**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

ANGÉLICA CRISTINA DE OLIVEIRA MARTINS

**Avaliação histomorfométrica comparativa do processo de reparo
de defeitos ósseos perenes em calvária de ratos tratados com
 β -fosfato tricálcio, hidroxiapatita sintética, hidroxiapatita sintética
+ β -fosfato tricálcio e osso autógeno**

**BAURU
2010**

ANGÉLICA CRISTINA DE OLIVEIRA MARTINS

**Avaliação histomorfométrica comparativa do processo de reparo
de defeitos ósseos perenes em calvária de ratos tratados com
 β -fosfato tricálcio, hidroxiapatita sintética, hidroxiapatita sintética
+ β -fosfato tricálcio e osso autógeno**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Estomatologia e Biologia Oral (opção Biologia Oral)
Orientador: Prof. Dr. Rumio Taga

**BAURU
2010**

Martins, Angélica Cristina de Oliveira
M366a Avaliação histomorfométrica comparativa do
processo de reparo de defeitos ósseos perenes em
calvária de ratos tratados com β -fosfato tricálcio,
hidroxiapatita sintética, hidroxiapatita sintética + β -
fosfato tricálcio e osso autógeno / Angélica Cristina
de Oliveira Martins. - Bauru, 2010.
180p. ; il. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado) Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Rumio Taga

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos,
a reprodução total ou parcial desta dissertação, por
processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo número: CEEPA 018/2007
Data: 13 de setembro de 2007

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho primeiramente a **Deus**, pois sem Ele, nada seria possível.*

*A toda minha família e em especial aos meus pais **Célia e Armando**, pelo esforço, dedicação e compreensão em todas as fases desta e de outras caminhadas e também, à memória do meu querido irmão **Guilherme**, por todos os bons momentos compartilhados e lições aprendidas.*

*Ao amor da minha vida, **Netto**, por sua paciência e todo seu carinho, sempre me apoiando e ajudando a resolver tudo!*

*A minha grande amiga **Pamella**, pela amizade sincera e incondicional.*

“Que não lhes falem saúde, esperança e alegria. Quero agradecer-lhes pelas noites em vigília, pelas preces orvalhadas de lágrimas, pela dedicação plena. Surgem nos horizontes, dias mais tranquilos e noites mais amenas, trazendo-nos paz. E ela há de vir e ficar conosco, para todo o sempre!”

AGRADECIMENTOS

Ao **Professor Doutor Rumio Taga**, meu orientador, pela confiança depositada em mim e pela competência e paciência prestadas durante a realização deste trabalho.

Aos demais professores do Laboratório de Histologia (FOB/USP), **Gerson Francisco de Assis**, **Gustavo Pompermaier Garlet** e **Dagoberto Sottovia Filho**, pelos conhecimentos transmitidos e pelo incentivo à pesquisa.

A minha “co-orientadora”, **Tania Mary Cestari**, por sua dedicação e atenção dispensadas durante o desenvolvimento desta dissertação.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Bauru e em especial aos do Laboratório de Histologia, **Danielle**, **Teresinha** e **Divina**, pelo apoio e auxílio prestados na elaboração desta dissertação.

Aos alunos de Iniciação Científica e de Pós-Graduação do Laboratório de Histologia, **Larissa**, **Alliny**, **Clara**, **Priscila**, **Francine**, **Fábio** e **Bruna** que ajudaram a cuidar dos “meus bichinhos” e a conduzir esta pesquisa.

À **FAPESP** (processo nº 2007/02013-1), pela minha bolsa de mestrado e pelo apoio científico.

À empresa **BAUMER**, pela doação dos biomateriais aqui utilizados.

RESUMO

Os objetivos do trabalho foram caracterizar as biocerâmicas a base de hidroxiapatita (HA), β -fosfato tricálcio (TCP) e o compósito HA/TCP na proporção 60:40 pela análise microestrutural e por Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS) ao microscópio eletrônico de varredura, e comparar histomorfometricamente o processo de reparo ósseo de defeitos cranianos perenes tratados com essas três diferentes cerâmicas e o enxerto autógeno nos períodos de 0, 30, 90 e 180 dias pós-operatório. Microestruturalmente, a HA apresentou superfície irregular com concavidades, fendas e grande quantidade de microporos; o TCP exibiu superfície irregular e baixa resistência mecânica; a HA/TCP apresentou superfície lisa com raras concavidades e ausência de porosidades. As cerâmicas estavam constituídas pelos elementos O, P e Ca, sendo que a relação Ca/P seguiu a ordem: HA/TCP > HA > TCP. Morfometricamente, o volume inicial enxertado foi aproximadamente de 60 mm³ para todos os tratamentos. Entre 30 e 180 dias, o volume total da região do enxerto (Vtre) e do material enxertado (VM) manteve-se constante nos defeitos tratados com osso autógeno (Vtre = 53,61 mm³, VM = 20,11 mm³), HA (Vtre = 60,13 mm³, VM = 32,72 mm³), HA/TCP (Vtre = 57,60 mm³, VM = 31,61 mm³), TCP (Vtre = 38,27 mm³, VM = 10,07 mm³). Aos 30 dias, o volume de tecido ósseo no grupo autógeno foi de 22,06 mm³, ocupando quase a totalidade dos espaços entre as partículas, enquanto que, nos grupos HA e HA/TCP foi de apenas 7,62 mm³, sendo parte dos espaços (19,10 mm³), constituído por tecido conjuntivo fibroso. Entre 30 e 180 dias, o volume de tecido ósseo não apresentou diferenças estatísticas significantes ($p > 0,05$). O número absoluto de osteoblastos e osteócitos no grupo autógeno foi, respectivamente, de $118,57 \times 10^2$ e $178,57 \times 10^2$ células, aos 30 dias, diminuindo 40,16% e 29,09% aos 90 dias, decorrente do processo de remodelação óssea. Nos grupos HA e HA/TCP, o número absoluto de osteoblastos e osteócitos foram similares e permaneceram constantes dos 30 aos 180 dias, com uma média de $39,13 \times 10^2$ e $132,20 \times 10^2$ células, respectivamente. Com relação ao grupo TCP, o volume de tecido ósseo foi de 4,16 mm³ aos 30 dias e aumentou 70,27% aos 90 dias, passando a ocupar 13,93 mm³ do Vtre. Concomitantemente, o número absoluto de osteoblastos e osteócitos passaram, respectivamente, de $5,64 \times 10^2$ e $37,01 \times 10^2$ células, aos 30 dias, para $67,46 \times 10^2$ e $166,13 \times 10^2$ células, aos 90 dias. Baseados nos resultados aqui obtidos, concluímos que, no modelo experimental de defeitos cranianos em ratos, o enxerto autógeno é ainda, o padrão ouro para reconstrução óssea, enquanto que, dentre as cerâmicas analisadas, o TCP é o melhor biomaterial ósseo-substituto.

Palavras-Chaves: Osso. Crânio. Materiais biocompatíveis.

ABSTRACT

Histomorphometric comparative evaluation of the repair of perennial bone defects in rats skulls treated with β -tricalcium phosphate, synthetic hydroxyapatite, synthetic hydroxyapatite + β -tricalcium phosphate and autogenous graft

The aim of the work was to characterize the ceramics: hydroxyapatite (HA), β -tricalcium phosphate (TCP) and the composite HA/TCP (60:40) through scanning electron microscope - energy dispersive system (SEM-EDS) analysis and to compare histomorphometrically the repair of perennial skull defects treated with these three different ceramics and autogenous graft at 0, 30, 90 and 180 days post-operatively. Microstructurally, HA showed irregular surface with concavities, cracks and several pores. TCP also presented irregular surface and low mechanical strength. HA/TCP showed smooth surface with rare concavities and pores. The ceramics were constituted by the elements O, P and Ca, and the relation Ca/P follow the order: HA/TCP > HA > TCP. Morphometrically, the initial graft volume was approximately 60 mm³ for all treatments. Between 30 and 180 days, the total volume of the grafted area (Vtga) and of the implanted material (Vim) were constant in the following groups: autogenous (Vtga = 53,61 mm³; Vim = 20,11 mm³), HA (Vtga = 60,13mm³; Vim = 32,72 mm³), HA/TCP (Vtga = 57,60mm³; Vim = 31,61 mm³) and TCP (Vtga = 38,27mm³; Vim = 10,07 mm³). At 30 days, the bone tissue volume was of 22,06 mm³ in the autogenous group, occupying totally the space among the particles, while in the HA and HA/TCP groups was only 7,62 mm³. At 30 and 180 days, the bone tissue volume did not show statistical differences (p>0.05). The total number of osteoblasts and osteocytes in the autogenous group was respectively, 118, 57 x 10² and 178,57 x 10² cells, at 30 days, reducing 40,16% e 29,09%, at 90 days, due to bone remodeling. In the HA and HA/TCP groups, a similar and stable number of osteoblasts and osteocytes were observed during all periods, with mean of 39,13 x 10² and 132,20 x 10² cells, respectively. In the TCP group, the bony tissue volume was of 4,16 mm³, at 30 days, increasing 70,27% at 90 days. Concomitantly, the total number of osteoblasts and osteocytes was respectively, 5,64 x 10² and 37,01 x 10² cells, at 30 days, achieving 67,46 x 10² and 166,13 x 10² cells, at 90 days. Based in the results obtained here, we concluded that in the rat skull defect model the autogenous bone is yet the good standard graft material for bone reconstruction and that among the tested ceramics, the TCP is the best bone graft substitute.

Key-words: Bone. Skull. Biocompatible Materials.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HA	Hidroxiapatita
TCP	Fosfato Tricálcio
HA/TCP	Mistura de Hidroxiapatita + Fosfato Tricálcio
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
EDS	Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X
A	Área do Defeito Ósseo
Ai	Área de cada Estrutura estudada
E	Espessura Média do Defeito Ósseo
d	Diâmetro do Defeito Ósseo
Vvi	Densidade de Volume
Avi	Densidade de Área de cada Estrutura estudada
Vtre	Volume Total da Região do Enxerto
Vti	Volume Total de cada Estrutura estudada
Ni	Número de cada tipo Celular estudado
Ca	Cálcio
P	Fosfato
O	Oxigênio
TO	Tecido Ósseo
CO	Tecido Conjuntivo
Au	Fragmentos de enxerto Autógeno
Fr	Fragmentos de Biomaterial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	IMPORTÂNCIA DOS ENXERTOS E BIOMATERIAIS ÓSSEO-SUBSTITUTOS	21
2.1.1	Enxertos ósseos	22
2.1.2	Biomateriais ósseo-substitutos	24
2.3	BIOCERÂMICAS	26
2.3.1	Biocerâmicas a base de fosfato de cálcio	27
2.3.1.1	Hidroxiapatita (HA) e suas aplicações	29
2.3.1.2	Fosfato tricálcio (TCP) e suas aplicações	32
2.3.1.3	Fosfatos de cálcio bifásicos e suas aplicações	33
2.4	CARACTERÍSTICAS MICROESTRUTURAIS DAS BIOCERÂMICAS	35
2.5	DINÂMICA DAS BIOCERÂMICAS	37
3	PROPOSIÇÃO	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	BIOMATERIAIS UTILIZADOS	45
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS BIOMATERIAIS PELA ANÁLISE MICROESTRUTURAL E POR ESPECTROMETRIA DE ENERGIA DISPERSIVA (MEV-EDS) AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA	46
4.2.1	Microscopia e eletrônica de varredura (MEV)	46
4.2.2	Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X – EDS	47
4.3	OBTENÇÃO DOS ANIMAIS	47
4.4	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	48
4.5	MORTE DOS ANIMAIS E COLETA DAS CALOTAS CRANIANAS	53
4.6	OBTENÇÃO E ANÁLISE DAS IMAGENS RADIOGRÁFICAS	53
4.7	PROCESSAMENTO DAS PEÇAS HISTOLÓGICAS	53
4.8	DETERMINAÇÃO DO VOLUME INICIAL DO DEFEITO ÓSSEO	54
4.9	ANÁLISE AO MICROSCÓPIO ÓPTICO	56
4.10	ANÁLISE MORFOMÉTRICA	56

4.10.1	Determinação da densidade de volume de tecido ósseo neoformado, de biomaterial implantado e de tecido conjuntivo	56
4.10.2	Determinação do volume absoluto de tecido ósseo neoformado, de biomaterial implantado e de tecido conjuntivo	57
4.10.3	Avaliação morfométrica do número total de osteoblastos e osteócitos	57
4.11	TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	58
4.12	OBTENÇÃO DAS FOTOMIOGRAFIAS	58
5	RESULTADOS	59
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS BIOMATERIAIS PELA ANÁLISE MICROESTRUTURAL E POR ESPECTROMETRIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X – EDS AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA	61
5.1.1	Resultados da análise Microestrutural pelo Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)	61
5.1.2	Resultados da análise por Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS) pelo Microscópio de Varredura	61
5.2	RESULTADOS DO VOLUME INICIAL DO DEFEITO ÓSSEO	74
5.3	RESULTADOS RADIOGRÁFICOS	74
5.4	RESULTADOS MORFOLÓGICOS	85
5.4.1	Período de 30 dias	85
5.4.2	Período de 90 dias	95
5.4.3	Período de 180 dias	105
5.5	RESULTADOS MORFOMÉTRICOS	115
5.5.1	Densidade de volume de tecido ósseo neoformado, de material enxertado e tecido conjuntivo	115
5.5.2	Volume total da região do enxerto para os diferentes grupos de tratamento	118
5.5.3	Volumes absolutos de tecido ósseo neoformado, de material enxertado e tecido conjuntivo	119
5.5.4	Número absoluto de células ósseas (osteoblastos e osteócitos)	123

6	DISCUSSÃO	127
6.1	MODELO EXPERIMENTAL ADOTADO	129
6.2	ANÁLISE MICROESTRUTURAL E RELAÇÃO Ca/P DOS BIOMATERIAIS	130
6.3	ANÁLISES RADIOGRÁFICA, MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA	134
7	CONCLUSÕES	141
	REFERÊNCIAS	145
	APÊNDICES	163
	ANEXOS	177

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O reparo de defeitos ósseos extensos na região craniomaxilofacial, provocados por trauma ou patologias, constitui ainda um grande problema para os cirurgiões que atuam nessa área, uma vez que, mesmo a alta capacidade de regeneração do tecido ósseo, não é suficiente por si só de promover a reparação completa desse tipo de defeito.

Tão grande é a importância do tecido ósseo no âmbito médico-odontológico que, as estatísticas mostram que mais de 500 mil enxertias são realizadas anualmente nos EUA (HING, 2004; CHEUNG, 2005) e 2,2 milhões no mundo inteiro para o reparo de defeitos ósseos, fazendo com que este tecido seja o segundo mais transplantado na atualidade.

O tratamento mais indicado e utilizado nos casos de reparo de defeitos ósseos extensos é o enxerto ósseo autógeno, em razão de não ser imunogênico, ter propriedades de osteogênese, osteocondução e osteoindução e ainda, conter componentes celulares e moleculares viáveis. No entanto, esta técnica apresenta diversos inconvenientes como, necessidade de internação hospitalar, maior período de convalescença, risco de complicações durante a cirurgia, tamanho da área doadora insuficiente, susceptibilidade a infecções na área doadora, anatomia e estrutura do enxerto inadequadas e, as vezes, intensa reabsorção e incorporação do material enxertado durante o processo reparacional (DAMIEN e PARSONS, 1991; BAUER e MUSCHLER, 2000; TAGA, CESTARI *et al.*, 2000).

Visando contornar estes inconvenientes, nas últimas décadas, as pesquisas vêm buscando métodos alternativos através do desenvolvimento de biomateriais ósseo-substitutos com a eficiência do enxerto autógeno, capazes de propiciar o fechamento completo de um defeito ósseo perene por crescimento de um neotecido que exiba características morfofuncionais mais próximas possíveis do tecido normal (MISH e DIETSH, 1993).

As cerâmicas a base fosfatos de cálcio sintéticos (hidroxiapatita - HA, fosfato tricálcio - TCP ou a mistura de ambos - HA+TCP) vêm sendo uma destas alternativas. Elas apresentam boa biocompatibilidade e se ligam diretamente ao

osso sem a interposição de qualquer outro tipo de tecido (GROSS, MULLER-MAI *et al.*, 1990). Isto é explicado pela similaridade química desses biomateriais com a fase mineral do tecido ósseo, sendo estes capazes de participar do equilíbrio cálcio/fosfato no organismo (KURASHINA, KURITA *et al.*, 1997). Estas biocerâmicas demonstram também, excelentes bioatividade e osteocondutividade (DACULSI, LABOUX *et al.*, 2003), favorecendo o crescimento ósseo nos locais em que se encontram. Além disso, reagem com os fluídos fisiológicos ligando-se fortemente ao tecido duro e em alguns casos aos tecidos moles (BOCCACCINI e BLAKER, 2005).

No entanto, os produtos caracterizados como sendo hidroxiapatita ou fosfato tricálcio puros têm apresentado características diferentes entre si (NERY, LEGEROS *et al.*, 1992). Como o fosfato de cálcio mais abundante no tecido ósseo é aquele cuja composição química e estequiometria se aproximam da hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (SCHENK, 1996), isto confere a ela uma biocompatibilidade maior (AOKI, 1994). No entanto, a hidroxiapatita é reabsorvida muito lentamente (NORDSTRÖM, 1990), enquanto o fosfato tricálcio ($\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), embora seja menos biocompatível, tem um grau de dissolução e degradação maior (GROOT, 1983 e KOHRI, MIKI, *et al.*, 1993).

Diante deste quadro, muitos pesquisadores têm buscado testar a eficiência de cerâmicas bifásicas, ou seja, originadas da mistura de hidroxiapatita e fosfato tricálcio. Este compósito bifásico proporciona um tempo de reabsorção mais lento, fornecido pela HA, que desta forma atua como um suporte para a deposição de células, e um tempo de reabsorção mais rápido, fornecido pelo fosfato tricálcio, o qual disponibiliza maior porosidade para o crescimento ósseo.

A síntese destas cerâmicas pode ser obtida a partir de soluções de cloreto de cálcio, dihidrogeno fosfato de amônio e hidróxido de amônio, fixando-se uma relação atômica Ca/P de 1,67 (CUNHA *et al.*, 2006). Reações químicas destas substâncias são realizadas sob condições específicas de tempo, pH e temperatura, gerando a precipitação de pós cerâmicos. Posteriormente, os pós são submetidos à elevadas temperaturas (processo de sinterização), o que resulta na fusão das partículas e aumento das propriedades mecânicas das cerâmicas (MUNAR *et al.*, 2006). No que se refere à composição de fases, inicialmente, se obtêm apenas a hidroxiapatita, mas através da elevação da temperatura (600-1100 °C), esta se

transforma em um composto bifásico constituído por hidroxiapatita cristalina mais β -fosfato tricálcio (CUNHA *et al.*, 2006).

O compósito HA/TCP pode ser encontrado em diferentes proporções, mas estudos relatam que as proporções de 30/70 ou 40/60 demonstram grande eficiência no reparo de defeitos ósseos (KOHRI, MIKI *et al.*, 1993 e NERY, LEGEROS, *et al.*, 1992, PLACHOKOYA *et al.*, 2006). Além do que, estes materiais apresentam reação inflamatória mínima e alto potencial osteocondutor (JOHNSON, FRIERSON, *et al.*, 1996; GATTI, ZAFFE, *et al.*, 1990; LU, DESCHAMPS, *et al.*, 2002).

