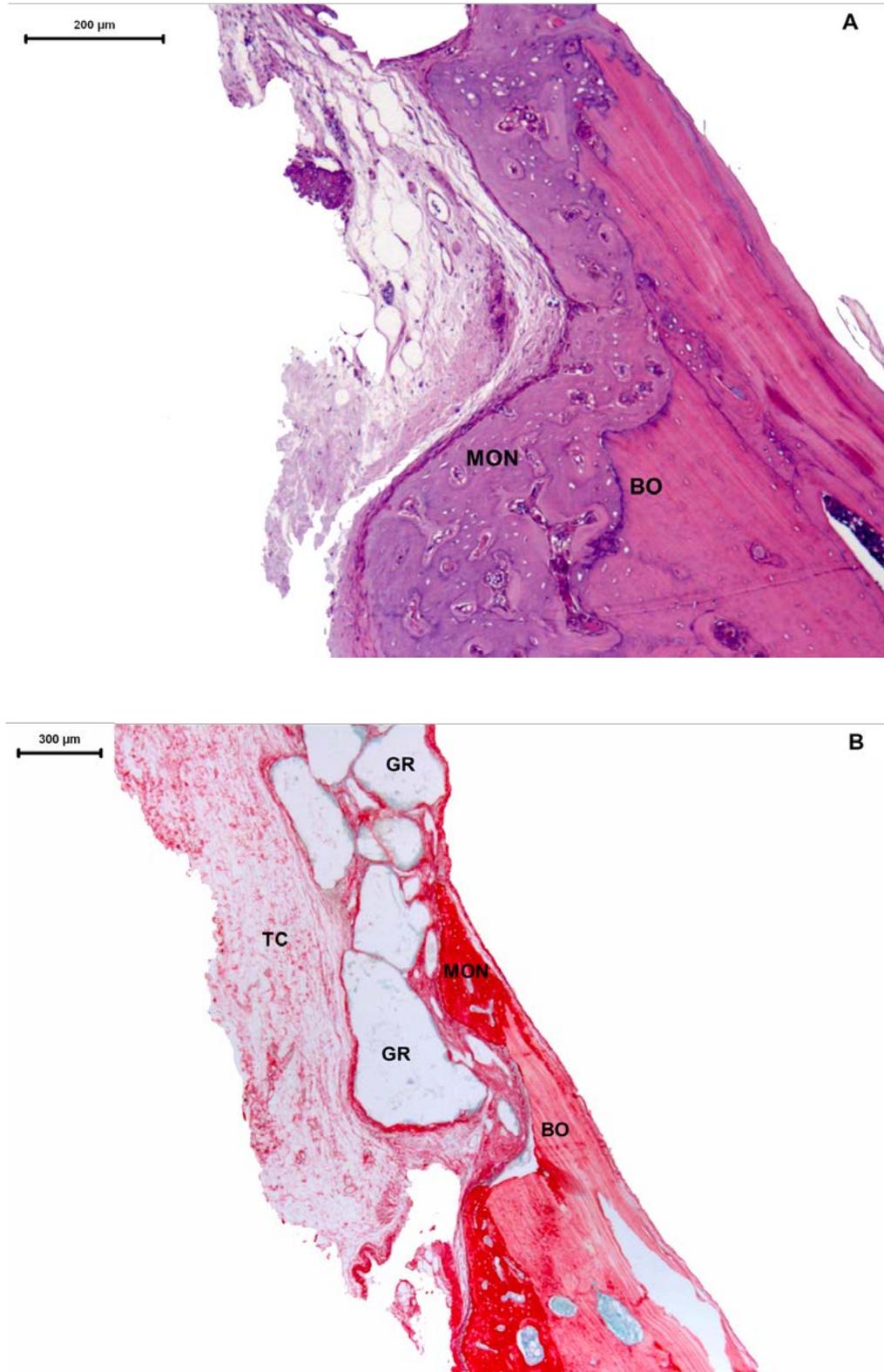
No ponto biológico de observação deste estudo, de 15 dias pós-operatório, nas regiões das bordas ósseas do defeito, de todos os grupos, evidenciou-se a neoformação de matriz osteoide (Figuras 10A, 10B e 11A). Nos grupos GTP e GTP-BV, ocorreram a formação da matriz osteoide entre as partículas, em direção centrípeta, próximas à dura-máter (Figuras 12A, 12B, 13A e 13B), enquanto que no grupo CON essa neoformação foi restrita às regiões de borda (Figura 10A).

Nos grupos em que houve a implantação dos biomateriais, toda a extensão do defeito foi completamente preenchida pelos grânulos (Figura 14A). Estes grânulos foram removidos durante o processamento histológico, restando apenas espaços vazios, com resíduos dos biomateriais (Figura 16A). O formato desses espaços é homogêneo, com distribuição em duas a três camadas e espessura similar ao tecido ósseo adjacente. No grupo com, a região foi preenchida por um tecido conjuntivo fibroso, com espessura inferior ao osso remanescente (Figura 11B).

Em todos os grupos, o estroma formado na área de preenchimento do defeito consiste em um tecido conjuntivo frouxo em GTP e GTP-BV (Figura 15B) e fibroso em CON (Figura 15A), com abundante neoformação vascular, proliferação de fibroblastos e células fusiformes mesenquimais (Figuras 17A e 17B). Nos grupos GTP e GTP-BV, o tecido conjuntivo se apresenta pouco edemaciado, mas com a formação de septos delgados de tecido fibroso circuncidando as partículas do biomaterial (Figuras 16A e 16B).

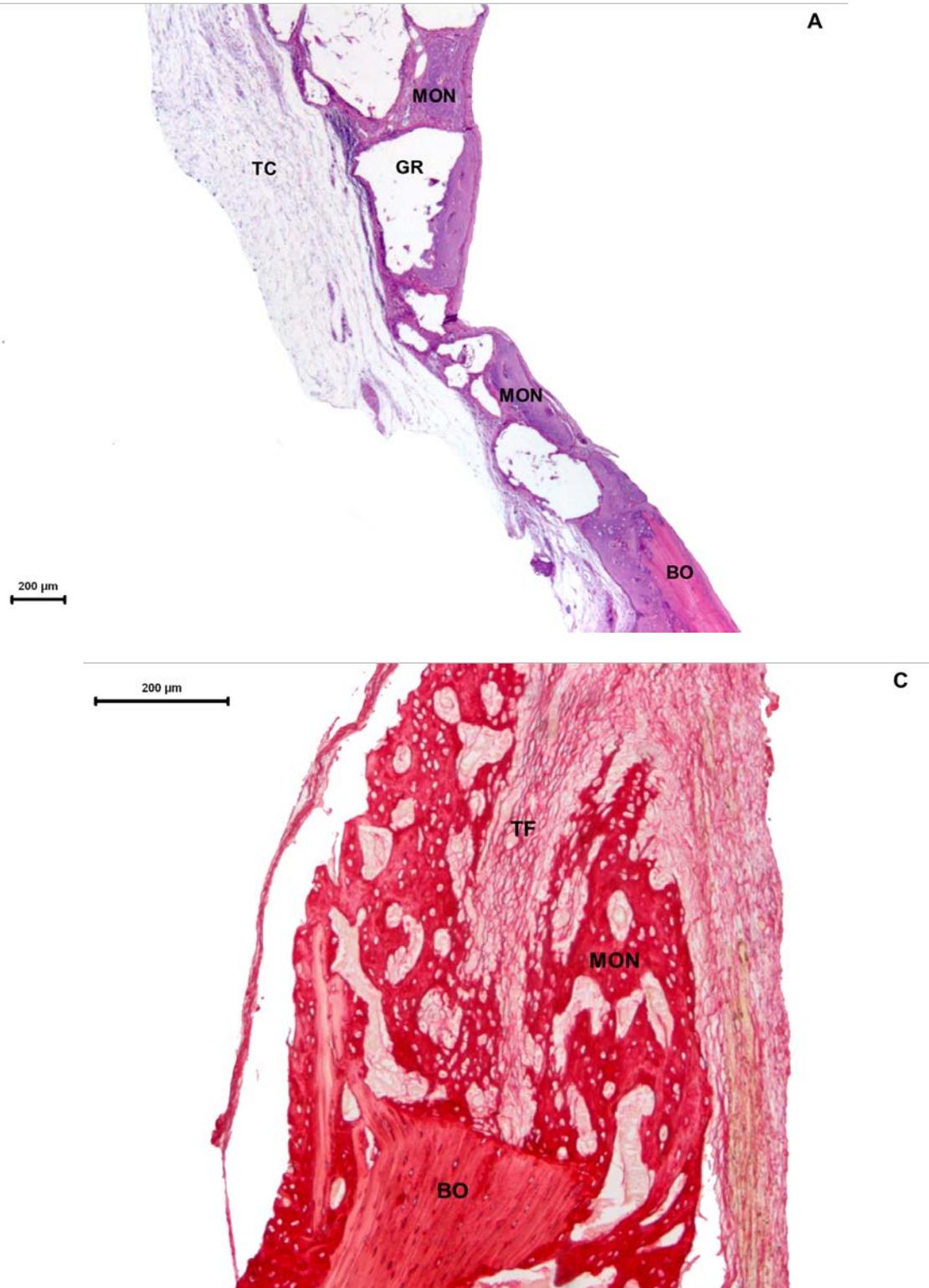
No estroma de todos os grupos, observou-se infiltrado inflamatório mononuclear (IFM), que variou de discreto a moderado, distribuído de forma difusa (Figuras 13B, 18A e 18B). Nos grupos GTP e GTP-BV houve uma discreta reação inflamatória granulomatosa, com células gigantes multinucleadas (CG), em torno das partículas dos biomateriais (Figuras 18A e 18B).