Considerando a apresentação de comportamentos biológicos diferentes entre as cerâmicas, que variam de acordo com suas características físico-químicas, há a necessidade de caracterizá-las e avaliá-las quanto aos seus potenciais osteogênicos, comparando-as com o enxerto autógeno. E para isso, o modelo experimental usado foi o defeito de tamanho crítico em calvária de animais de laboratório, que tem sido bem documentado na literatura (FRAME, 1980; SCHIMITZ e HOLLINGER, 1986; FERGUSON *et al.*, 1987; HOLLINGER e KLEINSCHMIDT, 1990; DAHLIN, ALBERIUS e LINDE, 1991; ALBERIUS, DAHLIN e LINDE, 1992; LINDE *et al.*, 1993; BOSCH, MELSEN e VARGERVIC, 1995; BOHNING, DAVENPORT e JEANSONNE, 1999) e no qual, o tecido ósseo não tem a capacidade de regenerar espontaneamente, requerendo a utilização de um enxerto ou um substituto ósseo com potencial osteocondutor para o seu selamento.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

Devido a diversidade de temas a serem relatados, a revisão de literatura foi dividida didaticamente em sub-tópicos, para facilitar a abordagem dos assuntos.

2.1 IMPORTÂNCIA DOS ENXERTOS E BIOMATERIAIS ÓSSEO-SUBSTITUTOS

A qualidade de vida dos indivíduos vem aumentando nos últimos anos e este fator, associado ao avanço tecnológico em prol das melhorias nas condições de saúde, tem proporcionado um período de vida prolongado para uma parcela significativa da população. Porém, com o aumento da expectativa de vida, problemas geriátricos relacionados à degeneração e disfunção de órgãos e tecidos, e a incidência de doenças como a osteoporose e as artrites, também têm crescido significativamente (KAWACHI, 1997; CULPAN *et al.*, 2007; HAIDUKEWYCH *et al.*, 2005).

É importante salientar que, quando o tecido ósseo é lesado, ele tem a capacidade de se regenerar e retomar a estrutura tecidual original, sem a formação de tecido cicatricial (HOLLINGER *et al.*, 1997; REMEDIOS, 1999). No entanto, apesar desse potencial, em algumas ocasiões, como nas não-uniões, em fraturas múltiplas, nas osteotomias ou em defeitos ósseos de tamanho extenso, a regeneração óssea necessita de algum auxílio (COOK e RUEGER, 1996), o que pode ser fornecido pela utilização de enxertos e materiais ósseo-substitutos.

Na clínica odontológica, o uso de enxertos e materiais ósseo- substitutos se faz necessário, por exemplo, em casos onde a perda de parte ou todos os dentes acarreta uma reabsorção gradativa do rebordo alveolar. A perda óssea leva à criação de uma relação intermaxilar do tipo pseudo-prognatismo e com a diminuição vertical de altura óssea, ocorre um colapso dos tecidos moles faciais, dando a aparência de envelhecimento ao indivíduo (CLAYMAN, 2006), além do que, interfere em sua fala e mastigação.

Nas áreas da implantodontia e prótese dentária, o tratamento e o planejamento cirúrgico-protético destes pacientes se tornam mais difíceis e limitados (MOY *et al.*, 1993). Barbara *et al.* (1997) relataram que um dos parâmetros usados na avaliação de um paciente para instalação de implantes osteointegrados é justamente a qualidade óssea do sítio receptor, que é considerado um dos fatores mais relevantes para manutenção e sucesso dos implantes orais. Para a instalação de implantes em condições ideais, se faz necessária a presença de espessura alveolar mínima de 5mm e altura que permita a instalação de fixações maiores de 10mm, diminuindo desta maneira o risco de complicações (PINTO *et al.*, 2004).

Em vista destas necessidades, a medicina regenerativa busca condições operacionais para o reparo e a substituição de tecidos lesados através do fornecimento de elementos celulares requeridos e de fatores de proliferação e diferenciação celular ou ainda, criando um micro-ambiente favorável para que estas células possam migrar e se instalar no local do defeito ósseo. E estas condições podem ser obtidas por meio da utilização de enxertos ósseos ou biomateriais específicos (GRANJEIRO JM, 2006).

2.1.1 Enxertos ósseos

A enxertia autógena, em que se utiliza tecido ósseo do próprio indivíduo para substituir o tecido lesado, é amplamente aceita como padrão no tratamento de defeitos ósseos, pois apresenta boas propriedades biológicas de osteogênese, osteocondução e osteoindução (ZAMBUZZI, *et al.*, 2006), além do que, ela tem a vantagem de ser biocompatível. Para Cardoso *et al.* (2006), a osteogênese ocorre quando os osteoblastos, ou células precursoras de osteoblastos, são transplantados com o material de enxerto para dentro do defeito, onde podem estabelecer centros de formação óssea. O osso autógeno do íliaco e enxertos de osso medular são exemplos de transplantes com propriedades osteogênicas. Já a osteocondução ocorre quando o material de enxerto não vital serve como um arcabouço para o crescimento de células precursoras dos osteoblastos para o interior do defeito. O osso cortical autógeno pode ser citado como exemplo de material com essa

característica. Por outro lado, a osteoindução envolve a formação de um novo tecido ósseo pela diferenciação local das células mesenquimais indiferenciadas em células formadoras de osso sob a influência de um ou mais agentes indutores. A matriz óssea desmineralizada ou proteínas ósseas morfogenéticas são exemplos de tais materiais.

Entretanto, a aplicação do enxerto autógeno está limitada a cada caso em particular, ao estado do paciente, e à localização e ao tamanho do defeito ósseo. Além disso, o uso desse tipo de enxerto apresenta numerosas desvantagens, como complicações pós-operatórias, aumento do tempo de operação, dificuldade de uma conformação exata ao defeito, e, em alguns casos, a indisponibilidade da quantidade de osso necessária para restaurar a cavidade defeituosa (CONSTANTINO *et al.*, 1991; MUTING *et al.*, 1993).

Desta maneira, a utilização de enxertos alógenos e xenógenos têm sido amplamente estudados e propostos como alternativos ao uso do enxerto autógeno (LUDWIG, 2000; VON ARX, 2001), já que uma de suas vantagens é não produzir trauma adicional ao paciente, o que ocorre na coleta do auto-enxerto (CIANI *et al.*, 2006).

A aloenxertia consiste na utilização de uma porção de tecido ósseo de outro indivíduo da mesma espécie para a reconstituição da parte danificada. Tais porções são obtidas a partir de bancos de ossos que os processam de maneira a preservar suas propriedades osteoindutora e osteocondutora, e a eliminar os componentes celulares.

Atualmente, o aloenxerto humano é conservado de duas maneiras: congelado ("fresh-frozen"), em uma temperatura de -70°C, após lavagem com antibiótico e, liofilizado ("freeze-dried"), com lavagem dupla com antibiótico, congelamento a 70°C e secagem até adquirir um conteúdo em água de cerca de 5% (GUTIERRES *et al.*, 2006). O congelamento reduz a imunogenicidade e conseqüentemente, a rejeição, mas não elimina o risco de transmissão do vírus HIV. Por outro lado, a liofilização reduz ainda mais a imunogenicidade e elimina o risco de HIV, mas diminui também a capacidade de osteoindução e as propriedades mecânicas do enxerto (PETERSON, 2004). Sendo assim, os aloenxertos apresentam como desvantagens a inexistência da capacidade osteogênica, o alto

custo de sua manutenção e o rigoroso controle para impedir a transmissão de doenças (PRUSS, 2003), além do que, existe uma variabilidade nos resultados clínicos quanto à sua aplicação e muitas vezes, a inacessibilidade aos bancos de ossos (TOMFORD, 2000; GUTIERRES *et al.*, 2006).

Com o desenvolvimento de novas tecnologias, o xenoenxerto, proveniente de tecido ósseo de outras espécies, vem sendo amplamente utilizado (SANADA *et al.*, 2003). Neste âmbito, aqueles de origem bovina têm ganhado destaque, pois a matéria-prima para sua produção é abundante e seu custo final é acessível à população. Além disso, estes têm se mostrado seguros quanto à indução de resposta imune e transmissibilidade de doenças, quando processados adequadamente (SOGAL, 1999).

O processamento do osso bovino pode resultar em dois tipos distintos de material: o inorgânico e o orgânico. O inorgânico é livre de proteínas e células, e está caracterizado pelo elevado conteúdo de hidroxapatita. A desproteinização é obtida através de tratamento térmico com temperaturas superiores a 300°C. Por outro lado, o tratamento do osso bovino com solventes orgânicos, álcalis e ácidos com concentração e temperatura controlada leva à remoção de células, detritos celulares e várias proteínas não colágenas, bem como a porção mineral, deixando um arcabouço protéico constituído basicamente de colágeno tipo I e pequena quantidade de fatores de crescimento, como a proteína morfogenética óssea (SANADA *et al.*, 2003; COSTA FILHO *et al.*, 2001; BRAZ *et al.*, 2003). Contudo, segundo Reddi *et al.* (2003), todos estes tratamentos antigênicos e de desproteinização e deslipidificação reduzem grandemente a sua capacidade osteoindutora, enquanto que, os tratamentos realizados de forma inadequada aumentam o risco da transferência de Encefalopatia Espongiforme (BSE) ao homem (CORREIA *et al.*, 2002).

2.1.2 Biomateriais ósseo-substitutos

A aplicação de biomateriais remonta à pré-história, como indica a descoberta de crânios com trepanações, nas quais foram utilizadas placas de ouro e prata (LAURENCIN, 2004). No entanto, a palavra “biomaterial”, só há poucos anos

foi introduzida na nomenclatura médica. Tal definição foi dada na conferência de Chester, em 1991, como “um material destinado a contatar com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do organismo” Já Moraes (2002) os distingue quanto à sua tolerância, os definindo como “substâncias de origem animal ou sintética, tolerados de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos que constituem os órgãos dos seres vivos”. No entanto, um conceito mais moderno de biomaterial tem sido proposto por Williams (2009), onde se leva em consideração as novas tecnologias da engenharia de tecido, terapia gênica e nanotecnologia. Segundo ele, biomaterial é definido como “uma substância criada pela engenharia para dar forma e na qual, sozinha ou como parte de um sistema complexo, é usada para direcionar o curso de algum procedimento terapêutico ou diagnóstico, pelo controle de interações com componentes dos sistemas vivos”.

Dentro do conceito de biomateriais, encontram-se os chamados substitutos ósseos, que são aqueles destinados à implantação no homem com a perspectiva de uma reconstituição do tecido ósseo, para o reforço de uma estrutura óssea ou para o preenchimento de perda de substância óssea de origem traumática ou ortopédica” (MAINARD, 2001).

Já em relação à classificação dos biomateriais, é possível fazê-la segundo duas vertentes: composição química e comportamento biológico. No primeiro caso, dividem-se em: metais e ligas metálicas (baseado nas ligações metálicas), cerâmicos (baseado nas ligações iônicas), polímeros (baseado nas ligações covalentes) e compósitos (materiais híbridos, como por exemplo, a combinação de cerâmicas e polímeros). No segundo, podem ser: bioinertes (que não provocam reação de corpo estranho ao organismo e encontram-se em ligação direta ao tecido receptor), biotolerados (que são moderadamente aceitos pelo tecido receptor e geralmente, envoltos por uma cápsula fibrosa), bioativos (que possuem uma ligação direta com o tecido vivo, tendo geralmente, íons de cálcio e fósforo que estabelecem pontes químicas com o tecido envolvente) e bioreabsorvíveis (que são lentamente degradáveis e gradualmente substituídos pelos novos tecidos) (BAUER, 2000; GUTIERRES, 2006; WILLIAMS, 2009).

Borges (1998) ressalta a importância dos biomateriais serem inertes ou bioativos e degradáveis, de forma a favorecer o crescimento ósseo por

osteocondução, e se possível por osteoindução. Mas, essas características dependem das propriedades físicas e químicas dos biomateriais, as quais devem ser compatíveis com as reações fisiológicas do tecido ósseo.

A seguir são descritos os biomateriais cerâmicos, alvo do nosso estudo.

2.3 BIOCERÂMICAS

Granjeiro (2006) destaca dentre a gama de biomateriais sintéticos, as cerâmicas, as quais têm sido amplamente utilizadas nas clínicas médica e odontológica para regeneração de tecidos ósseos e dentários. A grande vantagem destes biomateriais é que não há limitações em termos de quantidade disponível, nem requerem qualquer procedimento cirúrgico adicional.

O gesso ($\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$) foi a primeira cerâmica utilizada como substituto ósseo em 1894. A baixa resistência mecânica e a fácil fragmentação resultaram em propriedades pouco atrativas, as quais excluíram o seu uso (DREESMAN, 1984). Contudo, em 1967, Hench, um engenheiro e cientista da Universidade da Flórida, especializado em cerâmica, relatou que um coronel que havia acabado de voltar do Vietnã, reclamava que milhares de soldados estavam tendo braços e pernas amputados devido a implantes defeituosos que eram rejeitados pelo corpo. Assim, dois anos mais tarde, Hench iniciou um trabalho com verbas do exército americano e criou um vidro que se soldava muito bem aos ossos e tecidos de ratos, aparentemente, atraindo células ósseas para o local (KRIEGER, 2003).

A partir da década de 70, após extensos testes e aperfeiçoamentos, as biocerâmicas passaram a ser mais difundidas, destacando-se a utilização da alumina densa, que devido à sua boa resistência e biocompatibilidade vem sendo utilizada até o momento em próteses ortopédicas. Outras biocerâmicas comumente usadas são a zircônia, vidros cerâmicos a base de sílica e os fosfatos de cálcio (BAEHR, 1995; KAWACHI, 2000).

O desafio da pesquisa atual é produzir biocerâmicas comerciais com características físico-químicas e morfológicas capazes de estimular a osteogênese e

propiciar a formação de estruturas semelhantes aos elementos da matriz extracelular, facilitando a mobilização, expansão e integração de populações de células regenerativas. Além disso, elas idealmente devem ser biodegradáveis pelo organismo, biocompatíveis, porosas, com resistência mecânica e propriedades de superfície compatíveis com a proliferação e a diferenciação de células osteoprogenitoras, permitindo desta forma, que o tecido ósseo perdido seja regenerado.

Quanto à classificação das biocerâmicas, Aoki (1988) e Vallet-Regi (1997), a fazem em bioativas e bioinertes. Apesar de o termo bioinerte ter sido alvo de discussões e questionamentos na Conferência da Sociedade Européia para Biomateriais, em 1986, já que todo material induz algum tipo de resposta no tecido hospedeiro, ele ainda é comumente utilizado. Porém, as cerâmicas bioinertes são atualmente referidas àquelas que apresentam uma resposta interfacial mínima, que não resulta na ligação ou na rejeição do tecido hospedeiro, formando uma cápsula fibrosa ao redor do material (WILLIAMS, 1987; WILSON, 1997). Por outro lado, as cerâmicas bioativas são definidas como aquelas que induzem uma atividade biológica específica, como a osteocondução. Hench (1991; 1998) ainda inclui a classe das biocerâmicas reabsorvíveis, sendo a degradação um fator muito importante e desejável, pois, à medida que a reabsorção ocorre, novos espaços são disponibilizados ao crescimento do tecido ósseo em formação.

2.3.1 Biocerâmicas a base de fosfato de cálcio

O grupo de biomateriais que mais se assemelha à composição do osso é o das biocerâmicas de fosfato de cálcio (LEGEROS, 2002). Os primeiros estudos com estes materiais começaram com Albee, em 1930, utilizando uma cerâmica de fosfato tricálcio para regenerar um defeito ósseo. Entretanto, somente 50 anos depois começaram a aparecer diferentes tipos de cerâmicas de fosfato de cálcio como materiais implantáveis para aplicação em medicina e odontologia (COSTA *et al.*, 2009). Em 1974 foi publicada a primeira aplicação odontológica do β -fosfato tricálcio no tratamento de doenças periodontais (LEVITT, 1969; MONROE, 1971),

seguindo-se em 1975, pelo trabalho de Nery *et al*, com a introdução do conceito de porosidade como uma característica importante para estes tipos de biocerâmicas.

Baseado nas propriedades físicas, as biocerâmicas podem ser classificadas em densas ou porosas, referindo-se a micro ou macro-porosidade (LEGEROS, 1988). Os materiais densos são micro-porosos, em consequência das condições do processo de sinterização (temperatura e duração do processo), já os porosos possuem macro-poros, também devido ao processo químico sofrido (De GROOT, 1983). Estudos com cerâmicas densas mostraram uma taxa de cicatrização comparada com o grupo controle, enquanto materiais porosos exibiram uma taxa mais baixa de formação óssea (JARCHO 1981, 1986; OSBORN e DONATH, 1984).

Hawachi (2000) ressalta que, apesar do aumento da porosidade diminuir a resistência mecânica do biomaterial, a presença de poros com dimensões adequadas favorecem o crescimento tecidual através deles, permitindo um entrelaçamento do tecido com o implante, aumentando, desta forma, a resistência do material *in vivo*.

As biocerâmicas são consideradas atualmente, excelentes para remodelação e reconstrução de defeitos ósseos, por suas inigualáveis propriedades de biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade, o que significa que, ao serem implantadas em sítio ósseo, não induzem resposta imunológica, são capazes de ligar-se diretamente ao tecido ósseo e permitem o crescimento ósseo ao longo de sua superfície (LEGEROS, 1991).

A síntese das biocerâmicas, geralmente é feita a partir do material na forma de pó, que é posteriormente sinterizado a altas temperaturas. Esses pós cerâmicos podem ser obtidos tanto por via seca, como via úmida. Os processos por via seca resultam em pós muito finos e homogêneos, porém, este método, muitas vezes, não permite a obtenção de materiais com composição estequiométrica bem definida, além do difícil controle das condições de síntese (HONDA *et al.*, 1990). Já os processos por via úmida envolvem a preparação de uma solução homogênea de sais, contendo um dos íons de interesse e a sua mistura com um agente precipitante, geralmente uma solução contendo o outro íon de interesse, resultando em um precipitado que é separado da solução por filtração. Este precipitado, por sua

VEZ, pode ser o pó cerâmico desejado ou um intermédio que, posteriormente, receberá um tratamento térmico para ser convertido ao produto desejado. Este segundo método resulta em partículas aglomeradas, e estas são apontadas como a principal causa dos defeitos estruturais que ocorrem nos corpos cerâmicos, no entanto, a técnica é simples, apresenta baixo custo e bom rendimento (KAWACHI, 1997).

Dentre as biocerâmicas sintéticas, encontram-se a hidroxiapatita (HA), o fosfato tricálcio (TCP) e as cerâmicas bifásicas (HA + TCP), as quais diferem entre si e do osso, tanto em composição química como em propriedades físicas, e estas devem ser levadas em consideração para maior eficiência do crescimento ósseo (JARCHO, 1981; GROOT, 1983; LENCH, 1994; DACULSI *et al.*, 1996).

2.3.1.1 Hidroxiapatita (HA) e suas aplicações

O corpo humano é constituído basicamente por três componentes: água, colágeno e hidroxiapatita, sendo esta última, responsável por fornecer estabilidade estrutural ao corpo, protegendo órgãos vitais como pulmão e coração, e funcionando como um depósito regulador de íons. Tal fase representa aproximadamente 5% do peso total de um indivíduo adulto (VALLET-REGI, 1997).

De Jong (1926) foi o primeiro a observar a semelhança entre os padrões de difração de raios - X da fase mineral dos ossos e da hidroxiapatita, em 1926. A HA sintética é bastante parecida a do osso natural tanto em sua composição química ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, relação molar Ca/P = 1,67), quanto no comportamento *in vivo*, o que constitui uma grande vantagem em seu uso (TADIC, 2004).

A HA é produzida sinteticamente desde o início dos anos 70 e tem sido utilizada clinicamente desde o início dos anos 80 (SCHMITZ *et al.*, 1999). As suas propriedades biológicas são bem documentadas na literatura, sendo utilizada na correção de defeitos ósseos tanto no homem como em outras espécies animais, obtendo-se resultados satisfatórios, o que a torna indicada para a enxertia óssea na rotina clínica (FRANCO *et al.*, 2001; LEGEROS 2002).

A utilização da HA é vantajosa por causa de sua composição uniforme, alta compatibilidade, segurança (não é tóxica, nem alergênica ou carcinogênica) e pelo fato de sua microestrutura (tamanho dos poros) ser completamente controlável (ONO *et al.*, 2000). A porosidade da HA funciona como um suporte passivo à neoformação vascular, propiciando a proliferação de fatores indutores da posição óssea (BORGES, 1998). Para Vidigal Jr. e Goisman (2003), Sakano *et al.* (2001) e Legeros (2002), a superfície porosa fornece um substrato adicional à proliferação do tecido ósseo, permitindo a junção, proliferação, migração e expressão fenotípica de células ósseas, o que resulta em formação de neotecido ósseo em aposição direta ao biomaterial.

Na ortopedia, existe um particular interesse em usá-la como revestimento de próteses metálicas, para promover a ligação interfacial estável entre o material implantado e o tecido vivo. Outra possibilidade é a utilização de hidroxiapatita no tratamento de tumores, onde este material fornece suporte de ação prolongada. A introdução de drogas anti-cancerígenas, em blocos de hidroxiapatita porosa, permite que o tratamento da doença seja realizado com a liberação gradual da droga no organismo (FULMER, 1992). Sob este aspecto, esta técnica é atrativa, pois combina o tratamento do tumor e a neoformação de osso reabsorvido (LIU, 1997).

Na área odontológica, a hidroxiapatita é utilizada para evitar perda óssea após a extração de um ou vários elementos dentários, como também recuperação de áreas com reabsorção óssea, correções buco-maxilares, preenchimento de cavidades císticas, aumento de rebordo alveolar, tratamento de doenças periodontais e revestimentos de pinos de titânio (LEGEROS, 1988; MAVROPOULOS, 1999).

Outros resultados positivos com a utilização de hidroxiapatita foram relatados por Batista (2004), que realizou levantamentos de seio maxilar em três pacientes humanos, para posterior colocação de implantes, obtendo uma taxa de sucesso em 83,3% dos casos. Ribeiro Jr. (2004) também relatou o sucesso da hidroxiapatita aplicada em rebordo alveolar atrófico de paciente humano, com características estéticas e biomecânicas desfavoráveis e doença periodontal avançada e, devido aos resultados clínicos e histológicos positivos, houve um encorajamento por parte do cirurgião dentista na instalação do implante.

No entanto, embora exista esta ampla gama de aplicações de HA com bons resultados, muitos autores apontam como desvantagem, a lentidão de sua reabsorção. A reabsorção é uma característica desejada para uma boa resposta do biomaterial, já que o processo de degradação é concomitante com a reposição do tecido ósseo em formação. Mas, estudos demonstraram que, a hidroxiapatita começa a ser reabsorvida gradualmente após 4 ou 5 anos pós-implantação (NORDSTRÖM, 1990).

Além disso, sua utilização vem sendo feita, geralmente, na forma particulada, e um dos maiores problemas é a sua dispersão para a zona de tecidos moles, causando problemas que incluem a perda das partículas (E'GUES, 2005; RIGO, 2007). Outra desvantagem é sua baixa resistência mecânica, sendo por isso, não indicada onde há suporte de pesos (BORGES, *et al.*, 2000; VITAL, 2005).

Denissen *et al.* (2000), ainda afirma que, o primeiro experimento com hidroxiapatita em alvéolos dentais humanos, que ocorreu há quase três décadas, progrediram positivamente nos seis meses seguintes após a implantação. Porém, após anos de estudos, observou-se uma reabsorção peri-implante do osso alveolar.

Outros estudos também demonstraram que a utilização desta cerâmica para melhorar a neoformação óssea, imediatamente após a extração dentária, pareceu atrasar o processo de reparação e que, o uso de hidroxiapatita microgranular mostrou ter pouco ou nenhum efeito comparado ao grupo controle (BRANDÃO *et al.*, 2002).

Estudos experimentais com ratos também exibiram esta característica. Boeck *et al.* (1999), concluíram que, apesar da existência da compatibilidade biológica, pois a HA foi integrada ao tecido ao longo do processo do reparo, ela atrasou a cronologia do processo de reparo alveolar nestes animais.

Diante da divergência quanto aos resultados clínicos e experimentais observados, nota-se que as diferenças na forma, porosidade, tamanho dos cristais e cristalinidade, podem afetar a solubilidade e reabsorção das biocerâmicas de HA pelo organismo, além do que, fatores do próprio hospedeiro, como espécie animal e local de implantação também podem ser influenciadores de resultados distintos.

2.3.1.2 Fosfato tricálcio (TCP) e suas aplicações

O fosfato de tricálcio pode ocorrer tanto na estrutura monocíclica (α -TCP), quanto na romboédrica (β -TCP). Em ambas, a fórmula constitui-se de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e a relação molar é de $\text{Ca}/\text{Pa} = 1,5$, contendo cerca de 39% de cálcio e 20% de fósforo (LASCART et al., 1998). Ele pode ser encontrado nas formas granular, macroporosa e em gel, sendo a primeira, a mais eficiente, devido aos espaços entre os grânulos, que aumentam a porosidade da matriz e a sua superfície de contato (GUTIERRES, 2006).

A utilização de TCP tem sido demonstrada em diversos trabalhos, tanto na clínica odontológica como em experimentação animal. Sua aplicação abrange desde recuperação de defeitos no palato em cães, passando por tratamento de bolsas periodontais, preenchimento de lesões periapicais, formação de osso alveolar, até preenchimento de defeitos ósseos. Os resultados destas pesquisas, citadas no trabalho de Legeros (1988), são igualmente variados, alguns bem e outros mal-sucedidos, e ainda outros inconclusivos.

O interesse clínico pelo fosfato tricálcio tem sido manifestado devido à sua natureza reabsorvível que, por possibilitar a geração de poros, quando em função, promove a regeneração da estrutura óssea (LEGEROS, 1993; 2002). Esta cerâmica está entre os biomateriais que apresentam as maiores velocidades de degradação, sendo que, estudos mostraram que suas partículas foram parcialmente reabsorvidas entre 6 e 15 semanas após a implantação, variando de acordo com a porosidade (EGGLI, 1988; FRAYSSINET, 1993; BOHNER, 1996; GAO *et al.*, 1997).

No entanto, esta alta taxa de reabsorção pode gerar formação de osso imaturo e outras limitações quanto ao seu uso são o seu pH ácido, que pode levar a processos inflamatórios e necrose, além da baixa resistência mecânica (CARRODÉGUAS, 2003).

Sendo assim, percebe-se que, além das diferenças de composição química, a HA e o TCP apresentam comportamento distinto em meio fisiológico, seguindo a seguinte seqüência de solubilidade: α -TCP > β -TCP > HA (HENCH e WILSON, 1993; ELLIOTT, 1994), além do que, a fase α -TCP apresenta uma maior resistência mecânica em relação aos outros dois. Contudo, existe relato na literatura

de que, a presença desta fase não é favorável para o bom desempenho da cerâmica *in vivo* devido a dois aspectos: ocorrência de tensões provocadas por diferenças de densidade e elevada solubilidade em meio fisiológico, ocasionando sua rápida degradação. Assim, apesar da elevada dureza desses materiais, sua aplicação apresenta restrições (ELLIOT, 1994).

Neste sentido, é de fundamental importância o controle da relação atômica cálcio/fósforo durante as etapas de síntese e processamento destas cerâmicas, uma vez que este parâmetro reflete a solubilidade química delas. Quanto menor esta relação, maior a solubilidade em meio fisiológico, de forma que cerâmicas TCP (Ca/P = 1,5) apresentam uma maior biodegradação que as de HA (Ca/P = 1,67) (WANG *et al.*, 2003). Deve-se também ressaltar que a estabilidade química é função não apenas da composição, mas das propriedades físicas dos pós e dos produtos sinterizados, tais como, tamanho e forma das partículas, área superficial, estrutura cristalina e densidade (KWON *et al.*, 2002; RAYNAUD, *et al.*, 2002).

Por outro lado, as cerâmicas bifásicas HA/ β -TCP, contendo 60% a 70% em massa de HA, disponíveis comercialmente, têm sido utilizadas com sucesso em aplicações *in vivo*, possibilitando a formação de apatita biológica nos poros formados durante a dissolução preferencial do β -TCP (KURASHINA *et al.*, 2002; XIE *et al.*, 2006) e, estas encontram descritas logo abaixo.

2.3.1.3 Fosfatos de cálcio bifásicos e suas aplicações

Quimicamente, HA/TCP é um sal de fosfato de cálcio bifásico com organização cristalina bastante complexa, sendo, geralmente, usados na proporção de dois terços de HA para um terço de β -TCP, com porosidade de 40% a 60%, favorecendo a velocidade e a qualidade da osteointegração e a reabsorção, mas mantendo uma resistência à compressão (MEYNET, 1998).

As cerâmicas com concentrações de 60/40, são constituídas pelas fórmulas de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ em concentração mínima de 60% e $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ na concentração máxima de 40%. O balanço entre esses fosfatos é dado por uma

fase mais estável de HA e uma fase mais solúvel de TCP. Isso faz com que o material possa ser gradualmente dissolvido no corpo, os íons de cálcio e de fosfato sejam lentamente liberados e disponibilizados para que a neoformação óssea se concretize (HEUGHEBAERTE *et al.*, 1988; DACULSI *et al.*, 1989, 1990; LEGEROS *et al.*, 1991).

Farina *et al.* (2008) realizaram um estudo de comparação, utilizando HA/TCP em diferentes proporções, o que segundo os autores, é capaz de provocar mudanças na taxa de reabsorção e de bioatividade desses materiais, uma vantagem para a clínica oral e cirurgia ortopédica. Esse estudo consistiu na avaliação da resposta histológica dos ossos maxilares de cães após extração de todos os pré-molares e tratamento desses defeitos com HA/TCP em proporções de 85% HA e 15% β -TCP em um grupo e 15% HA e 85% β -TCP em outro grupo. Os resultados apontaram que, a maior quantidade de tecido ósseo formado e em menor período de tempo foi a do segundo grupo, sugerindo que neste caso, uma maior concentração de β -TCP serviu para melhorar a resposta osteocondutiva do biomaterial.

A incorporação do $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ à $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ é feita quimicamente durante o seu processo de síntese. A HA apresenta estrutura cristalina monoclinica, caracterizada por um arranjo ordenado de íons OH^- e durante a sua síntese e processamento, há grande dificuldade de se atingir a estequiometria, formando-se a estrutura hexagonal com arranjo de íons OH^- alterados pela presença de moléculas de água e impurezas. Neste caso, a fase secundária formada é geralmente o fosfato tricálcio sendo esta incorporada a primeira (ELLIOTT, 1994).

Cunha *et al.* (2006) avaliaram a influência da relação Ca/P na produção de fosfatos de cálcio sintetizados por precipitação homogênea e seus resultados mostraram que, esta rota de precipitação permite a obtenção de pós monofásicos e bifásicos, de acordo a relação Ca/P dos agentes de partida. Além disso, verificaram que as fases obtidas após a sinterização também ocorrem em função da temperatura empregada, sendo que, as cerâmicas provenientes de pós preparados com excesso de cálcio, resultaram em monofásicas (HA), enquanto as preparadas na relação estequiométrica e sinterizadas a 1250°C, permaneceram

bifásicas (HA/ β -TCP), e ainda, aquelas submetidas ao aumento da temperatura para 1350°C, transformaram-se em trifásicas (HA/ β -TCP/ α -TCP).

A HA/ β -TCP tem sido indicada como material de preenchimento de cavidades cirúrgicas ósseas, como substituto de enxerto ósseo autógeno e alógeno, nos setores de odontologia, ortopedia, traumatologia, neurocirurgia, oncologia, cirurgia plástica estética e reparadora, e cirurgia facial craniana. E também, devido a sua alta capacidade hidrofílica, pode ser utilizado como veículo na técnica do PRP (Plasma Enriquecido de Plaquetas), formando um gel que facilita a colocação do PRP na cavidade óssea.

2.4 CARACTERÍSTICAS MICROESTRUTURAIS DAS BIOCERÂMICAS

O tecido ósseo trabecular possui um índice de porosidade de 90% e o tamanho desses poros é, em média, de 1 mm (KEAVENY *et al.*, 2001; KEAVENY e YEH, 2002; COOPER *et al.*, 2003, 2004), enquanto o cortical apresenta um remanescente de porosidade de 3%. Os biomateriais, para mimetizar este ambiente, devem possuir tais características ou o mais próximo possível, permitindo a osteocondução (CHANG *et al.*, 2000; HABIBOVIC *et al.*, 2005; OKAMOTO *et al.*, 2006).

A porosidade é um requisito importante do biomaterial, essencial para a integração entre o tecido vivo e o implante. Segundo Dubinin (1967), materiais macroporosos, no contexto químico, são aqueles que apresentam poros de 0,1 μ m. No entanto, para que um bom biomaterial seja considerado macroporoso, ele deve apresentar poros da ordem do diâmetro haversiano (50 a 250 μ m) (HENCH, 1982) ou, segundo outros estudos, poros maiores que 100 μ m (HENCH, 1991).

Num estudo feito por Kawachi e Andrade (1997), foi comparada a eficiência de biomateriais densos e porosos, constituídos à base de hidroxiapatita e implantados em fêmures de ratos. Observou-se que, o biomaterial denso induziu a formação de uma cápsula fibrosa ao seu redor, isolando-o do tecido hospedeiro. Em contrapartida, o biomaterial poroso apresentou uma fragmentação de suas

partículas, o que permitiu a invasão de tecido ósseo através de toda a sua extensão. Formando um entrelaçamento entre o tecido e a hidroxiapatita.

Cerâmicas porosas foram utilizadas por vários autores, apresentando poros variando entre 100 e 500 μm e verificou-se um aumento contínuo da quantidade de tecido ósseo formado no interior dos poros, sem, no entanto ser observada a fragmentação das partículas de cerâmica (KOKUBUN *et al.*, 1994; GAUTHIER *et al.*, 1998).

Em 1970, Hulbert demonstrou que poros maiores que 100 μm favorecem o crescimento ósseo através do material, definindo esta porosidade como ótima e relacionada à necessidade de fornecer um suprimento sanguíneo ao tecido conjuntivo em crescimento, fator que só ocorre em materiais com poros com tais dimensões, permitindo o desenvolvimento de um sistema de vasos sanguíneos entremeado com as cerâmicas porosas (HULBERT, 1970).

De acordo com Tsuruga *et al.* (1997), Dong *et al.* (2002) e Karageorgiou e Kaplan (2005), para uma ótima resposta de regeneração óssea, postula-se que o poro tenha o tamanho mínimo entre 200 e 400 μm , induzindo suficiente vascularização, osteocondução e formação de tecido mineralizado dentro do *scaffold*.

De acordo com os estudos estruturais de Klein *et al.* (2009), os poros com até 60 μm proporcionam a entrada de células individuais, porém o pequeno espaço dificulta a formação do tecido mineralizado, enquanto que os poros com mais de 250 μm permitem o crescimento tecidual e a deposição mineral, havendo formação completa do tecido ósseo. Portanto, cabe ao profissional da área verificar o tipo de lesão e a sua extensão, assim como o biomaterial adequado a cada situação. Este autor recomenda que se utilize material com poros de 60 a 250 μm em lesões pequenas e aqueles com mais de 250 μm em defeitos de tamanho crítico.

Outro fator importante para o sucesso da osteocondução é a conectividade entre os poros, que pode se dividir em intraconectividade (conexões dentro das partículas) e interconectividade (conexões entre as partículas). A interconectividade muito pequena entre os poros pode implicar em uma diminuição da entrada de células no *scaffold* (CHANG *et al.*, 2000).

2.5 DINÂMICA DAS BIOCERÂMICAS

LeGeros (1991) discorre sobre o processo de biodegradação ou bioreabsorção dos fosfatos de cálcio, os quais envolvem mudanças físico-químicas após contato entre o biomaterial e o ambiente biológico. As mudanças físicas incluem a desintegração e a quebra em pequenas partículas, havendo perdas da força mecânica, da densidade, mudanças na porosidade, no tamanho e no peso do biomaterial. Já as mudanças químicas incluem, redução do pH na região, causando parcial dissolução do biomaterial e provocando todas as mudanças acima citadas. Isto resulta na redução do tamanho das partículas e elevação na concentração de íons cálcio e fosfato no ambiente levando à formação de outras fases de cálcio e fosfato intimamente associadas à matriz orgânica na superfície do biomaterial ou a incorporação destes na interface entre o novo osso e o implante. É importante considerar que, os processo de bioreabsorção e de biodegradação são afetados por diversos fatores ambientais e materiais, como a espécie, a idade, as doenças, o sítio do implante, o tipo de células envolvidas, o metabolismo e as limitações dos métodos.

De forma genérica, as cerâmicas de fosfato de cálcio degradam com uma velocidade dada na seguinte ordem: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 > \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. A reabsorção do material que representa esta degradação é causada pela dissolução, que depende do produto de solubilidade do material e do pH local no meio fisiológico, pela desintegração física em partículas menores e, ainda, por fatores biológicos, como a fagocitose, a presença de leucócitos e de mediadores químicos que causam a redução do pH local. A velocidade de reabsorção pode aumentar com o aumento da área superficial ($A_{\text{pó}} > A_{\text{sólido poroso}} > A_{\text{sólido denso}}$), com o decréscimo da cristalinidade e, no caso da hidroxiapatita, pela substituição de CO_3 nos sítios de fosfato e por Mg^{2+} , Sr^{2+} nos sítios de Cálcio (HENCH, 1991).