**Figura 10** - (A) GTP-BV - matriz osteoide neoformada (MON) próxima à borda óssea do defeito (BO) – Hematoxilina e Eosina (HE). (B) GTP – borda óssea (BO), matriz osteoide neoformada (MON), preenchimento do defeito pelo biomaterial (GR) e por tecido conjuntivo frouxo (TC) - Picrossírius-Red (PIFG)



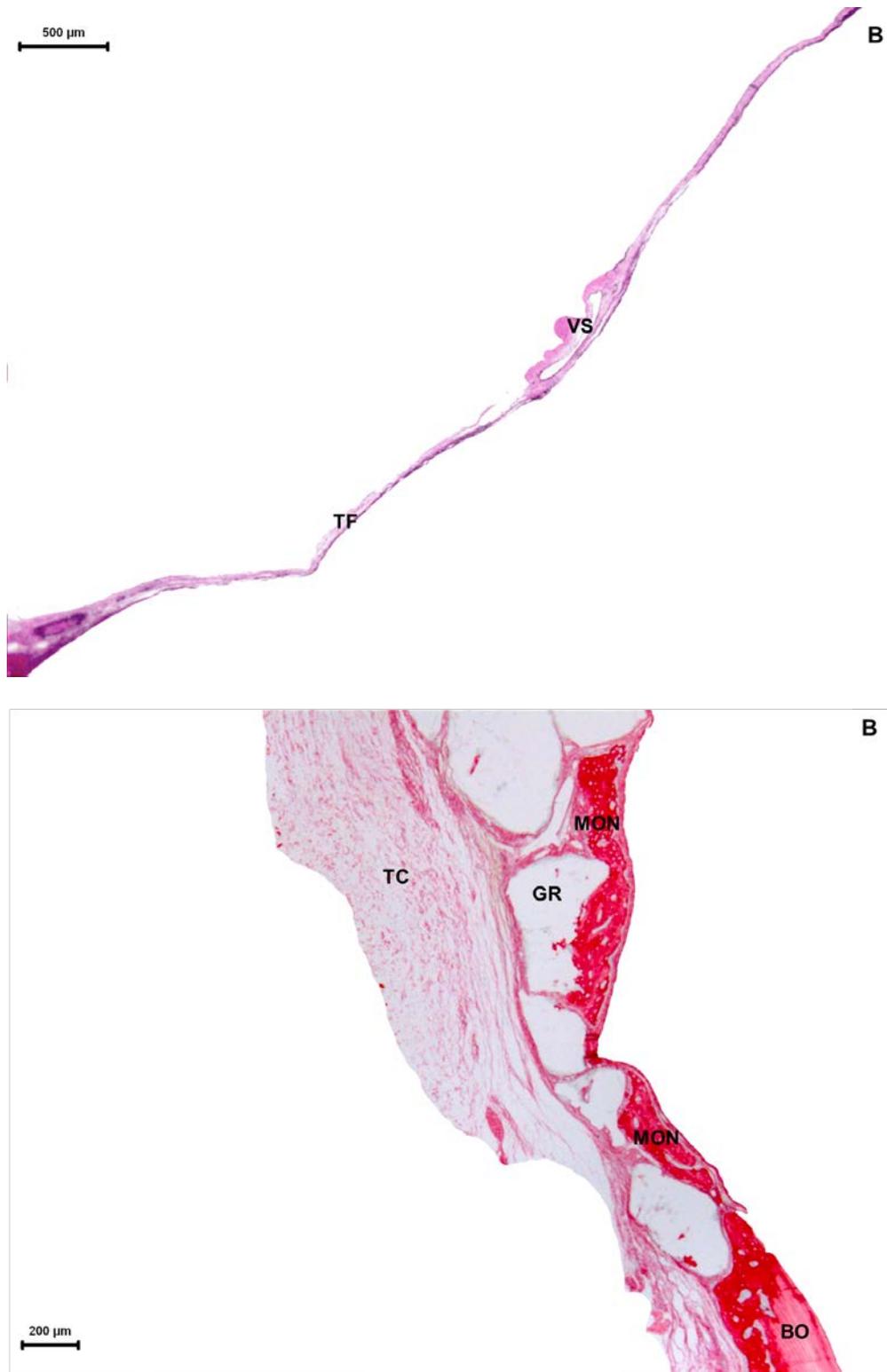
**Fonte:** Elaboração da autora.

**Figura 11** - (A) CON – matriz osteoide neoformada (MON) restrita a região de borda óssea (BO) - (PIFG). (B) CON - preenchimento de toda extensão do defeito por um tecido conjuntivo fibroso (TF), com espessura inferior ao osso remanescente. Vaso sanguíneo (VS) no centro de defeito – (HE)



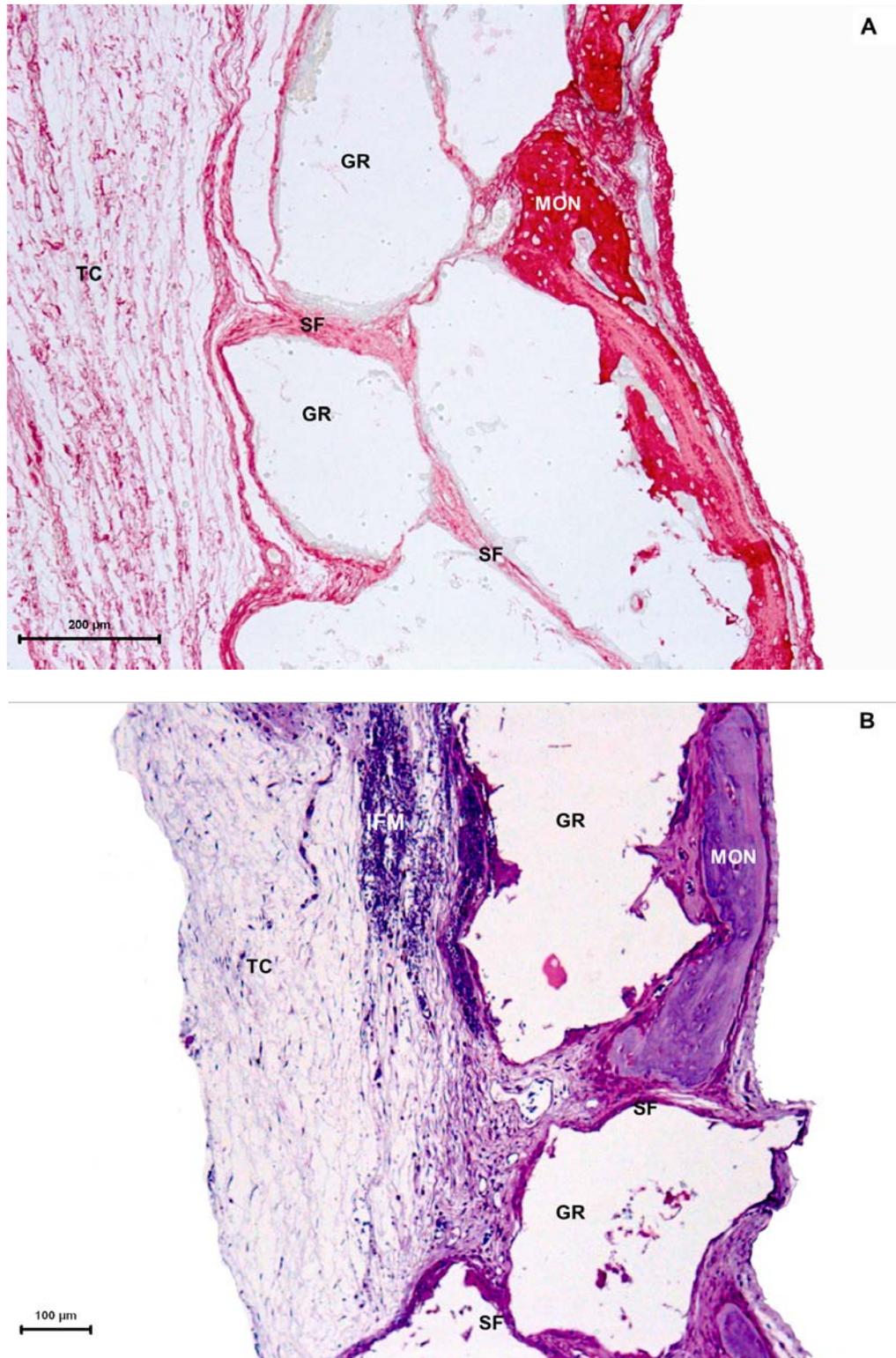
Fonte: Elaboração da autora.