Kawachi *et al.* (1997, 1998), estudaram o potencial de interface de biocerâmicas de fosfato de cálcio através de medidas potenciométricas. Usando cerâmicas de hidroxiapatita (HA), fosfato tricálcio (TCP) e pirofosfato de cálcio sintéticos na construção de eletrodos, o comportamento do potencial de interface das cerâmicas em contato com um fluido que mimetiza o fluido extracelular foi determinado, em uma faixa de pH que corresponde à observada em processos

inflamatórios no corpo humano e à temperaturas ambiente e fisiológica. Os resultados mostraram que HA e TCP apresentam comportamentos semelhantes, atingindo mais rapidamente o potencial de interface de equilíbrio quando o pH da solução diminui e a temperatura aumenta. Este comportamento foi atribuído à formação de uma camada rica em cálcio entre a camada de Nersnt (na qual ocorre a troca iônica) e a superfície do material e que impede o avanço da troca iônica. A formação desta camada rica em cálcio está associada a valores de pH baixos, como os que ocorrem em lesões associadas às lesões cirúrgicas durante um processo de implante ou de trauma ósseo.

A compreensão de todas essas interações contribui significativamente para desvendar os mecanismos de interface do tecido vivo com o biomaterial, possibilitando o desenvolvimento e o aumento da vida útil das biocerâmicas, como também criando bases para a escolha de materiais adequados a cada caso (KAWACHI *et al.*, 2000).

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Com o objetivo de analisar histomorfometricamente o potencial osteocondutor de biomateriais a base de fosfato de cálcio (hidroxiapatita, fosfato tricálcio e hidroxiapatita + fosfato tricálcio), comparando-os com o do enxerto autógeno, propomo-nos a implantá-los em defeitos de tamanho crítico, em crânios de ratos, e a avaliar o processo de reparo ósseo durante os períodos experimentais de 0, 30, 90 e 180 dias.

Para tanto, optamos por utilizar análises radiográfica, morfométrica e morfológica dos crânios diferentemente tratados e paralelamente, estudar microestruturalmente e por Espectrometria de Energia Dispersiva cada tipo de biomaterial.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo (CEEPA – Proc. N° 018/2007), sendo aprovado em 13 de setembro de 2007 (Anexos A e B).

A execução do projeto realizou-se nos laboratórios de Cirurgia Experimental e de Biologia Óssea da disciplina de Histologia, no Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru - FOB/USP.

4.1 BIOMATERIAIS UTILIZADOS

Foram utilizados os biomateriais (ver Figura 1) de nome comercial GenPhos®, produzidos pela empresa BAUMER / Mogi Mirim - SP na forma de micropartículas (0,5 – 0,75 mm), constituídos por:

- a) HA puro (GenPhos HA; Lote: 017180, Fab. 01-2007, Val. 01-2009, com registro na ANVISA nº 10345500004).
 - b) TCP puro (GenPhos TCP; Lote: 016009, Fab. 09-2006, Val. 09-2008, com registro na ANVISA nº 10345500004).
 - c) HA/TCP, na proporção de 60/40 (GenPhos HA/TCP; Lote: 017179, Fab. 01-2007, Val. 01-2009, com registro na ANVISA nº 10345500076).
-

Figura 1 - Biomateriais utilizados: a) GenPhos HA/TCP Lote: 017179, Fab. 01-2007, Val. 01-2009, com registro na ANVISA sob o nº 10345500076; b) GenPhos HA: Lote: 017180, Fab. 01-2007, Val. 01-2009, com registro na ANVISA sob o nº 10345500004 e c) GenPhos TCP: Lote: 016009, Fab. 09-2006, Val. 09-2008, com registro na ANVISA sob o nº 10345500004

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOMATERIAIS PELA ANÁLISE MICROESTRUTURAL E POR ESPECTROMETRIA DE ENERGIA DISPERSIVA (MEV-EDS) AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA

A análise microestrutural e por Espectrometria de Energia Dispersiva dos biomateriais foi realizada no núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) - ESALQ-USP administrado pelo Prof. Elliot Watanabe Kitajima

4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a realização da análise microestrutural coletamos amostras de 5 embalagens de cada tipo de biomaterial, sendo estes armazenados em embalagens estéreis originais. Os fragmentos foram colocados no porta espécime “stub” e levados ao metalizador “sputtering” (MED 010 da Balzers), onde foi realizada a deposição de uma fina camada de ouro (100-200 Å). As amostras foram analisadas em um microscópio de varredura Zeiss DMS 910A, sendo que, as imagens foram

capturadas pelo software DITI (Carl Zeiss) em diversos aumentos e armazenadas no formato "Bitmap do Windows".

4.2.2 Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X – EDS

A microanálise pela Espectrometria de Energia Dispersiva (MEV-EDS) dos biomateriais foi realizada em 5 amostras de cada, recobertas com carbono a partir de um sistema de geração e de captura de raio x da Oxford Instrumental® acoplada ao microscópio de varredura Zeiss DMS910A® (Carl Zeiss – Alemanha), tomando-se o cuidado de manter a distância focal de 25mm e a voltagem acima de 20Kv para uma boa leitura. Os diferentes níveis de energia de raio X foram analisados no software LINK ISIS desenvolvido pela Oxford Instrumentos®. Os gráficos obtidos foram armazenados no formato JPG.

4.3 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais aqui utilizados foram adquiridos a partir do Biotério Central da UNICAMP (CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na área de Ciências em Animais de Laboratório).

O teste biológico dos biomateriais em promover a reparação de lesões ósseas perenes foi realizado em 85 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, com 5 meses de idade, pesando aproximadamente 400g, sendo que 80 destes animais foram divididos em 4 grupos, conforme o tratamento:

Grupo I: (20 animais): β -fosfato tricálcio (micropartículas)

Grupo II: (20 animais): hidroxiapatita (micropartículas)

Grupo III: (20 animais): hidroxiapatita + β -fosfato tricálcio (micropartículas)

Grupo IV: (20 animais): enxerto autógeno

Os 5 animais restantes foram designados Grupo Controle (sem material/zero hora) e foram utilizados para a determinação do volume inicial do defeito.

Todos os animais foram alimentados com ração granulada para ratos e camundongos, da marca Purina e água a vontade durante todo o período de experimentação.

4.4 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

A anestesia geral dos animais foi obtida com aplicação intramuscular de Cloridrato de Ketamina (Dopalen® da Agribrands Ltda) associado ao Cloridrato de Xilazina (Anasedan® da Agribrands Ltda), relaxante muscular e sedativo de uso animal (ver Figura 2).

Figura 2 - Anestésico Geral (Cloridrato de Ketamina - Dopalen®) e relaxante muscular (Cloridrato de Xilazina - Anasedan®)

Após anestesia, realizamos a tricotomia da região fronto-parietal da cabeça do animal com auxílio de lâmina de barbear e a assepsia vigorosa com iodoform alcoólico. Após o isolamento da área cirúrgica, com auxílio de um bisturi número dez, realizamos uma incisão em formato de meia-lua no tegumento de revestimento do crânio (ver figura 3a-b). Em seguida, com a espátula “Molt”, levantamos o retalho posteriormente, expondo amplamente a cortical óssea da região (ver figura 3c-d).

Figura 3 - Procedimentos cirúrgicos: a) tricotomia da região fronto-parietal e isolamento da área cirúrgica; b) incisão em formato de meia-lua no tegumento de revestimento do crânio; c) levantamento do retalho com auxílio da espátula “Molt” e d) exposição da cortical óssea craniana

Posteriormente, com a trefina cirúrgica de 8 mm de diâmetro e com uma irrigação abundante e contínua com solução fisiológica, foi realizada uma perfuração nos ossos parietais transpassando toda espessura da díploe, expondo a dura-máter no fundo das lesões (ver Figura 4).

No caso do grupo controle (sem material/zero hora), a mesma perfuração nos ossos parietais foi realizada, no entanto, a calota craniana foi mantida no interior do defeito ósseo (ver figura 5).

Figura 4 - Procedimentos cirúrgicos: a) trepanação com utilização de trefina cirúrgica de 8mm de diâmetro e b) defeito transósseo expondo a duramáter

Figura 5 - Procedimentos cirúrgicos: calota craniana trefinada mantida no interior do defeito ósseo, em animal do grupo controle sem material/zero hora

A partir deste momento, os biomateriais foram colocados em potes dapping e reservados para serem implantados nos defeitos ósseos (ver figura 6). Em relação ao grupo IV (enxerto autógeno), o osso obtido após a trepanação foi triturado com auxílio de uma lâmina de bisturi número 10 para em seguida ser re-implantado no sítio ósseo.

Figura 6 - Biomateriais e osso autógeno em seus respectivos potes dapping: a) GenPhos TCP; b) GenPhos HA; c) GenPhos HA TCP e d) osso autógeno

Imediatamente após a abertura, os defeitos ósseos foram preenchidos conforme o grupo de tratamento, sendo que, tanto os biomateriais como o osso autógeno foram homogeneizados com sangue do próprio animal. Uma quantidade de aproximadamente 60mm^3 de material homogeneizado (coágulo + biomaterial ou osso) foi medida com o auxílio de uma seringa de 1 mL e implantada em cada um dos defeitos (ver Figuras 7a-b-c-d).

Os retalhos de tegumento foram em seguida recolocados em suas posições e suturados com linha de seda preta para odontologia número quatro Ethicon-Johnson & Johnson (ver figuras 7e-f).

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais até o momento da realização do procedimento de coleta.

Figura 7 - Procedimentos cirúrgicos: a) e b) homogeneização do biomaterial e do osso autógeno, respectivamente, com sangue do próprio animal; c) e d) implantação de 60-70mm³ do homogeneizado de biomaterial e de osso autógeno, respectivamente, no defeito ósseo e) retalhos do tegumento sendo recolocados em suas posições originais e f) sutura realizada com linha de seda para odontologia nº 4

4.5 MORTE DOS ANIMAIS E COLETA DAS CALOTAS CRANIANAS

Todos os animais foram mortos com dose excessiva de anestésico, conforme o período de tratamento de 0, 30, 90 e 180 dias.

As calotas cranianas com as peles sobrepostas foram retiradas com auxílio de uma serra elétrica e fixadas por uma semana em formol tamponado a 10%, quando então, foram radiografadas.

4.6 OBTENÇÃO E ANÁLISE DAS IMAGENS RADIOGRÁFICAS

As imagens radiográficas foram obtidas no Departamento de Estomatologia, Disciplina de Radiologia, da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, com filme oclusal para radiografia dental Kodak Insight IO-41 (Eastman Kodak Company – EUA) e o aparelho de raios-X, modelo X-707 (Yoshida Dental MFC Co., Tóquio, Japão) regulado em 70 KVp e 7mA, sendo a distância foco-filme de 40cm e o tempo de exposição de 0,17s. A revelação foi realizada em conjunto e com critérios rigorosos de tempo e temperatura.

Já em relação à análise radiográfica, procurou-se observar a presença ou ausência de áreas radiodensas na região do defeito.

4.7 PROCESSAMENTO DAS PEÇAS HISTOLÓGICAS

Procedida a obtenção das radiografias, as peças histológicas foram desmineralizadas em solução de EDTA (solução contendo 4,13% de Tritriplex III Merck® e 0,44 % de hidróxido de sódio) à temperatura de 2 a 8°C, por um período aproximado de quarenta dias.

As peças desmineralizadas foram submetidas a procedimentos histológicos padronizados, com desidratação em álcool etílico, diafanização em xilol e inclusão em Histosec - Merck® (parafina + resina sintética). Finalmente, cortes

semi-seriados de 5 μ m de espessura, no sentido latero-lateral, foram obtidos em um micrótomo Jung-Leica® RM2045 e corados pela técnica da Hematoxilina-Eosina (HE).

4.8 DETERMINAÇÃO DO VOLUME INICIAL DO DEFEITO ÓSSEO

Um novo grupo de 5 animais, de mesma linhagem e idade dos previamente utilizados, nomeado grupo controle sem material/zero hora foi submetido aos procedimentos cirúrgicos de trepanação dos ossos parietais, sendo que a calota craniana trefinada foi mantida no interior do defeito, como já descrito anteriormente. Estes animais foram então utilizados para o cálculo do volume inicial do defeito ósseo.

A partir das partes centrais dos cortes latero-laterais, foram medidos a espessura média e o diâmetro médio do defeito ósseo com o auxílio do Software Kontron KS 300 (Carl Zeiss, Germany).

Para estes cálculos foram usados 12 cortes semi-seriados com 400 μ m de intervalo entre eles, por animal. Em cada corte foram capturadas duas imagens que perfaziam todo o defeito e delas obtidas 15 medidas de espessura (ver figura 8a) em intervalos de 0,5mm. Posteriormente, foi calculada a média destas medidas e a espessura média foi então determinada. Nas mesmas imagens foi medido o diâmetro (d) do defeito ósseo (ver figura 8b), sendo que, para o cálculo do volume foi utilizado aquele de maior comprimento.

Figura 8 - Determinação da espessura (a) e do diâmetro (b) do defeito ósseo no Software Kontron KS 300

O volume inicial do defeito ósseo foi calculado pela multiplicação da área do defeito (A) pela espessura média (E): **volume** defeito = **A** defeito x **E** média, onde **A** defeito = $\pi \cdot (d/2)^2$, sendo **d** o diâmetro de cada defeito ósseo obtido pelo software KS300 (ver figura 9)

Figura 9 - Esquema mostrando a área e a espessura (altura) do defeito ósseo, que foram utilizados para a determinação do volume inicial do defeito: $\text{volume}_{\text{defeito}} = A_{\text{defeito}} \times E_{\text{média}}$

4.9 ANÁLISE AO MICROSCÓPIO ÓPTICO

Uma análise morfológica e qualitativa dos cortes histológicos, ao microscópio óptico foi realizada utilizando-se um microscópio binocular da marca OLYMPUS CH2. Na análise microscópica procurou-se observar os seguintes eventos: a) presença de infiltrado inflamatório; b) presença e tipo de tecido conjuntivo; c) reabsorção do biomaterial; e d) formação de tecido ósseo.

4.10 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

4.10.1 Determinação da densidade de volume de tecido ósseo neoformado, de biomaterial implantado e de tecido conjuntivo

As densidades de volume (V_{vi}) do tecido ósseo neoformado, do biomaterial implantado, do tecido conjuntivo foram determinadas em um sistema de análise de imagem digitalizada, composto por um microscópio Zeiss Axioskop II com objetiva de imersão 100X, câmera CCD-IRIS RGB – Sony e software Kontron KS300 (KontronElectronic GMBM) instalado em um computador IBM. Para tanto, foram capturadas 50 imagens de campos histológicos por animal, selecionadas por amostragem sistemática (Weibel, 1969). Para cada imagem obtida foi determinada a

área ocupada por um tipo de estrutura (A_i) e a área total analisada (A). A densidade de área de cada tipo de estrutura foi calculada pela relação $A_{vi} = A_i / A = V_{vi}$.

4.10.2 Determinação do volume absoluto de tecido ósseo neoformado, de biomaterial implantado e de tecido conjuntivo

O objetivo desta pesquisa foi obter dados morfométricos absolutos de volume de tecido ósseo neoformado, de biomaterial e de tecido conjuntivo. Para tanto, determinamos o **volume total da região do enxerto (V_{tre})**, ou seja, o volume do enxerto mais o tecido reacional, conforme o descrito no item 4.8, para cada defeito. A conversão de dados relativos (densidades de volume) em dimensões morfométricas absolutas para cada estrutura analisada (V_{ti}) foi obtida pela seguinte fórmula:

$$(V_{ti} = V_{vi} \times V_{tre})$$

4.10.3 Avaliação morfométrica do número total de osteoblastos e osteócitos

A avaliação dos números de osteoblastos e osteócitos pelo método II de Aherne (1982) foi realizada utilizando-se um retículo de integração II Zeiss colocado em uma ocular Kpl 8x Zeiss.

Em 75 campos histológicos casualizados por amostragem sistemática, contamos o número de imagens de transecções (fatias) de núcleos e núcleos inteiros (n) de cada categoria celular, assim como o número de intersecções que as bordas dos perfis das imagens das transecções e núcleos inteiros fazem com as linhas paralelas do sistema-teste. As contagens foram realizadas em um microscópio Olympus CH2 com objetiva de imersão 100x e os resultados obtidos foram apresentados em unidade de volume de tecido processado.

Conhecendo-se a área total examinada (A), a distância entre as linhas do sistema-teste (d), espessura do corte (t) e o volume total da região do enxerto (V_{tre}),

calculamos o número de cada tipo celular (Ni) pela relação: $Ni = 2n \times V_{tre} / A (c/n \times d + 2t)$ (AHERNE, 1982).

4.11 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Os dados numéricos obtidos foram confrontados entre grupos através da análise de variância (ANOVA) e de contraste entre médias (teste de Tukey) para saber se os mesmos diferiam entre si em um nível de significância de $p = 0,05$, utilizando o software GraphPad Prism.

4.12 OBTENÇÃO DAS FOTOMICROGRAFIAS

Os cortes histológicos corados em HE foram fotografados com uma câmera CCD-IRIS RGB – Sony acoplada a um microscópio Axioskop 2 com objetivas 10x, 20x, 40x e de imersão 100x, procurando-se evidenciar os resultados obtidos, assim como detalhes microscópicos do processo de reparo ósseo.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOMATERIAIS PELA ANÁLISE MICROESTRUTURAL E POR ESPECTROMETRIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X – EDS AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA

5.1.1 Resultados da análise microestrutural pelo Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

Os resultados microestruturais das superfícies dos biomateriais, obtidos a partir da MEV, estão ilustrados nas figuras 10, 12 e 14.

O GenPhos HA apresentou superfície irregular com várias concavidades e fendas (ver figuras 10a-b-c), além de vários micropóros (ver figuras 10d-e) decorrentes do processamento para sua obtenção.

O GenPhos HA/TCP apresentou superfície regular com raras concavidades e fendas (ver figuras 12a-b-c) e ausência de porosidade (ver figuras 12d-e).

O GenPhos TCP apresentou baixa resistência mecânica dos grânulos, os quais facilmente esfarelavam formando micropartículas. Com a incidência dos feixes de elétrons sobre a superfície desta biocerâmica ocorreu a sua desfragmentação, dificultando a obtenção das imagens ao MEV. Dentre os biomateriais, foi o que apresentou superfície mais irregular (ver figuras 14a-b-c-d).

5.1.2 Resultados da análise por Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS) pelo Microscópio Eletrônico de Varredura

Os resultados obtidos pela Espectrometria de Energia Dispersiva de raios-X – EDS, encontram-se ilustrados nas figuras 11, 13 e 15.

Os três biomateriais apresentaram como seus constituintes os elementos químicos O, P e Ca, sendo que a relação Ca/P foi maior para GenPhos HA/TCP e decresceu no sentido de GenPhos HA para GenPhos TCP.

Figura 10 - Fotomicrografia das micropartículas de GenPhos HA ao microscópio eletrônico de varredura: a) Aspecto panorâmico das partículas. 26X; b) Detalhe de uma das partículas mostrando suas superfícies irregulares, com várias concavidades. 100X; c-d-e) Detalhes das superfícies irregulares da partícula exibindo vários microporos. 500X, 1000X, 3000X

SEMQuant results. Listed at 13:38:16 on 10/03/2008

Operator: Usuarios-NAP/MEPA

Client: All ISIS users

Job: QuantMap demonstration data

Spectrum label:

System resolution = 102 eV

Quantitative method: ZAF (2 iterations).

Analysed all elements and normalised results.

1 peak possibly omitted: 0.02 keV

Standards :

O K Quartz 01/12/93

P K GaP 29/11/93

Ca K Wollas 23/11/93

Elmt	Spect.	Element	Atomic
	Type	%	%
O K	ED	30.81	50.96
P K	ED	17.30	14.78
Ca K	ED	51.90	34.27
Total		100.00	100.00

* = <2 Sigma

Figura 11 - Gráfico e dados quantitativos padrões obtidos pela microanálise de RX – EDS para GenPhos HA no aumento de 1000X, ao microscópio eletrônico de varredura

Figura 12 - Fotomicrografia das micropartículas de GenPhos HA/TCP ao microscópio eletrônico de varredura: a) Aspecto panorâmico das partículas. 26X; b) Detalhe de uma das partículas mostrando suas superfícies compactas, com raras concavidades. 100X; c-d-e) Detalhes das superfícies da partícula mostrando a ausência de porosidade. 500X, 1000X, 5000X

SEMQuant results. Listed at 14:02:49 on 10/03/2008

Operator: Usuarios-NAP/MEPA

Client: All ISIS users

Job: QuantMap demonstration data

Spectrum label:

System resolution = 103 eV

Quantitative method: ZAF (2 iterations).

Analysed all elements and normalised results.

2 peaks possibly omitted: 0.02, 1.24 keV

Standards :

O K Quartz 01/12/93

P K GaP 29/11/93

Ca K Wollas 23/11/93

Elmt	Spect.	Element	Atomic
	Type	%	%
O K	ED	18.50	34.82
P K	ED	17.90	17.40
Ca K	ED	63.59	47.77
Total		100.00	100.00

* = <2 Sigma

Figura 13 - Gráfico e dados quantitativos padrões obtidos pela microanálise de RX – EDS para GenPhos HA/TCP no aumento de 1000X, ao microscópio eletrônico de varredura

Figura 14 - Fotomicrografia das micropartículas de GenPhos TCP ao microscópio eletrônico de varredura: a) Aspecto panorâmico das partículas. 50X; b-c-d) Detalhes das superfícies irregulares das partículas. 500X, 1000X, 3000X

SEMQuant results. Listed at 11:22:59 on 10/03/2008

Operator: Usuarios-NAP/MEPA

Client: All ISIS users

Job: QuantMap demonstration data

Spectrum label:

System resolution = 103 eV

Quantitative method: ZAF (3 iterations).

Analysed all elements and normalised results.

1 peak possibly omitted: 0.02 keV

Standards :

O K Quartz 01/12/93

P K GaP 29/11/93

Ca K Wollas 23/11/93

Elmt	Spect.	Element	Atomic
	Type	%	%
O K	ED	47.12	67.17
P K	ED	16.40	12.08
Ca K	ED	36.47	20.75
Total		100.00	100.00

* = <2 Sigma

Figura 15 - Gráfico e dados quantitativos padrões obtidos pela microanálise de RX – EDS para GenPhos TCP no aumento de 1000X, ao microscópio eletrônico de varredura

5.2 RESULTADOS DO VOLUME INICIAL DO DEFEITO ÓSSEO

Os resultados obtidos para o diâmetro médio (mm), para a espessura média (mm) e para o volume inicial (mm³) do defeito encontram-se apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores individuais e a média do diâmetro médio (mm), da espessura média (mm) e do volume inicial (mm³) do defeito para o grupo controle sem material/zero hora

<i>Animais</i>	<i>Diâmetro médio</i>	<i>Espessura média</i>	<i>Volume inicial do defeito</i>
1	8,10	0,84	43,06
2	8,18	0,89	46,59
3	8,22	0,78	41,21
4	8,14	0,69	36,04
5	8,25	0,60	32,27
<i>Média ± Desvio Padrão</i>	8,18 ± 0,06	0,76 ± 0,113	39,83 ± 5,689

A análise da tabela 1 mostrou que:

- a) o diâmetro médio para trefina de 8mm utilizada no trabalho foi de 8,2 mm
- b) a espessura média da tábua óssea na região do defeito foi de 0,76 mm
- c) o volume inicial do defeito ósseo foi em média de 39,83 mm³

5.3 RESULTADOS RADIOGRÁFICOS

Os resultados radiográficos encontram-se apresentados nas Figuras 16, 17, 18 e 19. A análise das imagens radiográficas mostrou que:

-
- No período inicial de zero hora, os defeitos ósseos dos grupos autógeno, HA e HATCP mostraram-se radiodensos devido a presença das partículas implantadas (Fig.16; a-e /f-j /p-t), sendo que, em alguns casos foi possível observar o deslocamento destas para fora da área do defeito (Fig.16; h-q-r-s). Neste mesmo momento, no grupo TCP (Fig.16; k-o), as partículas mostraram-se menos radiodensas do que nos demais grupos, sendo difícil distinguí-las no interior dos defeitos.
 - Após 30 dias de implantação, observou-se que as partículas do enxerto Autógeno (Fig.17; a-e) encontravam-se menos nítidas do que no período anterior, com existência de material mineralizado entre elas. Já em relação aos grupos HA e HATCP (Fig.17; f-j /p-t), as imagens radiográficas pouco se alteraram, com fácil visualização das partículas de biomateriais dentro dos defeitos, enquanto que, no grupo TCP (Fig.17; k-o), a radiodensidade diminuiu em relação ao período anterior, não sendo possível visualizá-las.
 - Aos 90 dias, os defeitos ósseos tratados com enxerto autógeno (Fig.18; a-e) apresentaram grandes áreas radiodensas, onde o tecido mineralizado neoformado se misturava com as partículas de osso autógeno. Nos grupos HA e HATCP (Fig.18; f-j /p-s), as partículas de biomateriais tornaram-se pouco menos radiodensas em relação ao período de 30dias, no entanto, ainda era possível a distinção delas. Ao contrário, no grupo TCP (Fig.18; k-o), observou-se um sutil aumento de radiodensidade, com presença de alguns pontos de mineralização dispersos no interior do defeito ósseo.
 - Ao final dos 180 dias, os defeitos ósseos do grupo Autógeno (Fig.19; a-e) apresentaram-se quase que completamente preenchidos por uma área homogênea e radiodensa, composta por enxerto autógeno (ao centro) mais tecido mineralizado (nas bordas), com presença de poucas áreas radiopacas, mais comumente visualizadas em suas periferias. Nos grupos HA e HATCP (Fig.19; f-j /o-s), a radiodensidade das partículas permaneceu semelhante a do período anterior. No grupo TCP (Fig.19; k-
-

n), foi possível visualizar focos de áreas radiodensas preenchendo os defeitos, indicativos de formação de tecido mineralizado.

Figura 16 - Imagens radiográficas da calvária dos animais do período de **zero hora**: grupos Autógeno (a-e), HA (f-j), TCP (k-o) e HA/TCP (p-t)

Figura 17 - Imagens radiográficas da calvária dos animais do período de **30 dias**: grupo Autógeno (a-e), HA (f-j), TCP (k-o) e HATCP (p-t)

Figura 18 - Imagens radiográficas da calvária dos animais do período de **90 dias**: grupo Autógeno (a-e), HA (f-j), TCP (k-o) e HATCP (p-s); (* o último animal morreu antes do dia de coleta, o que impediu a obtenção da imagem radiográfica)

Figura 19 - Imagens radiográficas da calvária dos animais do período de **180 dias**: grupo Autógeno (a-e), HA (f-i), TCP (k-n) e HATCP (o-s). (*não foi possível a obtenção da imagem radiográfica neste animal)

5.4 RESULTADOS MORFOLÓGICOS

Durante análise dos cortes histológicos, percebemos a existência de uma fragmentação tecidual nos grupos correspondentes ao período de zero hora, provavelmente, decorrente do deslocamento do enxerto dentro da área do defeito durante o procedimento de coleta dos crânios, o que tornou inviável a análise qualitativa e a obtenção das fotomicrografias nestes cortes. Deste modo, a seguir são descritos os resultados morfológicos dos períodos de 30, 90 e 180 dias.

5.4.1 Período de 30 dias

Aos 30 dias, os defeitos ósseos do grupo autógeno (Fig. 20) mostraram-se preenchidos, em sua maioria, por tecido ósseo constituído por partículas de enxerto autógeno envoltas por tecido ósseo neoformado imaturo e pequena quantidade de tecido conjuntivo. Observou-se também, pequenas áreas de reabsorção do enxerto autógeno por células gigantes multinucleadas associadas ao novo tecido ósseo formado.

No mesmo período, os defeitos ósseos do grupo HA (Fig. 21) apresentaram-se constituídos por partículas de biomaterial cercadas por grande quantidade de tecido conjuntivo, contendo muitas células e vasos sanguíneos, sem sinais de reabsorção ou presença de células gigantes multinucleadas. Em relação ao tecido ósseo neoformado, este se mostrou presente em pequena quantidade nas bordas do defeito e na superfície da dura-máter.

Quanto ao grupo TCP (Fig. 22), os defeitos ósseos mostraram-se preenchidos por partículas de biomaterial, contendo em seu interior células e vasos sanguíneos e entre estas, pequenos fragmentos de biomaterial, envoltos por células fagocitárias (macrófagos e células gigantes) que, ao serem reabsorvidos, foram substituídos por tecido conjuntivo. Além disso, foram observadas pequenas áreas de tecido ósseo neoformado próximos às bordas do defeito.

Em relação ao grupo HATCP (Fig. 23), os defeitos ósseos exibiram a presença de partículas de biomaterial e de um tecido conjuntivo rico em células. Houve neoformação óssea tanto nas bordas no defeito, quanto na superfície da dura-máter, sendo possível observar as partículas de biomaterial circundadas pelo novo tecido formado.

Figura 20 - Fotomicrografia do defeito do **grupo Autógeno** no período de **30 dias**. **A)** defeito preenchido por tecido ósseo (TO) composto por enxerto autógeno + tecido ósseo neoformado e em menor quantidade por tecido conjuntivo (CO). 20x; **B)** Detalhe da figura anterior mostrando os fragmentos de enxerto autógeno (Au) envolvidos por tecido ósseo neoformado (asteriscos) e o tecido conjuntivo (CO). 115x; e **C)** detalhe exibindo reabsorção do enxerto autógeno por osteoclastos (seta cinza) e o tecido conjuntivo (CO). 450x. HE

Figura 21 - Fotomicrografia do defeito do **grupo HA** no período de **30 dias**. **A)** defeito preenchido por partículas de biomaterial (HA) envoltas por tecido conjuntivo (CO), além de pequenas porções de tecido ósseo neoformado (asterisco). 20x; **B)** Detalhe da figura anterior mostrando as partículas de biomaterial (HA) envoltas por grande quantidade de tecido conjuntivo (CO) e uma pequena porção de tecido ósseo neoformado (asterisco). 115x; e **C)** detalhe exibindo o tecido conjuntivo (CO), ricamente celularizado e vascularizados entre as partículas do biomaterial (HA). 450x. HE

Figura 22 - Fotomicrografia do defeito do **grupo TCP** no período de **30 dias**. **A)** defeito preenchido por partículas de biomaterial (TCP) envoltas por tecido conjuntivo (CO), além de pequenas porções de tecido ósseo neoformado na borda do defeito (asterisco). 20x; **B)** Detalhe da figura anterior mostrando as partículas de biomaterial (TCP) envoltas por tecido conjuntivo (CO) associado aos fragmentos de biomaterial (CO+Fr). 115x; e **C)** detalhe exibindo células gigantes multinucleadas (seta) reabsorvendo o biomaterial (TCP) e ao lado, fragmentos (Fr) do biomaterial já reabsorvido. 450x. HE

Figura 23 - Fotomicrografia do defeito do **grupo HATCP** no período de **30 dias**. **A)** defeito preenchido por partículas de biomaterial (HATCP) envoltas por tecido conjuntivo (CO), além de várias porções de tecido ósseo neoformado (asterisco). 20x; **B)** Detalhe da figura anterior mostrando as partículas de biomaterial (HATCP) envoltas por tecido ósseo neoformado (asterisco). 115x; e **C)** detalhe exibindo o tecido ósseo neoformado ao redor da partícula de biomaterial (HATCP) e o tecido conjuntivo (CO) ricamente celularizado (HA). 450x. HE

5.4.2 Período de 90 dias

No período de 90 dias, os defeitos ósseos do grupo autógeno (Fig.24) mostraram pouca diferença em relação ao período anterior, sendo caracterizados por poucas áreas de enxerto autógeno em reabsorção e por áreas de tecido ósseo, mais maduro do que o do período anterior, sendo formado a partir das superfícies do enxerto, além da presença de pequena quantidade de tecido conjuntivo.

Nos cortes histológicos do grupo HA (Fig. 25), foi possível observar os defeitos ósseos contendo partículas de biomaterial em reabsorção por células gigantes multinucleadas, circundadas por um tecido conjuntivo mais fibroso do que o período anterior e presença de pequenas áreas de tecido ósseo neoformado.

Assim como nos grupos anteriores, nos cortes histológicos do grupo TCP (Fig. 26), observou-se a presença de células gigantes multinucleadas promovendo a reabsorção das partículas de biomaterial. Além disso, havia uma quantidade nitidamente maior de tecido ósseo em relação ao período de 30 dias, localizada não só na borda do defeito, como também na área central dele. Entretanto, mesmo com esta quantidade elevada de tecido ósseo, observou-se que o volume (espessura) da região total do defeito apresentava-se reduzido, quando comparado aos volumes dos demais grupos. Estava presente também, um tecido conjuntivo rico em células e vasos sanguíneos envolvendo as partículas de biomaterial.

Em relação ao grupo HATCP (Fig. 27), de maneira similar ao período anterior, os defeitos ósseos exibiram presença de partículas de biomaterial envoltas por um tecido conjuntivo mais fibroso do que o do período anterior, além de áreas de tecido ósseo neoformado localizadas nas bordas do defeito e na superfície da dura-máter, sendo possível observar algumas partículas de biomaterial sendo englobadas pelo novo tecido em formação.

Figura 24 - Fotomicrografia do defeito do **grupo Autógeno** no período de **90 dias**. **A)** defeito preenchido por tecido ósseo (TO) composto por enxerto autógeno + osso neoformado e em menor quantidade, por tecido conjuntivo (CO). 20x; **B)** Detalhe da figura anterior mostrando os fragmentos de enxerto autógeno (Au) envolvidos por tecido ósseo neoformado (asteriscos) e o tecido conjuntivo (CO). 115x; e **C)** detalhe exibindo o tecido ósseo neoformado (asterisco) na superfície do osso autógeno (Au). 450x. HE

Figura 25 - Fotomicrografia do defeito do **grupo HA** no período de **90 dias**. **A)** defeito preenchido por partículas de biomaterial (HA) envoltas por tecido conjuntivo (CO), além de pequenas porções de tecido ósseo neoformado (asterisco). 20x; **B)** Detalhe da figura anterior mostrando as partículas de biomaterial (HA) envoltas por tecido conjuntivo (CO) mais fibroso em relação ao período anterior e pequenas áreas de tecido ósseo neoformado (asterisco). 115x; e **C)** detalhe exibindo células gigantes multinucleadas (seta cinza) na superfície do biomaterial (HA) e o tecido conjuntivo fibroso (CO). 450x. HE

Figura 26 - Fotomicrografia do defeito do **grupo TCP** no período de **90 dias**. **A)** defeito preenchido por partículas de biomaterial (TCP) envoltas por tecido conjuntivo (CO), além de porções de tecido ósseo neoformado, tanto na borda, quanto na área central do defeito ósseo (asterisco). 20x; **B)** Detalhe da figura anterior mostrando as partículas de biomaterial (TCP) envoltas por tecido conjuntivo (CO) e uma área de tecido ósseo neoformado (asterisco). 115x; e **C)** detalhe exibindo células gigantes multinucleadas (seta azul) reabsorvendo o biomaterial (TCP), presença de tecido conjuntivo (CO) ao redor das partículas de TCP e porção de tecido ósseo neoformado (asterisco). 450x. HE

Figura 27 - Fotomicrografia do defeito do **grupo HATCP** no período de **90 dias**. A) defeito preenchido por partículas de biomaterial (HATCP) envoltas por tecido conjuntivo (CO), além de várias porções de tecido ósseo neoformado (asterisco). 20x; B) Detalhe da figura anterior mostrando as partículas de biomaterial (HATCP) envoltas por tecido ósseo neoformado (asterisco) e tecido conjuntivo frouxo (CO). 115x; e C) detalhe mostrando uma partícula de biomaterial (HATCP) sendo envolvida por tecido ósseo neoformado e mais periféricamente, presença de tecido conjuntivo fibroso. 450x. HE

5.4.3 Período de 180 dias

Aos 180 dias, os defeitos ósseos do grupo Autógeno (Fig.28) foram caracterizados, predominantemente, pela presença de fragmentos de enxerto sendo englobados pelo novo tecido ósseo, de arranjo lamelar e uma quantidade muito pequena de tecido conjuntivo envolvendo este novo tecido.

No grupo HA (Fig. 29), os defeitos mantiveram quantidades constantes de biomaterial e tecido conjuntivo, em relação ao período anterior, havendo pouca reabsorção das partículas. Da mesma forma, a quantidade de tecido ósseo neoformado mostrou-se pequena, sendo visíveis apenas pequenas áreas onde as partículas encontraram-se invadidas pelo novo tecido.

Em relação ao grupo TCP (Fig 30), as partículas de biomaterial estavam praticamente ausentes neste período, sendo os defeitos ósseos preenchidos por tecido ósseo neoformado, contendo os fragmentos de biomaterial, e por tecido conjuntivo fibroso.

Quanto ao grupo HATCP (Fig 31), não houve alterações morfológicas significativas em relação ao período anterior, de maneira que, os defeitos ósseos mostraram-se preenchidos por grande quantidade de partículas de biomaterial, envoltas em sua maioria, por tecido conjuntivo fibroso e uma menor quantidade de tecido ósseo próximas às suas bordas.