**Figura 12 -** (A e B) GTP-BV - matriz osteóide neoformada (MON) próxima à borda óssea do defeito (BO) e entre as partículas, em direção centrípeta. Preenchimento do defeito pelo biomaterial (GR) e por tecido conjuntivo frouxo (TC) – (HE / PIFG)



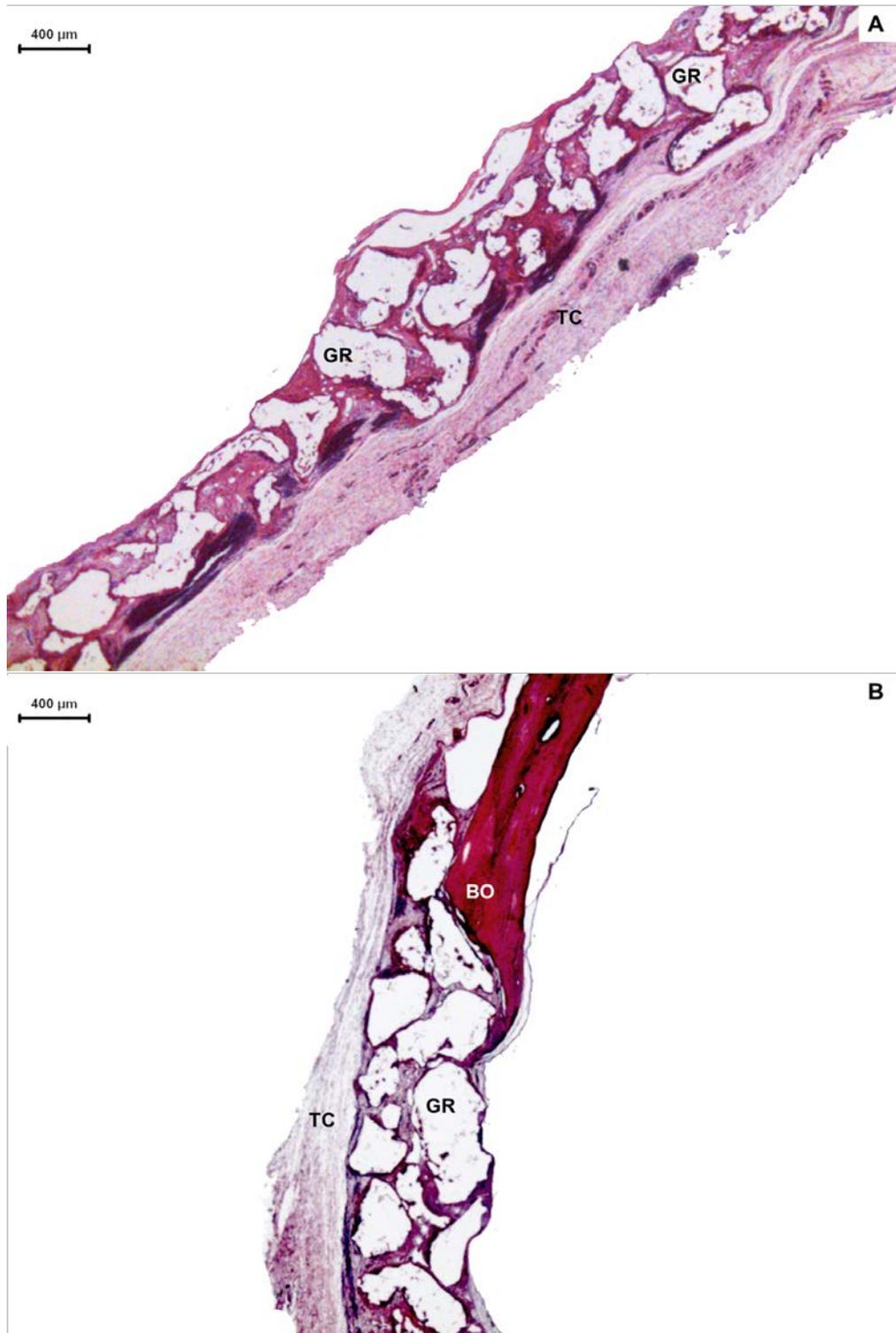
**Fonte:** Elaboração da autora.

**Figura 13** - (A e B) GTP-BV – neoformação de matriz osteoide (MON) entre as partículas do biomaterial, em direção centrípeta. Preenchimento do defeito pelos grânulos do biomaterial (GR) e por tecido conjuntivo frouxo (TC), com formação de septos de tecido fibroso (SF) entre as partículas. (B) – Presença de discreto infiltrado inflamatório mononuclear, distribuído de forma difusa – (PIFG / HE)



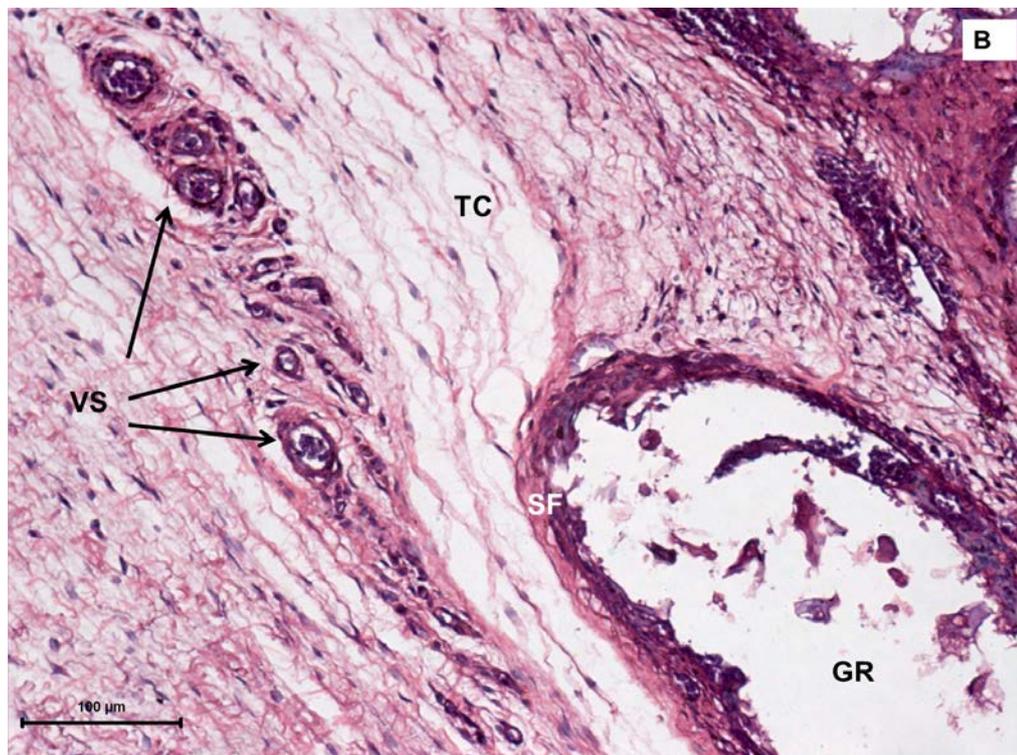
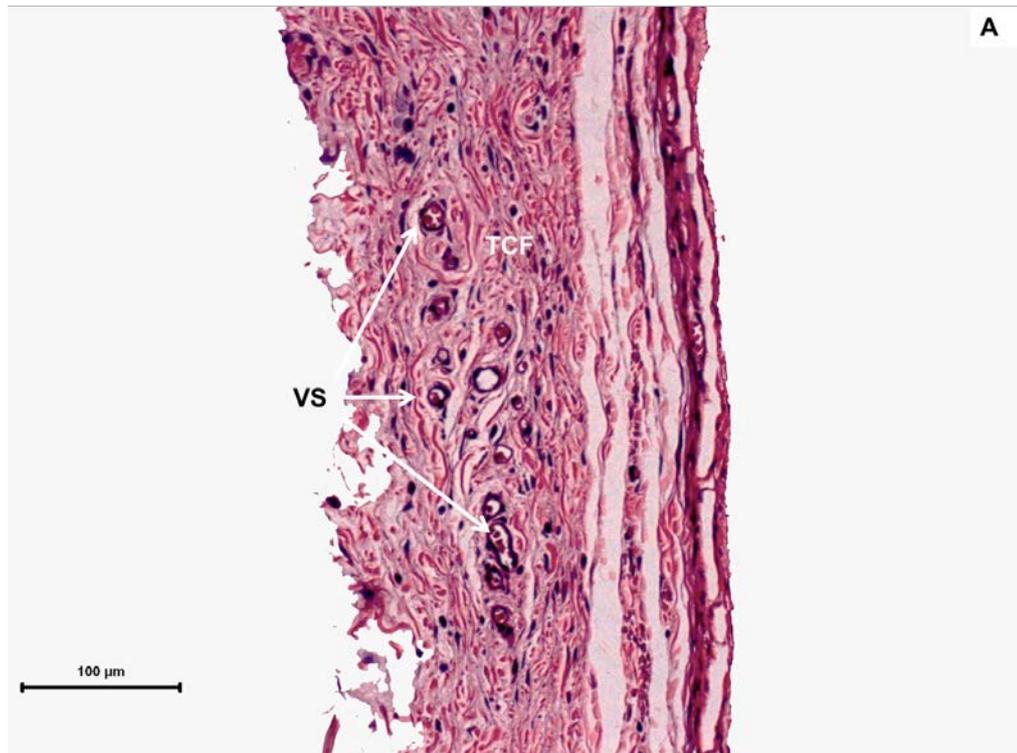
**Fonte:** Elaboração da autora.