Figura 28 - Fotomicrografia do defeito do **grupo Autógeno** no período de **180 dias**. **A)** defeito preenchido por tecido ósseo (TO) composto por enxerto autógeno + tecido ósseo neoformado e em menor quantidade, por tecido conjuntivo (CO). 20x; **B)** Detalhe da figura anterior mostrando os fragmentos de enxerto autógeno (Au) envoltos por tecido ósseo neoformado (asteriscos) e os pequenos filetes de tecido conjuntivo (CO). 115x; e **C)** detalhe exibindo o tecido ósseo neoformado (asterisco) circundando o enxerto autógeno (AU). 450x. HE

Figura 29 - Fotomicrografia do defeito do **grupo HA** no período de **180 dias**. **A)** defeito preenchido por partículas de biomaterial (HA) envoltas na sua maioria por tecido conjuntivo (CO) e mais raramente por tecido ósseo neoformado (asterisco) semelhante ao observado no período anterior. 20x; **B)** Detalhe da figura anterior mostrando as partículas de biomaterial (HA) envoltas por tecido conjuntivo (CO) e pequenas áreas de tecido ósseo neoformado (asterisco). 115x; e **C)** detalhe exibindo a partícula de biomaterial (HA) circundada por tecido ósseo neoformado (asterisco) com invasão para interior da partícula (seta vermelha). 450x. HE

Figura 30 - Fotomicrografia do defeito do **grupo TCP** no período de **180 dias**. **A)** defeito preenchido por uma quantidade pequena de biomaterial (TCP) envoltas por várias porções de tecido ósseo neoformado (asterisco) e presença de tecido conjuntivo entre estas porções. 20x; **B)** Detalhe da figura anterior mostrando partículas de biomaterial (TCP) que foram reabsorvidas, envoltas por tecido ósseo neoformado (asterisco) e presença de tecido conjuntivo ao redor deste. 115x; e **C)** detalhe exibindo as partículas de biomaterial (TCP) reabsorvidas, sendo invadidas e circundadas por tecido ósseo neoformado (asteriscos). 450x. HE

Figura 31 - Fotomicrografia do defeito do **grupo HATCP** no período de **180 dias**. **A)** defeito preenchido por partículas de biomaterial (HATCP) envoltas por tecido conjuntivo (CO), além de grandes áreas de tecido ósseo neoformado (asterisco). 20x; **B)** Detalhe da figura anterior exibindo uma grande porção de tecido ósseo neoformado e partículas de biomaterial (HATCP) envoltas por tecido conjuntivo frouxo. 115x; e **C)** detalhe mostrando as partículas de biomaterial (HATCP) e a presença de neoformação óssea. 450x. HE

5.5 RESULTADOS MORFOMÉTRICOS

Pela mesma razão descrita nos resultados morfológicos, não foi possível realizar as análises quantitativas dos grupos correspondentes ao período de zero hora. Assim, serão descritos abaixo os resultados morfométricos dos períodos de 30, 90 e 180 dias.

5.5.1 Densidade de volume de tecido ósseo neoformado, material enxertado e tecido conjuntivo

Os resultados obtidos para densidade de volume (%) do tecido ósseo, material enxertado e tecido conjuntivo encontram-se apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4 e Gráficos 1, 2 e 3. Os valores individuais de densidade de volume para cada um destes componentes encontram-se no apêndice A.

Tabela 2 - Média e desvio padrão da densidade de volume (%) de **tecido ósseo** no processo de reparo ósseo para os diferentes grupos de tratamento

Grupos	30dias	90dias	180dias
Autógeno	39,55±5,93	42,52±3,76	41,46±11,05
HA	8,32±3,84	11,20±1,57	15,42±12,67
TCP	10,98±4,93	38,06±13,73	42,95±8,20
HA/TCP	13,01±7,18	16,36±4,19	12,81±5,34

Tabela 3 - Média e desvio padrão da densidade de volume (%) de **material enxertado** no processo de reparo ósseo para os diferentes grupos de tratamento

Grupos	30dias	90dias	180dias
Autógeno	33,72±5,54	31,79±6,72	38,63±6,71
HA	57,87±20,87	53,11±7,08	51,71±2,61
TCP	31,95±4,29	24,55±7,67	20,03±7,49
HA/TCP	57,01±9,62	54,19±10,33	52,72±6,14

Tabela 4 - Média e desvio padrão da densidade de volume (%) de **tecido conjuntivo** no processo de reparo ósseo para os diferentes grupos de tratamento

Grupos	30dias	90dias	180dias
Autógeno	26,72±7,89	25,67±7,32	19,9±5,62
HA	33,81±18,37	35,69±5,76	32,87±12,52
TCP	57,07±5,38	37,39±19,43	37,02±13,20
HA/TCP	29,98±10,31	29,45±8,47	34,47±11,29

Gráfico 1 - Densidade de volume de tecido ósseo, material enxertado e tecido conjuntivo nos diferentes grupos de tratamento durante o período experimental de **30 dias**

Gráfico 2 - Densidade de volume de tecido ósseo, material enxertado e tecido conjuntivo nos diferentes grupos de tratamento durante o período experimental de **90 dias**

Gráfico 3 - Densidade de volume de tecido ósseo, material enxertado e tecido conjuntivo nos diferentes grupos de tratamento durante o período experimental de **180 dias**

A análise das Tabelas 2, 3 e 4 e dos Gráficos 1, 2 e 3, juntamente com a análise estatística mostraram que:

a) não houve diferença estatística significativa nas densidades de volume de tecido ósseo, material enxertado e tecido conjuntivo para o grupo autógeno durante os períodos estudados, sendo que a média de cada um destes componentes foi, respectivamente, de 41,17%, 34,71% e 24,09%. O mesmo ocorreu com os grupos HA e HATCP, sendo que, as médias de tecido ósseo, material enxertado e tecido conjuntivo foram, respectivamente, de: 12,85%, 54,44% e 32,71% para estes dois grupos. Já em relação ao grupo TCP, o percentual médio de tecido ósseo foi de 10,98% aos 30 dias, aumentando 3,46 vezes aos 90 dias e estabilizando aos 180 dias, enquanto que, o percentual de material enxertado aos 30 dias foi de 31,95%, diminuindo gradualmente 0,37 vezes ao final do período experimental. Quanto ao percentual de tecido conjuntivo no grupo TCP, não houve diferença estatística entre os períodos analisados, permanecendo este com uma média de 43,82%.

b) em relação ao percentual de tecido ósseo, aos 30 dias, não existiu diferença estatística significativa entre os grupos HA, TCP e HATCP. Porém, a densidade de volume nestes grupos foi, em média, 0,72 vezes menor do que a do grupo autógeno. Nos períodos de 90 e 180 dias, a densidade de volume de tecido ósseo nos grupos HA e HATCP foi, em média, 0,67 vezes menor em relação aos grupos autógeno e TCP.

c) quanto ao material enxertado, no período de 30 dias, os grupos HA e HATCP apresentaram uma densidade, em média, 1,74 vezes maior em relação aos grupos autógeno e TCP. A densidade média nos grupos HA e HATCP, nos respectivos períodos de 90 e 180 dias, foi 1,68 vezes e 1,34 vezes maior em relação ao grupo autógeno e ainda, 2,18 vezes e 2,60 vezes maior em relação ao grupo TCP. Ao contrário, no grupo TCP, este percentual foi 0,48 vezes menor do que no grupo autógeno.

d) aos 30 dias, os grupos Autógeno, HA e HATCP exibiram uma densidade de volume de tecido conjuntivo, em média, 0,46 vezes menor do que o grupo TCP. E nos períodos subseqüentes, não houve diferença estatística significativa no percentual de tecido conjuntivo entre os grupos analisados.

5.5.2 Volume total da região do enxerto para os diferentes grupos de tratamento

Os resultados obtidos para o volume total da região do enxerto (mm^3) dos diferentes grupos de tratamento, durante os períodos de 30, 90 e 180 dias, encontram-se apresentados na Tabela 5 e Gráfico 4. Os valores individuais do volume total da região do enxerto para cada um dos grupos encontram-se no apêndice B.

Tabela 5 - Média e desvio padrão do volume total da região do enxerto (mm^3) no processo de reparo ósseo para os diferentes grupos de tratamento

Grupos	30dias	90dias	180dias
Autógeno	53,92±7,85	50,36±6,44	56,55±7,31
HA	59,65±7,70	60,01±9,77	60,73±7,85
TCP	40,15±6,80	34,82±11,33	39,84±8,24
HA/TCP	53,23±4,95	61,38±8,87	58,20±4,70

Gráfico 4 - Volume total da região do enxerto nos diferentes grupos de tratamento durante os períodos experimentais de **30, 90 e 180 dias**

A análise da Tabela 5 e do Gráfico 4, juntamente com a análise estatística mostraram que:

a) não houve diferença estatística significativa no volume total da região de enxerto para o grupo autógeno nos períodos de 30, 90 e 180 dias, sendo que sua média foi de 53,61 mm³. O mesmo ocorreu com os grupos HA, TCP e HATCP, sendo que as médias de seus respectivos volumes foram de 60,13mm³, 38,27mm³ e 57,60mm³.

b) aos 30, 90 e 180 dias não houve diferença estatística significativa entre os grupos autógeno, HA e HATCP. No entanto, o grupo TCP apresentou um volume 27,59% menor em relação aos demais grupos no período de 30 dias; 42,62% menor em relação aos grupos HA e HATCP no período de 90 dias; e 31,82% menor em relação aos grupos restantes no período de 180 dias.

5.5.3 Volumes absolutos de tecido ósseo neoformado, material enxertado e tecido conjuntivo

Os resultados obtidos para o volume absoluto (mm³) de tecido ósseo, material enxertado e tecido conjuntivo encontram-se apresentados nas Tabelas 6, 7 e 8 Gráficos 5, 6 e 7. Os valores individuais de volume absoluto para cada um destes componentes encontram-se no apêndice C.

Tabela 6 - Média e desvio padrão do volume absoluto (mm³) de **tecido ósseo** no processo de reparo ósseo para os diferentes grupos de tratamento

Grupos	30dias	90dias	180dias
Autógeno	21,18±3,45	21,41±3,46	23,6±7,81
HA	4,94±2,47	6,78±1,76	9,45±8,19
TCP	4,16±1,21	13,93±7,25	17,53±6,08
HA/TCP	6,89±3,58	10,11±2,94	7,55±3,40

Tabela 7 - Média e desvio padrão do volume absoluto (mm³) de **material enxertado** no processo de reparo ósseo para os diferentes grupos de tratamento

Grupos	30dias	90dias	180dias
Autógeno	18,51±5,97	19,97±4,68	21,85±4,50
HA	34,56±13,95	32,22±8,43	31,39±4,25
TCP	12,89±3,10	9,10±4,13	8,24±4,05
HA/TCP	30,33±5,81	33,70±10,24	30,80±5,35

Tabela 8 - Média e desvio padrão do volume absoluto (mm³) de **tecido conjuntivo** no processo de reparo ósseo para os diferentes grupos de tratamento

Grupos	30dias	90dias	180dias
Autógeno	12,89±4,14	12,33±2,94	10,57±2,78
HA	20,15±11,78	21,01±1,28	19,89±7,77
TCP	23,09±5,55	11,80±5,27	14,07±3,21
HA/TCP	16,01±5,95	17,58±3,29	19,96±5,99

Gráfico 5 - Volumes absolutos de tecido ósseo, material enxertado e tecido conjuntivo nos diferentes grupos de tratamento durante o período experimental de **30 dias**

Gráfico 6 - Volumes absolutos de tecido ósseo, material enxertado e tecido conjuntivo nos diferentes grupos de tratamento durante o período experimental de **90 dias**

Gráfico 7 - Volumes absolutos de tecido ósseo, material enxertado e tecido conjuntivo nos diferentes grupos de tratamento durante o período experimental de **180 dias**

A análise das Tabelas 6, 7 e 8 e dos Gráficos 5, 6 e 7, juntamente com a análise estatística mostraram que:

a) não houve diferença estatística significativa nos volumes ocupados pelo tecido ósseo, pelo material enxertado e pelo tecido conjuntivo no grupo autógeno durante os períodos de 30, 90 e 180 dias, sendo que a média do volume absoluto para cada um destes componentes foi, respectivamente, de 22,06 mm³, 20,11mm³ e 11,93mm³. O mesmo ocorreu com os grupos HA e HATCP, sendo que, as médias de tecido ósseo, material enxertado e tecido conjuntivo foram, respectivamente, de: 7,62mm³, 32,16mm³ e 19,10mm³ para estes dois grupos. Já em relação ao grupo TCP, o volume médio de tecido ósseo foi de 4,16mm³ aos 30 dias, passou para 13,93mm³ aos 90 dias (aumento de 70,27%) e manteve-se constante ao final dos 180 dias; enquanto que, o volume absoluto de material enxertado manteve-se constante durante todo período experimental (média de 10,07 mm³). Já, o volume absoluto de tecido conjuntivo para este mesmo grupo foi de 23,09 mm³ aos 30 dias, sendo que, este valor diminuiu para 11,80 mm³ aos 90 dias (redução de 48,89%) e tornou-se constante até o final do período experimental.

b) no volume absoluto de tecido ósseo, não houve diferença estatística entre os grupos HA, TCP e HATCP durante todos os períodos experimentais. No entanto, aos 30 dias, o volume de tecido ósseo em cada um destes grupos foi respectivamente, 76,67%, 80,35% e 67,46% menor em relação ao grupo autógeno.

No período subsequente, os grupos HA e HATCP apresentaram volumes, respectivamente, 68,33% e 52,77% menores em relação a este mesmo grupo. E aos 180 dias, da mesma forma, o volume de tecido ósseo nos grupos HA e HATCP foram, respectivamente, 59,95% e 68% menores do que no grupo autógeno.

c) aos 30 dias, o grupo HA exibiu um volume absoluto de material enxertado 46,44% e 62,70% maior em relação aos grupos autógeno e TCP, respectivamente, enquanto que, o grupo HATCP apresentou um volume 57,50% maior em relação ao grupo TCP. Aos 90 dias, o grupo HATCP exibiu um volume de enxerto 40,74% e 72,99% maior em relação aos grupos autógeno e TCP, respectivamente, enquanto que, o grupo HA apresentou um volume 71,75% maior em relação ao grupo TCP. No último período experimental, o volume de enxerto nos grupos HA e HATCP foi, em média, 29,72% maior em relação ao grupo autógeno e 73,49% maior em relação ao grupo TCP, enquanto que, o grupo autógeno exibiu um volume 62,28% maior em relação ao grupo TCP.

d) com relação ao volume absoluto de tecido conjuntivo, não houve diferenças significantes entre os grupos durante os 30 dias iniciais. Mas, aos 90 dias, o grupo HA apresentou um volume, em média, 42,57% maior do que os grupos autógeno e TCP; e aos 180 dias, os grupos HA e HATCP apresentaram um volume, em média, 29,38% maior em relação ao grupo TCP.

5.5.4 Número absoluto de células ósseas (osteoblastos e osteócitos)

Os resultados obtidos para o número absoluto ($\times 10^2$) de osteoblastos e osteócitos encontram-se apresentados na Tabela 9 e Gráficos 8, 9 e 10. Os valores individuais dos números absolutos destas células encontram-se no apêndice D.

Tabela 9 - Média e desvio padrão do número absoluto de ($\times 10^2$) de **osteoblastos (B)** e **osteócitos (C)** envolvidos no processo de reparo ósseo para os diferentes grupos de tratamento

PERÍODOS	30 DIAS		90 DIAS		180 DIAS	
	B	C	B	C	B	C
AUTÓGENO	118,57 $\pm$ 40,41	178,57 $\pm$ 31,23	70,95 $\pm$ 10,82	127,33 $\pm$ 15,54	39,64 $\pm$ 11,53	117,59 $\pm$ 31,62
HA	21,80 $\pm$ 8,00	86,72 $\pm$ 33,21	41,15 $\pm$ 30,27	127,86 $\pm$ 74,72	36,34 $\pm$ 16,65	105,78 $\pm$ 46,43
TCP	5,64 $\pm$ 4,78	37,01 $\pm$ 14,42	67,46 $\pm$ 49,82	166,13 $\pm$ 101,96	84,36 $\pm$ 14,95	145,60 $\pm$ 55,14
HA/TCP	31,87 $\pm$ 18,80	191,82 $\pm$ 61,67	52,43 $\pm$ 9,63	158,35 $\pm$ 37,86	51,21 $\pm$ 11,14	122,74 $\pm$ 36,23

Gráfico 8 - Números absolutos de osteoblastos e osteócitos nos diferentes grupos de tratamento durante o período experimental de **30 dias**

Gráfico 9 - Números absolutos de osteoblastos e osteócitos nos diferentes grupos de tratamento durante o período experimental de **90 dias**

Gráfico 10 - Números absolutos de osteoblastos e osteócitos nos diferentes grupos de tratamento durante o período experimental de **180 dias**

A análise da Tabela 9 e dos Gráficos 8, 9 e 10, juntamente com a análise estatística mostraram que:

a) nos grupos HA e HATCP, o número de osteoblastos e de osteócitos permaneceu constante durante todos os períodos experimentais. Em HA, os valores médios de osteoblastos e osteócitos foram respectivamente, de $33,09 \times 10^2$ e $106,78 \times 10^2$. Enquanto que, em HATCP, foram respectivamente, de $45,17 \times 10^2$ e $157,63 \times 10^2$. Já em relação ao grupo autógeno, os números de osteoblastos e osteócitos diminuíram gradualmente com o decorrer no tempo. Aos 30 dias, os números de osteoblastos e osteócitos neste grupo foram respectivamente, de $118,57 \times 10^2$ e $178,57 \times 10^2$, ocorrendo uma redução respectiva de 40,16% e 29,09% aos 90 dias e estabilizando-se até o final de 180 dias. Ao contrário do grupo autógeno, o grupo TCP exibiu um aumento gradual de células com o passar do tempo. Neste caso, aos 30 dias, os números de osteoblastos e osteócitos foram respectivamente, de $5,64 \times 10^2$ e $37,01 \times 10^2$, ocorrendo um aumento respectivo de 91,63% e 77,72% aos 90 dias e mantendo-se estável até o final 180 dias.

b) no número absoluto de osteoblastos, não houve diferença estatística significativa entre os grupos HA, TCP e HATCP durante os 30 dias iniciais. No entanto, em tal período, o número de osteoblastos nestes grupos foi, em média, 83,32% menor, quando comparado com o grupo autógeno. No período subsequente, não houve diferença significativa entre os grupos analisados. Porém, aos 180 dias, o número de osteoblastos nos grupos autógeno, HA e HATCP foi, em média, 49,74%

menor, quando comparado com o grupo TCP.

c) quanto ao número absoluto de osteócitos, o grupo HA apresentou um valor, em média, 53,11% menor que os grupos autógeno e HATCP e ainda, o grupo TCP apresentou um valor, em média, 79,98% menor que estes mesmos dois últimos grupos. Aos 180 e 90 dias, não ocorreram diferenças significantes no número de osteócitos entre os grupos analisados.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

6.1 MODELO EXPERIMENTAL ADOTADO

Com a finalidade de contribuir para o conhecimento na área de reparo ósseo, uma série de normas e padrões foram estabelecidos para orientar os testes laboratoriais dos biomateriais ósseo-substitutos que vem sendo desenvolvidos, tornando o uso destes o mais seguro possível tanto na clínica médica, como na odontológica. Neste âmbito, encontra-se a norma “ISO 10993-1: General Principles”, que apresenta os princípios fundamentais que governam a avaliação biológica de biomateriais e dispositivos biomédicos, servindo como parâmetro nesta e em outras pesquisas que visam testar a citocompatibilidade, a biocompatibilidade, a capacidade osteogênica, entre outras propriedades dos biomateriais.

Embora os biomateriais usados nesta pesquisa já tenham sido submetidos a estes testes e já estejam disponíveis comercialmente, o que se percebe na literatura é uma grande divergência quanto aos resultados clínicos e experimentais. Tal fato nos leva a crer que, variáveis como forma, porosidade e tamanho dos cristais dos biomateriais, assim como fatores do próprio hospedeiro (espécie e local de implantação), podem levar a resultados distintos. Por esta razão, mais pesquisas precisam ser desenvolvidas a fim de um melhor entendimento quanto ao potencial osteocondutor das biocerâmicas e pela busca daquele que mais se aproxime do padrão ouro, o enxerto autólogo.