**Figura 14** - (A) GTP-BV – preenchimento de toda extensão do defeito pelos grânulos do biomaterial (GR) e por tecido conjuntivo frouxo (TC). Espaços deixados pelos grânulos (GR) de tamanho pouco desigual, com distribuição em duas a três camadas – (HE). (B) GTP – preenchimento de toda extensão do defeito pelos grânulos do biomaterial (GR) e tecido conjuntivo frouxo (TC) com espessura similar a borda óssea adjacente – (HE)



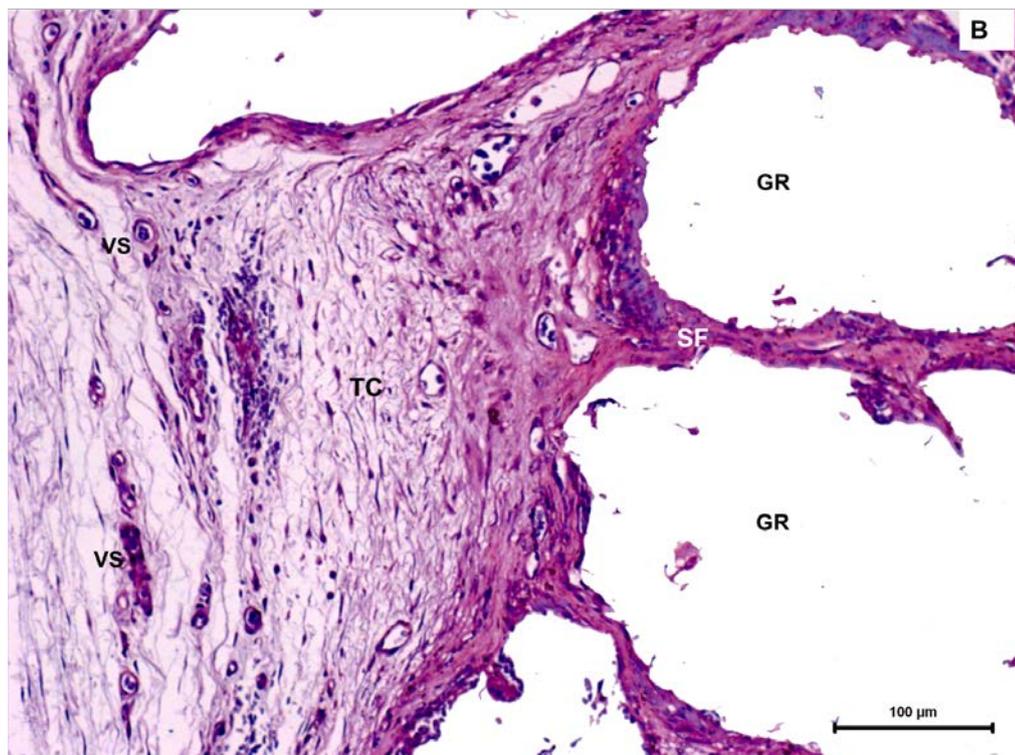
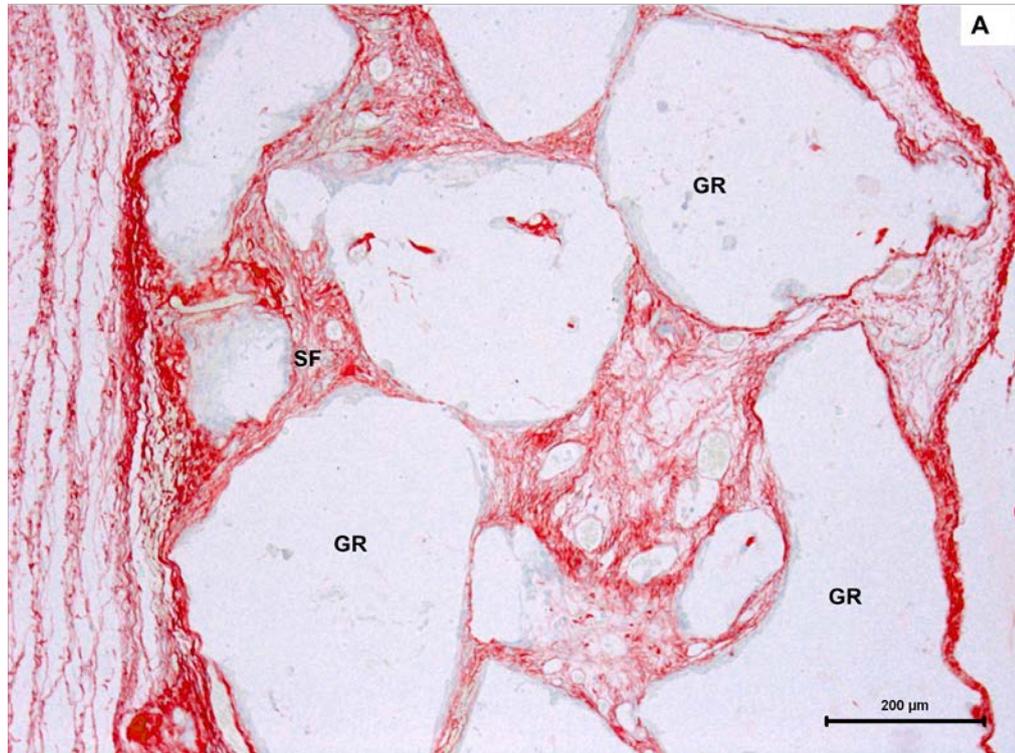
**Fonte:** Elaboração da autora.

**Figura 15 -** (A) CON – preenchimento de toda extensão do defeito por um tecido conjuntivo frouxo (TC) com abundante neoformação vascular (VS) – (PIFG). (B) GTP – preenchimento do defeito por tecido conjuntivo frouxo (TC), pouco edemaciado, bem vascularizado (VS), com proliferação de células fusiformes e com formação de septos fibrosas (SF) circundando as partículas do biomaterial (GR) – (HE)



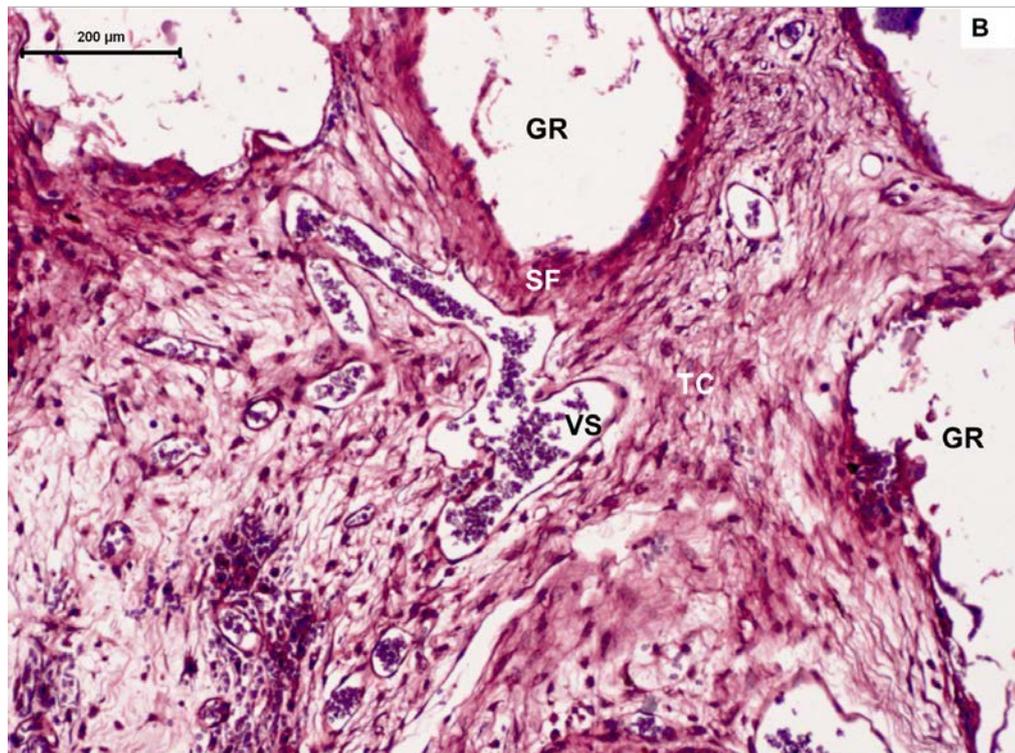
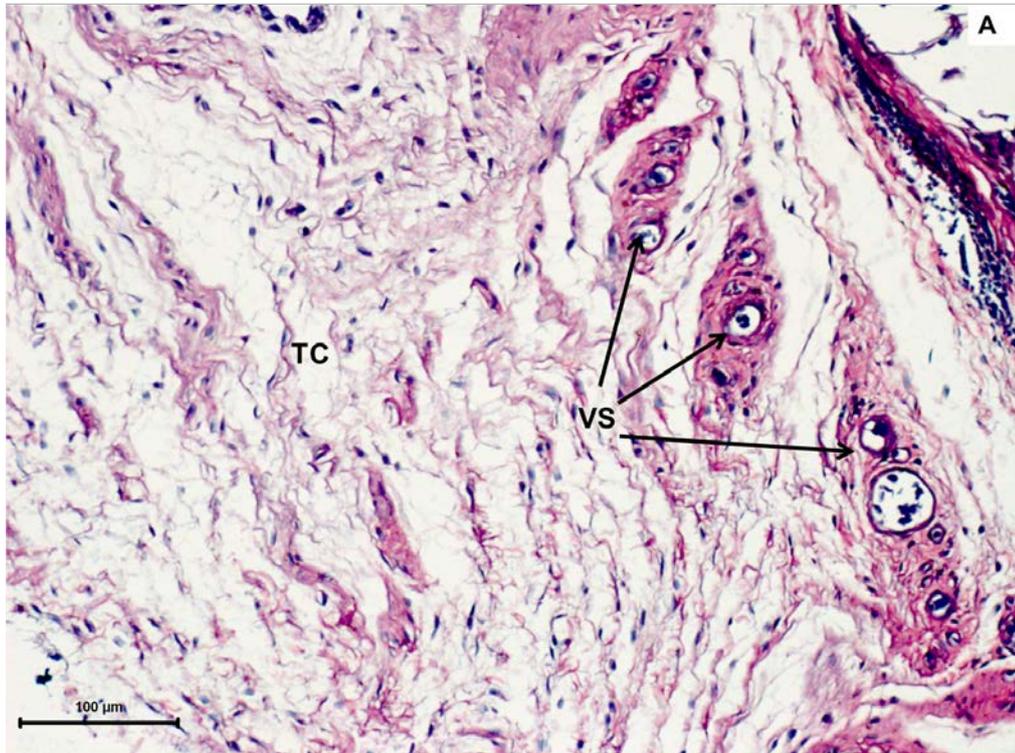
**Fonte:** Elaboração da autora.

**Figura 16** - (A e B) GTP-BV – organização dos grânulos (GR) no defeito com formação de septos de tecido fibroso, preenchendo o interstício entre as partículas. Presença de tecido conjuntivo frouxo (TC) altamente vascularizado (VS) – (PIFG / HE)



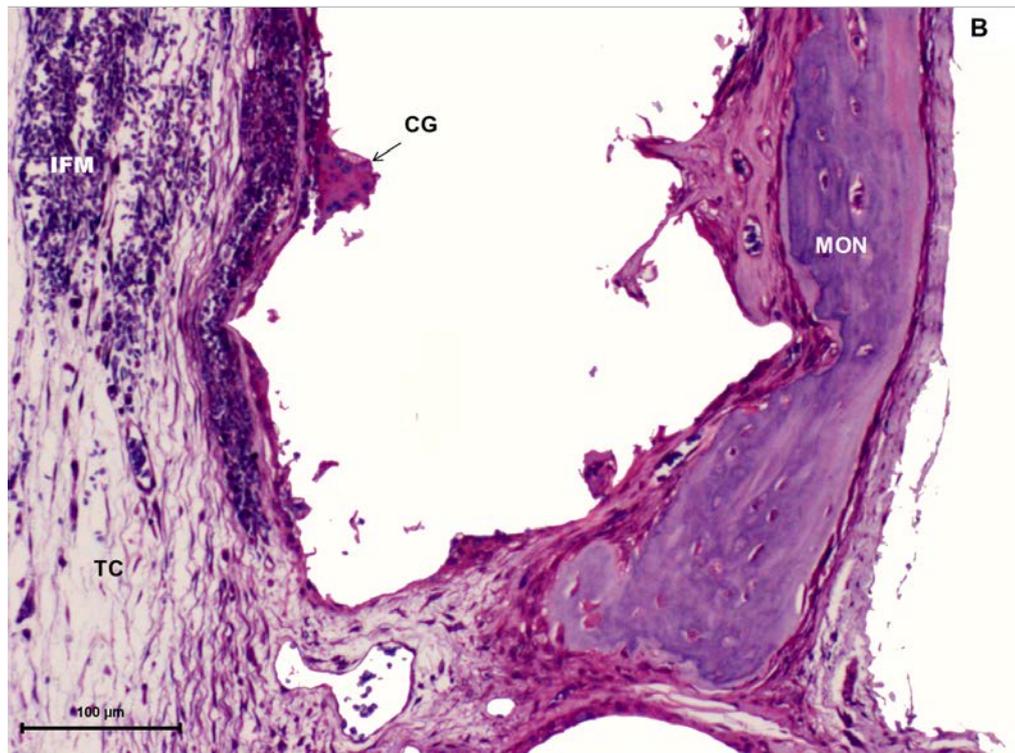
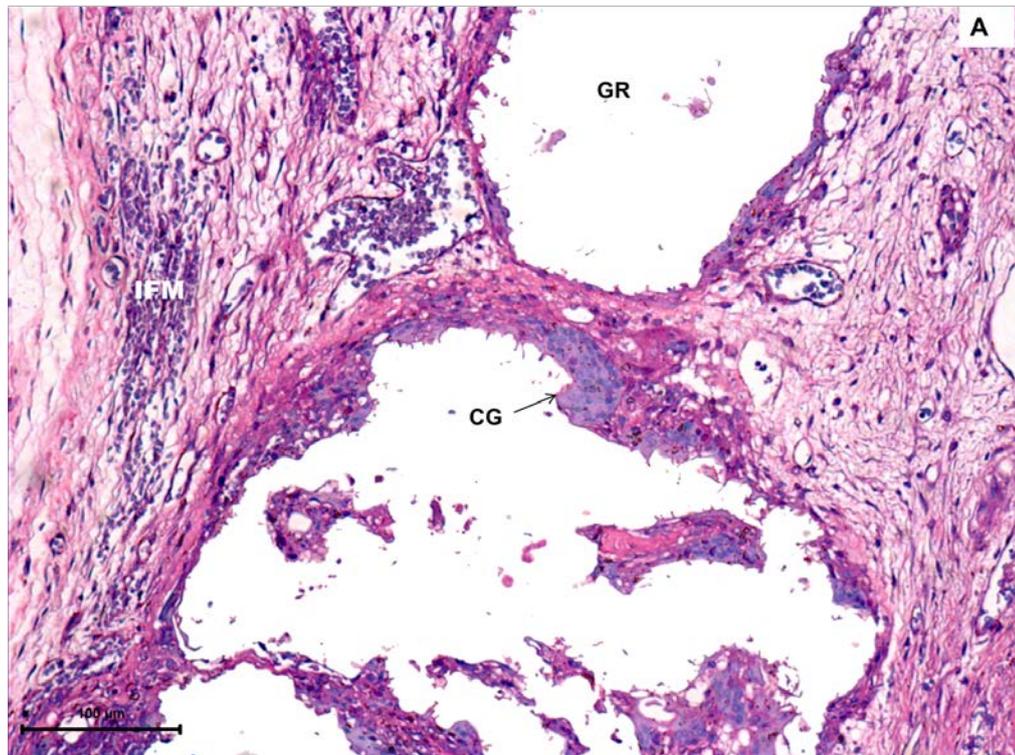
**Fonte:** Elaboração da autora.

**Figura 17 -** (A) GTP – Estroma na área de preenchimento do defeito. Presença de tecido conjuntivo frouxo (TC), pouco edemaciado, com muitos vasos sanguíneos (VS), proliferação de fibroblastos e células fusiformes mesenquimais – (HE). (B) – Grânulos do biomaterial (GR) envolvidos por septos de tecido fibroso (SF). Presença de tecido conjuntivo frouxo (TC) com abundante neoformação vascular (VS) – (HE)



**Fonte:** Elaboração da autora.

**Figura 18** - (A e B) GTP-BV - presença de infiltrado inflamatório mononuclear (IFM) distribuído de forma difusa. Presença de discreta reação inflamatória granulomatosa, com células gigantes multinucleadas (CG), em torno das partículas dos biomateriais. Neoformação de matriz osteóide (MON) entre as partículas do biomaterial (GR) – (HE)



**Fonte:** Elaboração da autora.

*Discussão*

## 6 DISCUSSÃO

A busca de um biomaterial tridimensional adequado para auxiliar a regeneração óssea em situações de perda tecidual extensa ainda está em curso e é um desafio para as áreas de saúde, visto que esses defeitos não se regeneram espontaneamente. Embora tenham sido alcançados grandes avanços, ainda não foram obtidos arcabouços que apresentem todas as propriedades físico-químicas necessárias à sua utilização na regeneração tecidual. As propriedades devem ser avaliadas sempre que um biomaterial é desenvolvido. Requerem ensaios *in vitro*, para avaliar a cito-compatibilidade e *in vivo* para estudar as interações teciduais, previamente à sua aplicação clínica, visto que o método de fabricação, a composição química e o formato do biomaterial estão diretamente relacionados com a biocompatibilidade, a osteocondutividade, a bioatividade, o potencial osteogênico, a resistência mecânica e a taxa de degradação, entre outros.