Dentro deste contexto, um dos modelos mais utilizados para avaliar o potencial de novos biomateriais, que possuem a finalidade de promover a neoformação óssea, é o estudo em defeitos críticos em calvária de ratos, considerando-se “defeito crítico” como aquele em que o organismo, por si só, não apresenta a capacidade de restabelecer o tecido perdido e sendo este, objeto de discussão na literatura (SCHMITZ e HOLLINGER, 1986; BOSCH *et al.*, 1998; MARDAS *et al.*, 2002; DONOS *et al.*, 2005.)

Segundo Bosch *et al.* (1998), dois defeitos bilaterais na calvária, com 5 mm de diâmetro cada, permite um experimento com *design* pareado, evitando a

inclusão da sutura sagital no defeito ósseo, além de minimizar a taxa de morbidade e reduzir o risco de danos ao sino médio-sagital.

Ao contrário, outros pesquisadores (PATEL *et al.*, 2008; MESSORA *et al.*, 2008; de OLIVEIRA *et al.*, 2008; INTINI *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2009) vêm utilizando outro padrão metodológico como modelo de defeito crítico. Neste caso, os dois defeitos são substituídos por apenas um de 8 mm de diâmetro, localizado na região sagital-média do crânio. Objetiva-se desta forma, evitar a co-influência dos defeitos entre si, eliminando-se mais um viés na pesquisa; além do mais, a bilateralidade de defeitos com localizações muito próximas, pode gerar a confluência destes em um único defeito, com o dobro do tamanho do esperado.

Em vista do acima exposto, optou-se neste estudo, pela utilização do modelo de defeito crítico de 8 mm, que já vem sendo utilizado em diversos trabalhos de nosso laboratório.

6.2 ANÁLISE MICROESTRUTURAL E RELAÇÃO Ca/P DOS BIOMATERIAIS

A análise por microscopia eletrônica de varredura é uma técnica amplamente empregada na caracterização de biomateriais (MANSO *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2005; RIGO *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2009). Sua grande vantagem consiste na observação direta da superfície do biomaterial e na caracterização de sua porosidade, características estas que interferem diretamente na resposta celular e tecidual quando implantado *in vivo*.

Da mesma maneira, a análise por Espectrometria de Energia Dispersiva é um acessório essencial no estudo de caracterização microscópica de materiais. Quando o feixe de elétrons incide sobre um mineral, os elétrons mais externos dos átomos e os íons constituintes são excitados, mudando de níveis energéticos. Ao retornarem para sua posição inicial, estes liberam a energia adquirida, que é emitida em comprimento de onda no espectro de raios-X. Um detector instalado na câmara de vácuo do MEV mede a energia associada a esse elétron. Como os elétrons de um determinado átomo possuem energias distintas, é possível, no ponto de

incidência do feixe, determinar quais os elementos químicos presentes naquele local e assim identificar em instantes que mineral está sendo observado.

Sendo assim, o uso em conjunto da EDX com a MEV é de grande importância na caracterização do biomaterial, pois, enquanto a MEV proporciona nítidas imagens (ainda que virtuais, pois o que se vê no monitor do computador é a transcodificação da energia emitida pelas partículas, ao invés da radiação emitida pela luz, ao qual estamos habitualmente acostumados), a EDX permite sua imediata identificação. Além da identificação mineral, o equipamento ainda permite o mapeamento da distribuição de elementos químicos por minerais, gerando mapas composicionais de elementos desejados.

Beneficiando-se das vantagens supracitadas, tais técnicas foram utilizadas para observar as características de superfície dos materiais aqui investigados, além da relação Ca/P de cada um deles. As características microestruturais observadas nas cerâmicas nos trazem informações de extrema relevância, visto que, existe uma estreita relação entre a eficiência do biomaterial em promover a neoformação óssea e a geometria, o tamanho e a uniformidade de suas partículas.

Curiosamente, os diferentes resultados microestruturais de HA (superfície irregular, muitas concavidades, fendas e microporos) e HA/TCP (superfície irregular, poucas concavidades, fendas e ausência de poros) culminaram em resultados histomorfométricos similares em relação à baixa reabsorção de suas partículas e a pequena quantidade de tecido ósseo neoformado. Por outro lado, o TCP, que apresentou superfície mais irregular e fácil fragmentação, exibiu a maior velocidade de reabsorção de suas partículas e produziu uma quantidade também maior de tecido ósseo em relação aos outros materiais. Neste caso, a ausência de porosidade de HA/TCP e a fragmentação de TCP podem servir como indícios da baixa eficiência ostecondutora, apresentada pelo primeiro, e a maior degradação observada pelo segundo, cuja reabsorção permitiu a criação de poros e favoreceu o crescimento ósseo.

As cerâmicas são produzidas por reações de síntese, onde ao final delas obtém-se a formação de pós cerâmicos, sendo estes então, conformados para experimentação. Dentre as técnicas de conformação, a prensagem se destaca pela

facilidade do processamento e pelo baixo custo envolvido. Subseqüentemente, os compactos são sinterizados em elevadas temperaturas, resultando em um material coeso e de maior resistência mecânica. Neste caso, mudanças na compactação dos pós e nas condições de sinterização resultam em materiais com diferentes características químicas e físicas, dentre elas a porosidade (ROSA, *et al.*, 2002). Desta forma, a diminuição do volume da amostra ocorre em consequência da densificação da cerâmica durante a sinterização, a qual determina o seu nível de porosidade. Segundo Hawachi (2000), o aumento da porosidade diminui a resistência mecânica do material isoladamente, mas por outro lado, a existência de poros com dimensões adequadas favorece o crescimento do tecido através do material aumentando a resistência *in vivo*.

Uma explicação complementar consiste no fato da formação tecidual ser determinada por incontáveis sinais bioquímicos entre as células, além disso, os parâmetros físicos e geométricos têm mostrado ser significantemente importantes em nível de uma única célula, afetando o crescimento tecidual e a reparação óssea. O trabalho de Rumpler *et al.* (2008) mostra que a taxa de crescimento local do tecido formado por osteoblastos é fortemente influenciada pelas formas geométricas dos canais dentro da matriz tridimensional artificial. Efeitos derivados de curvatura e forças mecânicas no tecido podem explicar os padrões de crescimento, indicando que a célula na superfície do tecido é capaz de sentir e reagir ao raio de curvatura muito mais do que ao tamanho da própria célula. Isso tem importantes implicações para o entendimento da remodelação óssea e da cura do defeito, bem como o *design* do *scaffold* para a engenharia óssea. Haja vista estas informações, pode-se sugerir que a arquitetura apresentada pelas cerâmicas, como as superfícies irregulares, podem ter contribuído para os resultados obtidos.

A permanência do biomaterial no local por um tempo adequado, que permita a restauração do defeito por um novo tecido, é um fator que merece nossa atenção. Nesta pesquisa, os biomateriais HA e HA/TCP demonstraram ter uma reabsorção mais lenta e TCP mais rápido. Contrariamente acontece aos resultados de Lange *et al.* (2009), onde as partículas de TCP e HA foram testadas *in vitro*, em colônias de células mononucleares, e verificou-se uma menor indução de moléculas responsáveis pela osteoclastogênese (OPG, RANKL, MS-CSF) nas partículas de TCP do que de HA. Esta variação em relação aos resultados dos dois trabalhos

reforça as evidências de que as características geométricas e físicas das partículas, que compõem os biomateriais, exercem influência sobre o período de reabsorção das mesmas, o que é crítico para a ocorrência do processo de neoformação tecidual (MALMSTRÖM *et al.*, 2007; WALSH *et al.*, 2008). Além do mais, nos testes realizados *in vivo*, a quantidade de variáveis se torna intensamente maior, ao contrário dos testes *in vitro*, onde se tem um microambiente sob condições facilmente controláveis.

Por outro lado, no que diz respeito taxa de reabsorção dos diferentes materiais, a maioria dos trabalhos *in vivo* concordam com os resultados aqui obtidos (EGGLI, 1988; NORDSTRÖM, 1990; FRAYSSINET, 1993; BOHNER, 1996; GAO *et al.*, 1997; BOECK *et al.*, 1999; BRANDÃO *et al.*, 2002; LEGEROS, 1993, 2002), sendo o grau de dissolução de HA menor do que o do TCP.

A reabsorção das cerâmicas é decorrente da dissolução físico-química, que depende do produto de solubilidade do material e do pH local no meio fisiológico, ocasionando a sua desintegração física em partículas menores e também, dos fatores biológicos, como a fagocitose celular. Além disso, a velocidade de reabsorção também pode ser intensificada com o aumento da área superficial das partículas (pó>sólido poroso>sólido denso) (HENCH, 1991). Este fato pode ser observado em nossas fotomicrografias, onde um número menor de células reabsortivas foi observado nas superfícies dos materiais HA e HA/TCP, cujas partículas eram mais compactas. Enquanto que no TCP, devido à microfragmentação das partículas e ao subsequente aumento da área de superfície, verificou-se um número maior de células fagocitárias e que estavam presentes desde os 30 dias iniciais.

Quanto à relação Ca/P, verificamos em nosso estudo que, os três tipos de biomateriais comparados possuíam como seus constituintes os elementos químicos O (Oxigênio), P (Fósforo) e Ca (Cálcio); sendo que, a relação de Ca/P seguiu a ordem decrescente: HA/TCP > HA > TCP. Segundo Wang *et al.* (2003), quanto menor a relação Ca/P, maior a solubilidade do biomaterial, o que explica a maior biodegradação do TCP (Ca/P = 1,5) em relação ao HA (Ca/P = 1,67). Assim, a maior quantidade de Ca pode ajudar explicar a maior resistência à reabsorção apresentada pelos biomateriais HA e HA/TCP, mostrando que a composição dos biomateriais, assim como a proporção adequada dos elementos Ca e P são

necessárias na obtenção de resultados satisfatórios. Estudos mostram que a composição química das biocerâmicas (geralmente Cálcio e Fósforo) e a proporção entre os seus elementos químicos, devem apresentar similaridade com a do osso natural, podendo influenciar, sob condições biológicas, a viabilidade dos osteoblastos, a produção de colágeno, a atividade da fosfatase alcalina e a produção do óxido nítrico (LIU *et al.*, 2008).

Vale a pena salientar também que, as reações de síntese, tanto por via seca, como via úmida, muitas vezes conduzem à obtenção de materiais com composição estequiométrica não bem definida (HONDA *et al.*, 1990). Quando estes materiais são sintetizados pelo método de precipitação por hidrólise, por exemplo, a apatita obtida é geralmente deficiente em cálcio ($\text{Ca/P} < 1,67$) ou contém carbonato, que faz com que a relação Ca/P seja mais alta que os valores estequiométricos (WOJCIECH e SUCHANEK, 1998). Portanto, isto faz com que a solubilidade dos compostos de fosfato de cálcio varie consideravelmente (JOHNSSON e NANCOLLAS, 1992) e esta pode ter sido a causa da baixa reabsorção apresentada pelas partículas das cerâmicas HA e HA/TCP nesta pesquisa.

Assim, os casos de insucesso dos materiais podem estar relacionados aos métodos utilizados durante o processo de síntese. Lu *et al.* (2006) verificou em um estudo *in vitro*, que partículas do biomaterial com o processo de sinterização insuficiente ou incompleto durante sua produção, pode provocar citotoxicidade e danos teciduais, prejudicando a osteogênese no local do defeito. Além disso, verificou-se neste mesmo estudo que, a concentração elevada de partículas (10000/célula) pode inibir a viabilidade de proliferação celular. Percebe-se então, que todas estas variáveis devem ser levadas em consideração, objetivando o aperfeiçoamento dos novos biomateriais que vêm sendo desenvolvidos e a aquisição de um melhor desempenho osteocondutor por parte deles.

6.3 ANÁLISES RADIOGRÁFICA, MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA

Constata-se na literatura que bons estudos comparativos entre diferentes biomateriais ainda são inconclusivos ou escassos, e raros são aqueles em que se comparam os substitutos ósseos com o padrão-ouro (STEIN *et al.*, 2009).

Outro fator de extrema relevância é a validade dos métodos usados para se avaliar a reparação óssea. Embora muitos trabalhos utilizem apenas a análise radiográfica como método de avaliação do reparo de defeitos ósseos, optou-se aqui, por realizar diferentes tipos de análises (radiográfica, morfológica e morfométrica), a fim de que os resultados pudessem ser complementados entre si, fornecendo uma visão mais completa dos eventos ocorridos durante processo de neoformação óssea. Pryor *et al.* (2006), da mesma forma, verificaram que, embora as avaliações radiográficas possam ter a vantagem de ser menos dispendiosas e demoradas, elas não oferecem a mesma exatidão das análises histomorfométricas, em relação à quantidade de tecido ósseo formado. Segundo esses autores, a análise radiográfica tende a subestimar a quantidade de tecido ósseo em defeitos parcialmente fechados e superestimar naqueles completamente fechados.

Além disso, faz necessário salientar que um dos diferenciais do presente trabalho foi a obtenção de dados morfométricos absolutos, os quais permitiram a análise da quantidade de enxerto, de tecido ósseo e de tecido conjuntivo presente em toda região compreendida pelo defeito ósseo, ao passo que, os dados morfométricos relativos, comumente encontrados na literatura, nos fornecem apenas os valores referentes a uma determinada parte do defeito e não ao defeito como um todo. Assim sendo, discutimos os resultados morfométricos, correlacionando-os aos resultados morfológicos e radiográficos obtidos.

Tomando-se por base a quantidade de homogeneizado colocado no momento do implante (60 mm^3), nosso estudo não demonstrou variação com relação ao volume total da região do enxerto em todos os grupos analisados, ao longo dos 30, 90 e 180 dias. No entanto, na análise entre grupos, o grupo TCP apresentou, já aos 30 dias, um volume 27,59% menor, em relação a todos os outros, e no período de 180 dias, este volume reduzido se manteve (31,82%) em relação aos demais. Tal fato foi confirmado, na análise morfológica, pela presença de células gigantes multinucleadas ao redor de suas partículas (indicativas de processo de reabsorção) e pela pequena quantidade de biomaterial existente ao final dos 180 dias, o que acarretou uma diminuição no volume total da região do enxerto. Portanto, considerando o fato do volume inicial do defeito ter sido de $39,83 \text{ mm}^3$, podemos inferir que o biomaterial TCP não apresentou tão boa resposta, já que a média do seu volume total da região do enxerto foi de $38,27 \text{ mm}^3$, enquanto que, nos grupos

Autógeno, HA e HA/TCP, as médias foram de 53,61mm³, 60,13mm³ e 57,60mm³, respectivamente. Deste modo, percebe-se que houve um ganho médio de 57,11% nos volumes destes últimos grupos.

Da mesma forma, em relação ao volume absoluto de enxerto, não foram observadas diferenças significantes nos diferentes grupos de tratamento com o decorrer do tempo. Já na comparação entre os grupos, aos 30 dias, o grupo TCP apresentou um volume, em média, 60% menor, quando comparado aos grupos HA e HA/TCP, mantendo esta diferença até ao final do experimento, sendo que, no último período, o seu volume também se mostrou menor em relação ao grupo autógeno (cerca de 62%). Neste momento, o grupo autógeno exibiu um volume absoluto de enxerto, 29,72% menor quando comparado aos grupos HA e HA/TCP, corroborando com a análise morfológica, onde foi possível visualizar a grande maioria dos fragmentos de enxerto autógeno sendo englobados pelo novo tecido ósseo formado, de arranjo mais organizado e maduro. Enquanto que, nos enxertos de HA e HA/TCP, a quantidade de partículas de biomaterial praticamente se manteve constante, com sinais mais raros de reabsorção. Na análise radiográfica, notou-se que a radiodensidade diminuiu aos 30 dias, no grupo TCP, coincidindo com a reabsorção acentuada de suas partículas observadas nos cortes histológicos. Por outro lado, as imagens radiográficas dos grupos HA e HA/TCP pouco se alteraram ao longo do tempo, com fácil visualização de suas partículas no interior dos defeitos, indicando que houve pouca reabsorção delas. Já em relação ao grupo Autógeno, foi observada uma leve diminuição da radiodensidade durante os 30 dias iniciais, indicando que houve o processo de reabsorção, porém este ocorreu de forma menos relevante em relação ao grupo TCP.

Confirmando os nossos resultados, Kamitakahara *et al.* (2008) comparou o comportamento de biomateriais constituídos a base de fosfato de cálcio e verificou que, a hidroxiapatita permaneceu por um período mais longo pós-implantação, ao contrário do fosfato tricálcio, que foi reabsorvido mais rapidamente. Essas diferenças no tempo de reabsorção também foram observadas por Detsch, *et al.* (2007), que utilizou monócitos de leucoma humano (U-937) para induzir a formação de células gigantes iniciais e perceberam que, quando estas são colocadas em contato com as cerâmicas, as células gigantes de mesma origem absorvem em intensidades diferentes o HA, o TCP e a mistura de ambos. Assim, para os autores,

é necessário avaliar primeiramente por quanto tempo o material deverá permanecer no local, antes da escolha da cerâmica a ser clinicamente implantada.

Com relação ao volume absoluto de tecido ósseo, este permaneceu constante ao longo dos períodos experimentais nos grupos Autógeno, HA e HA/TCP. Já no grupo TCP, aos 30 dias iniciais, o volume era de 4,16 mm³ e passou para 13,92 mm³ aos 90 dias (aumento médio de 70%), tornando-se constante ao final dos 180 dias. Na análise comparativa entre os diferentes grupos, foi verificado que, aos 30 dias, o grupo Autógeno apresentou a maior quantidade de tecido ósseo neoformado, com volumes 76,67%, 80,35% e 67,46% maiores, em relação aos grupos HA, TCP e HA/TCP, respectivamente. Nos períodos subseqüentes, o grupo autógeno exibiu um volume similar ao do grupo TCP, mas ainda, maior em relação aos grupos HA e HA/TCP (cerca de 63,97%).

Este achado corrobora com o trabalho de Oliveira *et al.*, que comparou-se o reparo de defeitos ósseos de tamanho crítico, tratados com enxerto autógeno e com osso bovino desmineralizado, verificando através da morfometria um aumento de tecido ósseo neoformado entre os períodos de 7-90 dias no grupo autógeno (densidade de volume de 53,5%), enquanto que no outro grupo, a quantidade de tecido formado foi muito inferior (densidade de volume de 12%).

Outro trabalho com resultados similares é o de Stein *et al.* (2009), cujo objetivo foi comparar a porcentagem de neoformação óssea do enxerto autógeno e HA sintético, HA/TCP sintético e matriz orgânica e inorgânica de osso bovino em defeitos ósseos realizados em fêmures de ratos. Os resultados mostraram que o osso autógeno exibiu neoformação óssea superior aos demais grupos nos períodos de 6 semanas ($90,6 \pm 10,8\%$) e 12 semanas ($98 \pm 9,2\%$), enquanto os dados para os demais grupos foram: HA/TCP - 6 semanas ($46 \pm 7,1\%$) e 12 semanas ($47,8 \pm 11,1\%$); HA - 6 semanas ($43,1 \pm 8,4\%$) e 12 semanas ($39,9 \pm 5,4\%$); matriz orgânica e inorgânica de osso bovino - 6 semanas ($57,3 \pm 4,5\%$) e 12 semanas ($59,7 \pm 4,8\%$).