Nos estudos experimentais, essa perda tecidual extensa é observada quando se utiliza defeito ósseo crítico, em que não há a implantação de arcabouço e nem aplicação de outra terapia regenerativa. Os resultados encontrados no presente estudo servem para ratificar o modelo utilizado de defeito crítico. Nesta situação, o reparo ósseo é caracterizado pela neoformação de matriz osteoide, restrita às regiões das bordas ósseas remanescentes por um processo reacional, e toda a extensão do defeito é preenchida por uma delgada camada de tecido conjuntivo fibroso. Esse tipo de reparo pode decorrer da lesão causada pelo procedimento cirúrgico, que estimula as células osteoprogenitoras presentes no periósteo e no endósteo do osso circunjacente a se proliferarem e a se diferenciarem em osteoblasto, para produzir a matriz óssea. (JONES, 2013) Ademais, fatores de crescimento podem ser liberados para atrair células fusiformes mesenquimais e para induzir a diferenciação em fibroblastos e, por conseguinte, para sintetizar o tecido conjuntivo fibroso. (MIGUEL et al., 2013) Em razão das especificidades dessa resposta, em particular, e pela ausência de um suporte estrutural, o tecido fibroso que se forma apresenta uma espessura reduzida em relação às dimensões do tecido ósseo pré-existente.

Em contrapartida, nos grupos em que houve implantação de biomaterial (grupos GTP e GTP-BV), os grânulos atuaram como arcabouços, preenchendo todo

o defeito; e as partículas se organizaram em uma configuração tridimensional e permaneceram na região de implante, ou seja, não foi degradado no ponto biológico de observação. Este fato pode ter sido decorrente do processo de sinterização a que os biomateriais foram submetidos. A sinterização pode favorecer a cristalização de parte do biomaterial, o que diminui a sua taxa de biodegradação. A faixa de tamanho dos grânulos utilizados (0,5 a 0,7 mm) evitou que as partículas muito pequenas ocupassem os espaços entre as maiores, o que poderia reduzir o interstício e o potencial regenerativo, devido à obstrução do espaço necessário para a migração celular e formação vascular. (SCHEPERS et al., 1993; BURG; PORTER; KELLAM, 2000) Permeando esse biomaterial para preencher os espaços, formou-se um tecido conjuntivo frouxo que, em contraste ao grupo controle, tem espessura similar ao osso pré-existente, com projeção de septos fibrosos no interstício entre as partículas. Dessa forma, a organização espacial do biomaterial com o tecido conjuntivo de preenchimento fornece suporte estrutural para a proliferação de células e para o mecanismo de reparo ósseo. Esses dados estão em consonância com diversos estudos (CRUZ, 2004; RIBEIRO; BARRIAS; BARBOSA, 2006; VOLKMER; SANTOS, 2007; HABIBOVIC, 2008), assim como com outros trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa. (CARDOSO et al., 2006; BARRETO, 2008; PAULA, 2008; CARVALHO, 2010; ROLIM, 2010)

Nos grupos em que ocorreu a implantação de biomaterial (GTP e GTP-BV), a neoformação óssea se estendeu da região das bordas em continuidade às partículas próximas. Esta característica está associada à propriedade de osteocondução decorrente da presença de partículas do biomaterial. Essas áreas de mineralização estavam em regiões próximas à dura-máter, fonte primária de células osteogênicas e de fatores osteoindutivos. (COOPER et al., 2010) A osteocondução também foi observada por outros autores ao utilizar o  $\beta$ -TCP. (APELT et al., 2004; NEAMAT; GAWISH; GAMAL-ELDEEN, 2009) Entretanto, no presente estudo não foi identificada neoformação óssea na região central do defeito, o que evidencia que os biomateriais não são osteoindutores. Jensen e colaboradores (2006), em um estudo com defeitos criados em mandíbula de miniporcos, observaram que o  $\beta$ -TCP teve uma neoformação óssea mais lenta do que o osso autógeno nas fases iniciais de cicatrização, de duas semanas. E ao final de oito semanas, os defeitos regeneraram completamente. Por outro lado, a neoformação óssea em toda extensão de defeito

crítico, em pontos biológicos iniciais, foi observada por outros estudos, quando o  $\beta$ -TCP foi aplicado em forma de cimento. (CONSTANTZ, 1998; GAUTHIER et al., 1999; MALARD et al., 1999) Não houve diferença do reparo tecidual entre os grupos em que houve implantação dos biomateriais, o que evidencia que a adição do biovidro ao  $\beta$ -TCP não aumentou sua solubilidade e bioatividade quando avaliados no ponto biológico de 15 dias pós-operatório, caracterizado como fase inicial do reparo de um defeito crítico; nesse modelo experimental, o fato pode ter sido decorrente do processo de sinterização que, por sua vez, pode ter modificado a organização estrutural do biovidro, de um biomaterial amorfo para um biomaterial com pontos de cristalização. Este processo pode se modificar em pontos de observação mais longos.

Neste estudo, no período inicial de reparo, observou-se em todos os grupos um discreto infiltrado inflamatório crônico mononuclear, que pode ter se originado da liberação de citocinas e mediadores químicos, após a lesão tecidual e vascular que desencadeiam uma cascata de reações inflamatórias. (ROSA et al., 2003; ANDERSON; KAMATH et al., 2008; RODRIGUES; CHANG, 2008) Nos grupos experimentais, em que houve a implantação dos biomateriais, ocorreu uma reação inflamatória do tipo corpo estranho. Na inflamação crônica granulomatosa, notou-se a presença de células gigantes multinucleadas em torno das partículas. Essas células normalmente estão associadas à tentativa de reabsorção dos biomateriais. (ALBREKTSSON, 1980; PHILLIPS et al., 1992; APELT et al., 2004; CRUZ, 2004) A intensidade dessas respostas inflamatórias está relacionada com as características morfológicas e físico-químicas dos biomateriais. A fase crônica é essencial para determinar a biocompatibilidade do biomaterial e o tipo de reparo tecidual. (ANDERSON, 1988; PHILLIPS et al., 1992; HU et al., 2001; MOONEY et al., 2011) A reação inflamatória também foi observada em outros estudos do nosso grupo. (BARRETO, 2006; MIGUEL et al., 2006; PAULA, 2008; CARVALHO, 2010; ROLIM, 2010; MIGUEL, et al., 2013)

Finaliza-se afirmando que os achados do presente estudo são essenciais para o entendimento dos processos que acontecem na fase inicial do reparo ósseo, após implantação de biomateriais e para avaliar previamente a sua biocompatibilidade e o seu potencial osteogênico.

*Conclusões*

## 7 CONCLUSÕES

Para as condições experimentais deste estudo, conclui-se que:

- Nos grupos experimentais, houve um reparo tecidual em extensão e espessura, enquanto que no grupo controle a espessura foi aquém, quando comparada ao osso remanescente;
- A neoformação óssea foi incipiente e relacionada a um processo reacional em todos os grupos e com maior extensão nos grupos com implantação de biomateriais;
- Os biomateriais  $\beta$ -TCP e  $\beta$ -TCP+BV foram biocompatíveis;
- Os grânulos de  $\beta$ -TCP e  $\beta$ -TCP+BV apresentaram potencial osteocondutor, sem diferenças entre eles;
- A adição do biovidro não aumentou a bioatividade do  $\beta$ -TCP;
- Os grânulos atuaram como arcabouços tridimensionais.

## *Referências*

## REFERÊNCIAS

ALBREKTSSON, T. In vivo studies of bone grafts. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, Copenhagen, v. 51, p. 9-17, 1980.

ALMEIDA FILHO, E. et al. Biomateriais: deposição de hidroxiapatita sobre superfície de Ti-cp modificada por aspersão térmica. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1229-1232, 2007.

ANDERSON, J. M. Inflammatory response to implants. **ASAIO Transactions**. Nova York, v. 34, n. 2, p. 101-7, 1988.

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

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

ANDRADE, L. R. Biomateriais utilizados em Bioengenharia ortopédica. **Estudos de Biologia**, Curitiba, v. 28, n. 63, p. 17-23, 2006.

APELT, D. et al. In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements. **Biomaterials**, Guildford, n. 25, ed. 7-8, p. 1439-1451, 2004.

ARAÚJO JÚNIOR, J. V. **Compósitos polímero/fosfato de cálcio para aplicações biomédicas**, 2005. 134 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro, Universidade de Aveiro. .

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

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

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

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

BOHNER, M.; GBURECK, U.; BARRALET, J. E. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: A critical assessment. **Biomaterials**, Guildford, v. 26, n. 33, p. 6423-6429, 2005.

BONASSAR, L. J.; VACANTI, C. A. Tissue engineering: the first decade and beyond. **Journal of Cellular Biochemistry Supplement**, New York, v. 30/31, p. 297-303, 1998.

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

BROWN, G. D. et al. Hydroxyapatite cement implant for regeneration of periodontal osseous defects in humans. **Journal of Periodontology**, Indianapolis, v. 69, p. 146-157, 1998.

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

CARDOSO, A. K. M. V. et al. Histomorphometric analysis of tissue responses to bioactive glass implants in critical defects in rat calvaria. **Cells Tissues Organs**, Basel, v. 184, n. 3-4, p. 128-137, 2006.

CARLO, E. C. et al. Avaliação do efeito osteoindutor da hidroxiapatita e do biovidro implantados em tecido subcutâneo de cão. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 54, n. 316, p. 492-500, 2007.

CARLO, R. J. del et al. Potencial osteoindutor da matriz óssea homóloga desmineralizada de coelho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 3, p.533-538, 2003.

CARRODÉGUAS, R. G. Hydrothermal method for preparing calcium phosphate monoliths. **Materials Research**, São Carlos, v. 6, n. 3, 2003.

CARVALHO, A. A. **Reparo ósseo de defeito crítico em calvária de rato com microesferas de hidroxiapatita e selante de fibrina**. 2010. 120 f. Dissertação (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

CASTRO, W. B. Ligas solidificadas rapidamente: ciência, tecnologia e aplicações. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, vol.1, n.1, p. 37-44, 2006.

CONSTANTZ, B. R. et al. Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites. **Journal of Biomedical Materials Research**, Hoboken, v. 43, n. 4, p. 451-461, 1998.

COOPER, M. G. et al. Testing the “critical-size” in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-sized defect (CSD). **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v. 125, n. 6, p. 1685-1692, 2010.

COSTA, E. da et al. Biovidros: sinterização de biovidros na forma de partículas e do tipo espuma. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n. 30, 2003.

COSTA, R. C. C.; MIGUEL, F. B.; ROSA, F. P. Estratégias de bioengenharia tecidual na reconstrução óssea. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 4, n. 1, p. 70-76, 2005.

CRUZ, A. C. C. **Caracterização físico-química e avaliação de biocompatibilidade de biovidros - estudo laboratorial e histomorfométrico em ratos**. 2004. 123 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual de Ponta Grossa.

CRUZ, A. C. C.; SILVA, J. C. Z.; PILATTI, G. L.; SANTOS, F. A.; Utilização de vidros bioativos como substitutos ósseos: revisão de literatura. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 287-295, 2006.

DESCAMPS, M. et al. Manufacture of macroporous b-tricalcium phosphate bioceramics. **Journal European Ceramic Society**, Brighton, v. 28, n. 1, p.149-57, 2008.

DÖRING, H.; SCHMITT, C.; LUTZ, R.; EITNER, S.; SCHLEGEL, K.A. Bone substitutes used for three-dimensional augmentation. **International Journal of Stomatology and Occlusion Medicine**, Vienna, v. 6, n. 4, p. 144-150, 2013.

DOROZHKIN, S. V. Bioceramics of calcium orthophosphates. **Biomaterials**, Guildford, v. 21, n. 7, p. 1465-1485, 2010.

DRIESSENS, F. C. M. et al. The Ca/P range of nanoapatitic calcium phosphate cements. **Biomaterials**, Guildford, v. 23, n. 19, p. 4011-4017, 2002.

DUARTE, T. S. et al. Osteointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães. Aspectos histológicos. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 5, p. 849-853, 2006.

FERREIRA, L. M. **Avaliação da biocompatibilidade de diferentes biomateriais aplicados na substituição óssea: revisão de literatura**. 2010. 25 f. (Trabalho de Conclusão de Curso) - Odontologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

FISHER, J. O.; REDDI, A. H. Functional tissue engineering of bone: signals and scaffolds. In: ASHAMMAKHI, N. FERRETTI, P. (Ed.). **Topics in tissue engineering**. Helsinki: University of Oulu, 2003. v. 1

FONSECA, F. M.; SILVA, M. H. P.; LOURO, L. H. L.; COSTA, C. R. C. Fabricação de biocerâmicas porosas de hidroxiapatita por gelcasting. **Revista Militar de Ciências e Tecnologia CMCT**, Rio de Janeiro, v. 28, p. 33- 41, 1º trim. 2011.

GAUTHIER, O. et al. Kinetic study of bone ingrowth and ceramic resorption associated with the implantation of different injectable calcium-phosphate bone substitutes. **Journal of biomedical materials research**, Hoboken, v. 47, n. 1, p. 28-35, 1999.

GINEBRA, M. P. et al. New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine. **Acta Biomaterialia**, Oxford, v. 6, n. 8 p. 2863-2873, 2010.

GINEBRA, M.P.; TRAYKOVA, T.; PLANELL. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 113, n. 2, p. 102-110, 2006.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 6, p. 1352-1358, 2010.

GUTIERRES, M. et al. Substitutos ósseos: conceitos gerais e estado actual. **Arquivos de Medicina**, Porto, v. 19, n. 4, p. 153-162, 2006.

HABIBOVIC, P. et al. Osteoconduction and osteoinduction of lowtemperature3D printed bioceramic implants. **Biomaterials**, Guildford, v. 29, n. 7, p. 944-953, 2008.

HENCH, L. L.; JONES J. R. **Biomaterials, artificial organs and tissue engineering**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2008.

HU, P.T.W. Surface chemistry influence implant biocompatibility. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 8, n. 4, p. 270-280, 2008.

HU, W. et al. Molecular basis of biomaterial-mediated foreign body reactions. **Blood**, New York, v. 98, n. 4, p. 1231-1238, 2001.

JENSEN, S. S. et al. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. **Clinical oral implants research**, Copenhagen, v. 17, n. 3, p. 237-43, 2006.

JONES, J. R. Review of bioactive glass: from hench to hybrids. **Acta Biomaterialia**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 4457-4486, 2013.

JUDAS, F. et al. **Estrutura dinâmica do tecido ósseo**. Coimbra: Faculdade de Medicina, 2012. Texto de apoio, mestrado integrado em Medicina, disciplina Ortopedia.

JULIEN, M. et al. Physico-chemical–mechanical and in vitro biological properties of calcium phosphate cements with doped amorphous calcium phosphates. **Biomaterials**, Guildford, v. 28, n. 6, p. 956-965, 2007.

KAMATH, S. et al. Surface chemistry influences implant-mediated host tissue responses. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, Hoboken, v. 86, n.3, p. 617-26, 2006.

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

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

KLENKE, F. M. et al. W. Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo. **Journal Biomedical Materials Research**, Hoboken, Parte A, v. 85, n. 3, p. 777-786, 2008.

- LEGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clinical orthopaedics and related research**, Philadelphia, n. 395, p. 81-98, 2002.
- LIANG, W. et al. Bioactive borate glass scaffold for bone tissue engineering. **Journal of Non-Crystalline Solids**, Amsterdam, v. 354, n. 15-16, p. 1690-1696, 2008.
- LIMA, C. J. et al. Resposta do tecido subcutâneo de camundongos à implantação de um novo biovidro à base de óxido de nióbio. **Revista Matéria**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 1, p. 574-582, 2011.
- LIU, C.; XIA, Z.; CZERNUSZKA, J. T. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. **Chemical Engineering Research and Design.**, Elmsford, v. 85, n. 7, p. 1051-1064, 2007.
- LIU, Y.; TAN, Y.; SHENG, X.; Nucleation and growth of needle-like fluorapatite crystals in bioactive glass–ceramics. **Journal of Non-Crystalline Solids**, Amsterdam, v. 354, n. 10-11, p. 938-944, 2008.
- MALARD, O. et al. Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth, ceramic resorption, and inflammatory reactions: preliminary in vitro and in vivo study. **Journal of Biomedical Materials Research**, Hoboken, v. 46, n. 1, p. 103-111, 1999.
- MIGUEL, F. B. et al. Regeneration of critical bone defects with anionic collagen matrix as scaffolds. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, London, 2013. No prelo
- MIGUEL, F.B. et al. Morphological assessment of the behavior of threedimensional anionic collagen matrices in bone regeneration in rats. **Journal of biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials**, Hoboken, v. 78, n. 2, p. 334-339, 2006.
- MIKOS, A. G. et al. Prevascularization of porous biodegradable polymers. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 42, n. 6, p. 716-723, 1993.
- MORAIS, J. M.; PAPADIMITRAKOPOULOS, F.; BURGESS, D. J.; Biomaterials/tissue interactions: possible solutions to overcome foreign body response. **The AAPS Journal**, Arlington, v. 12, n. 2, p. 188-196, 2010.
- MOTISUKE, M. et al. Fosfatos de cálcio para reconstituição buco-maxilo-crânio-facial. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA UNICAMP, 6., 2005. Disponível em: <<http://www.feq.unicamp.br/~cobeqic/tPO31.pdf>>. Acesso em: 18 de novembro de 2012.
- MURUGAN, R.; RAMAKRISHNA, S. Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite. **Biomaterials**, Guildford, v. 25, n. 17, p. 3829-3835, 2004.
- NEAMAT, A.; GAWISH, A.; GAMAL-ELDEEN, A. M. b-Tricalcium phosphate promotes cell proliferation, osteogenesis and bone regeneration in intrabony defects in dogs. **Archives of Oral Biology**, Oxford, n. 54, p. 1083-1090, 2009.

- NIHOJANNEN, D. L. et al. Micro-architecture of calcium phosphate granules and fibrin glue composites for bone tissue engineering. **Biomaterials**, Guildford, v. 27, n. 13, p. 2716-2722, 2006.
- O'KEEFE, R. J. et al. COX-2 has a critical role during incorporation of structural bone allografts. **Annals of the New York Academy Sciences**, New York, v.1068, n. 1, p. 532-542, 2006.
- OONISHI, H. et al. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. **Clinical Orthopaedics Related Research**, Philadelphia, n. 334, p. 316-325, 1997.
- ORII, H.; SOTOME, S.; CHEN, J.; WANG, J.; SHINOMIYA, K. Beta-tricalcium phosphate (beta-TCP) graft combined with bone marrow stromal cells (MSCs) for posterolateral spine fusion. **Journal of Medical and Dental Sciences**, Tokyo, v. 52, n.1, p. 51-57, 2005.
- PALLENSEN, L. et al. Influence of particle size of autogenous bone grafts on the early stages of bone regeneration: a histologic and stereologic study in rabbit calvarium. **International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 17, n. 4, p. 498-506, 2002.
- PAULA, F.L. **Avaliação in vivo de um compósito de hidroxiapatita e alginato no reparo ósseo**. 2008. 138 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro / Universidade Federal da Bahia Salvador.
- PHILLIPS, J. H.; FORREST, C. R.; GRUSS, J. S. Current concepts in the use of bone grafts in facial fractures. **Clinics Plastic Surgery**, Philadelphia, v. 19, n.1, p.41-58, 1992.
- PINTO, L. E. S. C.; SILVA, M. H. P. Caracterização microestrutural da hidroxiapatita bovina sinterizada com biovidro niobo-fosfato. **Revista Militar de Ciência e Tecnologia**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 18-27, 3º Trim. 2012.
- PROUBASTA, I. **Fundamentos de biomecânica y biomateriales**. Madrid: Ergon, 1999.
- RIBEIRO, C. C.; BARRIAS, C. C.; BARBOSA, M. A. Preparation and characterization of calcium-phosphate porous microspheres with a uniform size for biomedical applications. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, Amsterdam, v. 17, n. 5, p. 455-463, 2006.
- ROLFE, B. et al. The fibrotic response to implanted biomaterials: implications for tissue engineering. In: EBELI, D. (Ed.). **Regenerative medicine and tissue engineering: Cells and Biomaterials**. Rijeka: Intech, 2011. v. 3. 558 p.
- ROLIM, A. E. H. **Avaliação de microesferas de hidroxiapatita, dopadas ou não com estrôncio, no reparo de defeito crítico, em calvária de rato**. 2010. 91 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal da Bahia, Salvador.

ROSA, A. L.; SHAREEF, M. Y.; van NOORT, R. Efeito das condições de preparação e sinterização sobre a porosidade da hidroxiapatita. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, São Paulo, v. 14, n. 3, p. 273-277, 2000.

ROSA, F. P. et al. Tissue response to polyanionic collagen; elastin matrices implanted in rat calvaria. **Biomaterials**, Guildford, v. 24, n. 2, p. 207-212, 2003.

RUPPRECHT, S. et al. Hydroxyapatite cement (BoneSource™) for repair of critical sized calvarian defects -an experimental study. **Journal Craniomaxillofacial Surgery**, Edimburg, v.31, n. 3, p. 149-153, 2003.

SANTOS, M. L. et al. Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. **Eclética Química**, Araraquara, v. 30, n. 3, p. 29-35, 2005.

SCHEPERS, E. J.; DUCHEYNE, P. Bioactive glass particles of narrow size range for the treatment of oral bone defects: a 1-24 month experiment with several materials and particle sizes and size ranges. **Journal of Oral Rehabilitation**, Oxford, v. 24, n. 3, p. 171-181, 1997.

SCHEPERS, E. J. et al. Bioactive glass particles of narrow size range: a new material for the repair of bone defects. **Implant Dentistry**, Baltimore, v. 2, n. 3, p. 151-156, 1993.

SCHLEGEL, K.A. et al. The monocortical critical size bone defect as an alternative experimental model in testing bone substitute materials. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, St. Louis, v. 102, n. 1, p. 7-13, 2006.

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

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clinical Orthopaedics and Related**, Philadelphia, v. 225, n. 1, p. 299-308, 1986.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J.O.; MILAM, S.B. Reconstruction of bone using calcium phosphate bone cements: a critical review. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 57, n. 9, p. 1122-1126, 1999.

SILVA, A. C.; APARECIDA, A. H.; BRAGA, F. J. C. Compósito de hidroxiapatita óssea bovina em biovidro: desenvolvimento da matriz vítrea silicato-fosfato. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DE MATERIAIS CBEMiMat, 19., Campos do Jordão. **Anais resumos**. Campos do Jordão, 2010.

SILVA, C. L. A. et al. Caracterização microestrutural do compósito hidroxiapatita bovina-biovidro, **Revista Militar de Ciência e Tecnologia**, Rio de Janeiro, v. 28, n.1, p. 8-23, 2011.

SILVA, M. H. P. **Apostila de biomateriais**. Rio de Janeiro: CERAMED, 2007. Disponível em:

<[http://www.mesonpi.cat.cbpf.br/e2006/posgraduacao/pdf\\_p3/ApostilaBiomateriais.pdf](http://www.mesonpi.cat.cbpf.br/e2006/posgraduacao/pdf_p3/ApostilaBiomateriais.pdf)>., 2007. Acesso em: 20 de junho de 2012.

SILVA, M. H. P. et al. Vitro assessment of new niobium phosphate glasses and glass ceramics; **Key Engineering Materials**, Zurich, v. 361-363, p. 229-232, 2008.

SO, K.; FUJIBAIASHI, S.; NEO, M. Accelerated degradation and improved bone-bonding ability of hydroxyapatite ceramics by addition of glass. **Biomaterials**, Guildford, v. 27, n. 27, p. 4738, 2006.

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

TEIXEIRA, S. et al. ; RODRIGUEZ, M. A.; PENA, P.; DE AZA, A. H.; DE AZA, S.; FERRAZ, MONTEIRO, F. J. Physical characterization of hydroxyapatite porous scaffolds for tissue engineering. **Materials Science & Engineering - C - Biomimetic Materials, Sensors and Systems - C**, Lausanne, v. 29, n. 5, p.1510-1514, 2009.

THORWARTH, M. et al. Bone regeneration in osseous defects using a resorbable nanoparticulate hydroxyapatite. **Journal Oral Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 63, n. 11, p.1626-1633, 2005.

TIOMIS, A.C. et al. Avaliação histológica do biovidro particulado na reparação de defeito experimental em mandibular de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 1, p. 80-85, 2010.

VALLET-REGI, M; GONZÁLEZ-CALBET, J. M. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. **Progress in Solid State Chemistry**, Oxford, v. 32, n. 1-2, p.1-31, 2004.

VARSHNEYA, A. K. **Fundamentals of inorganic glasses**. 2<sup>nd</sup> ed. Houston: Academic Press, 2006. 270 p.

VERT, M. et al. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, London, v. 3, n. 6, p. 432-446, 1992.

VIEIRA, J.G.H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 43, n. 6, 1999.

VOLKMER, T. M.; SANTOS, L. A. Influência no tempo de indução nas propriedades de hidroapatita porosa obtida por gelcasting de espumas. **Cerâmica**, São Paulo, v. 53, n. 328, p. 429-435, 2007.

WHEELER, D. L. et al. Effect of bioactive glass particle size on osseous regeneration of cancellous defects. **Journal of Biomedical Materials Research**, Hoboken, v. 41, n. 4, p. 527-533, 1998.

WHITE, E.; SHORS, E. C. Reconstructive implant surgery and implant prosthodontics I: biomaterial aspects of Interpore-200 porous hydroxyapatite. **Dental Clinics of North America**, Philadelphia, v. 30, p. 49-67, 1986.

WILLIAMS D. F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, Guildford, v. 30, n. 30, p. 5897-5909, 2009.

XU, H .H. K. et al. Injectable and macroporous calcium phosphate cement scaffold. **Biomaterials**, Guildford, v. 27, n. 24, p. 4279-4287, 2006.

ZÉTOLA, A.; LARSON, R. **A utilização da proteína morfogenética recombinante sintética tipo 2 para reconstrução de maxila atrófica**. Disponível em: <[http://www.implantnews.com.br/casosclinicos\\_07.asp](http://www.implantnews.com.br/casosclinicos_07.asp)>. Acesso em: 3 abr. 2012.

ZHANG, W. et al. Fabrication of interconnected microporous biomaterials with high hydroxyapatite nanoparticle loading. **Biofabrication**, Bristol, v. 2, n.3, 2010.

*ANEXO*



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa de protocolo número **038/2012**, intitulado **“Novos biomateriais para regeneração de defeitos ósseos críticos”**, sob a responsabilidade da Professora Doutora Fabiana Paim Rosa, lotada no Departamento de Biointeração do Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA), está de acordo com as exigências legais atuais para experimentação animal e com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), tendo sido **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde (CEUA-ICS) em **22 de julho de 2013**.

Salvador, 22 de julho de 2013.

Profª Dra. Songeli Menezes Freire

Coordenadora da CEUA-ICS