Em um trabalho paralelo, desenvolvido em nosso laboratório (MARTINS, *et al.*, 2009) adotando o mesmo modelo experimental e comparando o potencial de reparo ósseo entre diferentes biomateriais (osso medular inorgânico bovino; matriz orgânica e inorgânica de osso bovino; hidroxiapatita sintética) e o enxerto autógeno, resultados semelhantes aos já relatados foram obtidos, tendo o biomaterial HA

mostrado uma reabsorção mais lenta em relação aos demais, e o enxerto autógeno exibido o melhor desempenho, produzindo um volume máximo de tecido ósseo neoformado logo no início dos períodos experimentais e mantendo este volume ao longo do tempo.

Em nosso estudo, as fotomicrografias dos períodos finais demonstraram, visivelmente, uma neoformação óssea mais acentuada nos defeitos ósseos dos grupos autógeno e TCP, enquanto que, os defeitos ósseos dos grupos HA e HA/TCP encontravam-se preenchidos, predominantemente, por partículas de biomaterial e tecido conjuntivo. Entretanto, nas imagens radiográficas do grupo TCP, foi possível visualizar apenas alguns focos de áreas radiodensas, não coincidindo com os resultados de análise histomorfométrica que demonstrou ter ocorrido um aumento significativo de neoformação óssea. Já na análise radiográfica do grupo Autógeno, observou-se um aumento na formação de material mineralizado entre as suas partículas, culminando em extensas áreas radiodensas e homogêneas dentro dos defeitos, o que confirma a grande quantidade de fragmentos de enxerto envoltos por tecido ósseo neoformado, visualizados nos cortes histológicos no último período experimental.

O volume de tecido ósseo neoformado no grupo Autógeno foi grande desde o período inicial, preenchendo os espaços entre as partículas de enxerto com um tecido ósseo primário de arranjo trabeculado. A imaturidade deste tecido foi confirmada pelos números absolutos elevados de osteoblastos ($118,57 \times 10^2$) e osteócitos ($178,57 \times 10^2$) obtidos morfometricamente e no período de 30 dias. Já entre 30 e 90 dias, como o volume de tecido ósseo praticamente não se alterou, houve uma redução acentuada de osteoblastos ($70,95 \times 10^2$) e osteócitos ($127,33 \times 10^2$) e o tecido ósseo passou a demonstrar características de tecido maduro (lamelar), indicando a ocorrência de processo de remodelação óssea.

No grupo TCP, a neoformação óssea acentuada aos 90 dias, culminou com o aumento drástico no número absoluto de osteoblastos ($67,46 \times 10^2$) e de osteócitos ($166,13 \times 10^2$), os quais se mantiveram constantes no período subsequente, porém maiores em relação aos demais grupos.

Nos grupos HA e HA/TCP, como a formação óssea foi pequena, não ultrapassando $10,11\text{mm}^3$, as médias de osteoblastos e osteócitos foram,

respectivamente de $39,13 \times 10^2$ e $132,20 \times 10^2$. Nas fotomicrografias, foi possível verificar em ambos que, a maioria das partículas encontrava-se envolta por tecido conjuntivo (média de $19,10\text{mm}^3$). Por outro lado, nos grupos autógeno e TCP, a quantidade de tecido conjuntivo foi visivelmente menor, apresentando aos 90 dias, um volume médio de $11,86\text{mm}^3$.

Com base nos resultados aqui obtidos, verificou-se a existência de dois padrões bem definidos no potencial osteocondutor das biocerâmicas, aliados às suas estruturas físico-químicas. O primeiro, representado pelo TCP, com estrutura bastante irregular, muitos microporos e fácil fragmentação, apresentando desta forma, uma reabsorção mais rápida e propiciando uma maior neoformação óssea. O segundo, representado pela HA/TCP e HA, cuja ausência de porosidade ou composição estequiométrica inadequada, levou a uma baixa reabsorção de suas partículas e subsequente deficiência na formação de tecido ósseo.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Baseados nos resultados aqui obtidos concluímos que:

a) As cerâmicas apresentam como constituintes os elementos químicos O, P e Ca, sendo que a relação Ca/P segue a ordem HA/TCP > HA > TCP e sua microestrutura varia entre si, interferindo na resposta biológica.

b) O enxerto autógeno, oriundo dos ossos cranianos, sofre lenta reabsorção por osteoclastos e promove rápida formação/remodelação óssea entre as partículas. A quantidade de tecido ósseo (enxerto + osso neoformado) é superior em relação à das cerâmicas.

c) O TCP promove formação óssea similar ao do enxerto autógeno, porém, é rapidamente reabsorvido, levando a uma redução do volume total da região do enxerto.

d) As cerâmicas HA e HA/TCP praticamente não sofrem reabsorção, sendo a formação óssea ao redor das partículas inferior a do TCP. Contudo, elas favorecem a manutenção do volume total da região do enxerto.

Com base nos resultados obtidos, pode-se inferir que o enxerto autógeno apresenta o melhor desempenho no reparo de defeitos ósseos perenes em calvária de ratos, promovendo a formação de quantidade significativa de tecido ósseo logo nos períodos iniciais de cicatrização. Já as cerâmicas, devido suas características físico-químicas, mostram-se menos favoráveis a formação ou a manutenção do volume ósseo, contudo, dentre estas, a que apresentou melhor resultado foi o TCP.

Referências

REFERÊNCIAS

AHERNE, T. Thoracoscopy in management of pleural effusions. **Irish Medical Journal.**, v.75, n.11, p. 406-407. 1982.

ALBBE, F. H. Studies in bone growth triple calcium phosphate as stimulus to osteogenesis. **Annals of Surgery.** v. 71, p. 32-36, 1920.

ALBREKTON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **Eur Spine J.**, suppl. 10, p.96-101. 2001.

ALVES, D.; CASTRO, L.; LOBATO, J. M.; *et al.* A dualidade osteoblasto/osteoclasto: a intervenção imunológica na sua regulação. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde. Porto.** v. 3, p. 6-15, 2006.

AOKI, H. Medical application of hidroxiapatite. **Ishiyaku. Euro America Inc.**, Tokio, St. Louis: Takayama Press, 1994.

AOKI, H. Transactions. Information, Incentives, and Bargaining in the Japanese. **Economy, Cambridge, England: Cambridge University Press**, v.17, p.107, 1988

BAEHR, G. J. *et al.* Ceramics: Windows to the future. **Materials Science and Technology.**, 1995.

BARBARA, A.; GROISMAN, M.; HAHARI, D.N. Elevação localizada de seio maxilar. **Rev Bras Implant**, v.3, n.5, p.21-5, 1997.

BATISTA, M.G. Levantamento de seio maxilar com hidtoxiapatita HAP-91®: Relato de três casos realizados e análise de avaliação. In: BICALHO, S.M.C.M; *et al.* HAP-91® e Col.HAP-91®. **Casuísticas e Estudos Científicos.** Belo Horizonte. JHS Laboratório. 1ª ed., p.171-180, 2004.

BAUER, T. M.; MUSCHLER, G. F. Bone graft materials. An overview of the basic science. **Clin Orthop Res.**, v.37, p.10 -27. 2000.

BOCCACCINI, A. R.; BLAKER, J. J. Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds. **Expert Rev Med Devices.**, v.2, n.3, p.303-17. 2005.

BOHNER, M.; *et al.* Synthesis, X-ray diffraction and solid-state ^{31}P magic angle spinning NMR study of α -tricalcium orthophosphate. **J. Mater. Sci.: Mater. Med.**, v.7, n.7, p.457, 1996.

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

BORGES, A.P.B. O efeito da hidroxiapatita sintética na regeneração óssea de defeito provocado experimentalmente no terço proximal da tíbia de cães: estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico por microscopia de luz e microscopia eletrônica de retrodisperção. 1998. 112f. Tese (Doutorado)-Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1998.

BOSCH C.; MELSEN B.; VARGERVIK K. Guided bone regeneration in calvarial bone defects using polytetrafluoroethylene membranes. **Cleft Palate Craniofac. J.**, v. 32, n.4, p.311-317. 1995.

BOSCH, C; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. **J Craniofac Surg.**; v.9, n.4, p.310-316.1998.

BOSKEY, A. L.; POSNER, A. S. Structure and formation of bone mineral. In **Natural and Living Biomaterials**, ed. G. W. Hastings e P. Ducheyne. CRC Press, Boca Raton, FL , p. 277-41, 1984.

BRANDÃO, A.C.; *et al.* Histomorfometric analisys of rat alveolar wound healing with hydroxyapatite alone or associated to BMPs. **Brasilian Dental Journal.**, v.13, n.3, p.147-154, 2002.

BRAZ, F.; *et al.* Emprego de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita no reparo de defeito induzido em crânio de ratos. **Acta Cir. Bras.**, v.18, p.19-24, 2003.

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

CARDOSO, A. L.; MAGALHÃES, J. C. A.; ZAFFALON, G. T. Histologia e fisiologia do enxerto ósseo autógeno: revisão de literatura. **Innovations Implant Journal-Biomaterials and Esthetics.** v.1, n.1, Maio/2006.

CARRODÉGUAS, R. G. *et al.* Hydrothermal Method for Preparing Calcium Phosphate Monoliths. **Materials Research**, v. 6, n. 3, 2003.

CHEUNG, C. The future of bone healing. **Clin Podiatr Med Surg.**, v.22, n.4, p.631-41. 2005.

CILLINAME D. M. The role of osteocytes in bone regulation: mineral homeostasis versus mechanoreception. **J Musculoskelet Neuronal Interact.**, v.2, p.242-244, 2002.

CIANI, R.B; *et al.* Mistura de proteínas morfogenéticas ósseas, hidroxiapatita, osso inorgânico e colágeno envolta por membrana de pericárdio no preenchimento de defeito ósseo segmentar em coelhos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, n.1, p.59-67, 2006.

CLAYMAN, L.P. Implant reconstruction of the bone-grafted maxila: review of the literature presentation of 8 cases. **Journal Oral Maxillofacial Surg.**, n.64, p.674-682, 2006.

CONSTANTINO, P.D.; *et al.* Hydroxyxyapatite cement: I. Basic chemistry and histologic properties. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v.117, p. 379-384, 1991.

COOK, S.D.; RUEGER, D.C. Osteogenic protein-1. **Clin. Orthop.**, n.324, p.29-38, 1996.

CORNELL, C. N. Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts. **Orthop Clin North Am.**, v.30, n.4, p.591-8. 1999.

CORNELL, C. N.; LANE, J. M. Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. **Clin Orthop Relat Res.**, n.(355 Suppl), p.S267-73. 1998.

CORREIA, L.F.; ALVES, G. Auto e xenoenxertos na prática da clínica implantológica. **Portugal Implantológica.**, n.1, 2002.

COSTA FILHO, L.C.; TAGA, R.; TAGA, E.M. Rabbit bone marrow response to bovine osteoinductive proteins and anorganic bovine bone. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v.16, p.799-808, 2001.

CULPAN, P.; *et al.* Arthrodesis after failed total ankle replacement. **J Bone Joint Surg Br.**, v. 89, p. 1178-1183, 2007.

CUNHA, S. M. *et al.* Influência da relação Ca/P na formação de fosfatos de cálcio sintetizados por precipitação homogênea. 17º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, Foz do Iguaçu, PR, Brasil, p.75-86, 2006.

CUNHA, S. M. *et al.* Sinterabilidade e dureza de cerâmicas à base de fosfatos de cálcio sintetizadas por precipitação homogênea. Anais do 50º Congresso Brasileiro de Cerâmica, Blumenau, SC, 12p, 2006.

DACULSI, G.; *et al.* Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. **J Mater Sci Mater Med.**, v.14, n.3, p.195-200, 2003.

DACULSI, G.; *et al.* Role of fibronectin during biological apatite crystal nucleation: Ultrastructural characterization. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.23, p.883, 1989.

DACULSI, G.; *et al.* Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics. **Calcif. Tissue Int.**, v.46, p.20, 1990.

DACULSI, J. M.; BOULER, E. R. Z.; LEGEROS, F.. Composition pour biomatériaux. **Int. Rev. Cyt.**, v.172, p. 129, 1996.

DAHLIN, C.; ALBERIUS P; LINDE, A. Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. **J. Neurosurg**, v.74, n. 3, p.487-491. 1991.

DAMIEN, C. J.; PARSONS, J. R. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. **J Appl Biomater**, v.2, n.3, p.187- 208. 1991.

DE GROOT, K. Ceramic of Calcium Phosphates: Preparation and Properties. In: **Bioceramics of Calcium Phosphate**, Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 100-114, 1983.

DE JONG, W. F. La substance minerale dans les os. **Rec. Trav. Chim.**, v.45, p.445, 1926.

DENISSEN, H.; *et al.* Alveolar bone responde to submerged biphosphonate-complexed hydroxyapatite implants. **J. Periodontol.**, v.71, p.279-286, 2000.

DE OLIVEIRA, R. C.; *et al.* Morphometric evaluation of the repair of critical-size defects using demineralized bovine bone and autogenous bone grafts in rat calvaria. **Clin Oral Implants Res.**, v.19, n.8, p.749-754.2008.

DETSCH, R. Formation of osteoclast-like cells on HA and TCP ceramics. **Acta Biomaterialia.**, v.4, p.139-141, 2008.

DONOS, N.; *et al.* Bone formation by enamel matrix proteins and xenografts: an experimental study in the ratramus. **Clin Oral Implants Res.**; v.16, p.140-146. 2005.

DREESMAN, H. Resorption characteristics of calciumsulphate implants. **Beitr. Klin. Chir.**, v.9, p. 804, 1894.

DUBININ, M. M. Adsoption in micropores. **J. Colloid Interfac. Sci.**, v. 23, n. 4, p. 487-499, 1967.

EANES, E. D. **Program Crystal Growth Characteristics**, v. 3, p. 3-15, 1980.

EGGLI, P. S.; MÜLLER, W. Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits: a comparative histomorphometric and histologic study of bony ingrowth and implant substitution. **Clin. Orthop. Rel. Res.**, v.232, p.127, 1988.

ELLIOTT, J.C. Structure and Chemistry of apatite and other calcium orthophosphates. **Elsevier, Amsterdam**, p.111, 1994.

FALLOPIUS, G. Opera omnia Francofurti. **Weccheli A.**, v.1, 1600.

FARINA, N. M. *et al.* In Vivo Behaviour Of Two Different Biphasic Ceramic Implanted In Mandibular Bone Of Dogs. **Journal of Materials Science**, v. 19, n. 4, 2008.

FERGUSON, D.; *et al.* Bovine bone morphogenetic protein (bBMP) fraction – induced repair of craniotomy defects in the rhesus monkey (*Macaca speciosa*). **Clin. Orthop.**, v. 219, p.251-258. 1987.

FRAME, J. W. A convenient animal model for testing bone substitute materials. **J. Oral Surgery**, v. 38, p.176-180. 1980.

FRAYSSINET, P.; TROUILLET, J. L. Osseointegration of macroporous calcium phosphate ceramics having a different chemical composition. **Biomaterials**, v.14, p.423, 1993.

FRANCO, K.L.; *et al.* Hidroxiapatita sintética pura, hidroxiapatita associada ao colágeno e hidroxiapatita sintética associada ao lipossoma como substitutos ósseos em defeitos provocados na tíbia de cães: aspectos da osteointegração à microscopia de luz transmitida. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.53, p.431-436, 2001.

FULMER, M. T. *et al.* Formation of Calcium deficient Hydroxyapatite at near-physiological temperature. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 3, p. 299-305, 1992.

GAO, T. J.; *et al.* Morphological and biomechanical difference in healing in segmental tibial defects implanted with Biocoral[®] or tricalcium phosphate cylinders. **Biomaterials**, v.18, n.3, p.219-223, 1997.

GATTI A.M., ZAFFE D., POLI G.P. Behavior of tricalcium phosphate and hydroxyapatite granules in sheep bone defects. **Biomaterials**, v.11, p.513-517, 1990.

GAUTHIER, O.; *et al.* Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. **Biomaterials**, v.19, p.133-139, 1998.

GRANJEIRO, J. M. Papel dos Biomateriais e da Bioengenharia na Medicina Regenerativa. **Innovations implant journal - biomaterials and esthetics.**, v.1, n.2, dec. 2006.

GROSS, U. M., *et al.* The interface of calcium-phosphate and glass-ceramic in bone, a structural analysis. **Biomaterials.**, v.11, p.83-5. 1990.

GUTIERRES, M.; *et al.* Substitutos Ósseos, Conceitos Gerais e Estado Actual. **ArquiMed.**, v.19, n.4, p. 153-162, 2006.

HAIDUKEWYCH, G.J.; *et al.* Total knee arthroplasty for salvage of failed internal fixation or nonunion of the distal femur. **J Arthroplasty.**, v.20, n.3, p.344-349, 2005.

HAYEK, E.; NEWESLEY, H. Inorganic Syntheses, New York: Mc Graw Hill, v.7, p.63-65, 1963.

HELMUS, M. N.; TWEDEN, K. Materials selection. In: *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering, Part A: Materials* (eds) Wise, D. L., Trantolo, D.J., Altobelli, D.E., Yaszemski, M.J., Gresser, J.D., Schwartz, E.R. NewYork: Marcel Dekker; p 27- 45. 1995.

HENCH, L. L.; ETHRIDGE, E. C. Biomaterials: An Interfacial Approach. **New York: Academic Press**, 385 p., 1982.

HENCH, L. L. Bioceramics: From Concept to Clinic. **J. Am. Ceram. Soc.**, v.74, p.1487, 1991

HENCH, L. L.; Wilson, J. An introduction to bioceramics. **World Scientific, Singapore.**, p. 139, 1993.

HENCH, L. L. Bioceramics. **J. Am. Ceram. Soc.**, v.81, p.1705, 1998.

HEUGHEBAERT, M.; *et al.* Hysicochemical characterization of deposits associated with HA ceramics implanted in nonosseous sites. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.22, p.257, 1988.

HING, K. A. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? **Hilos Transact A Math Phys Eng Sci.**, v.15, n.362(1825), p.2821- 50. 2004.

HOLLINGER, J. O.; *et al.* Role of bone substitutes. **Clin. Orthop.**, n.324, p.55-65, 1997.

HOLLINGER, J. O.; KLEINSCHMIDT; J. C. The critical size defects as an experimental model to test bone repair materials. **J Craniofac Surg**, v.1, n.1, p.60-8.1990.

HONDA, T.; *et al.* Post-composition control of hydroxyapatite in an aqueous medium. **J. Mater. Sci.: Mater. Med.**, v.1, p.114-117, 1990.

HULBERT, S. F.; COOKE, F. W. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. **Biomed. Mater. Symp.**, v.4, p.1, 1970.

INTINI, G.; *et al.* A comparative analysis of bone formation induced by human demineralized freeze-dried bone and enamel matrix derivative in rat calvaria critical-size bone defects. **J. Periodontol.**, v.79, n.7, p.1217-1224. 2008.

JARCHO, M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. **Clin. Orthop.**, v. 157, p. 259–278, 1981.

JOHNSON, M.S.; NANCOLLAS, G.H. The role of brushite and octacalcium phosphate in apatite formation. **Crit Rev Oral Biol Med.**, v.3, n.1, p. 61-82, 1992.

JOHNSON, K.; *et al.* Porous ceramics as bone graft substitutes in long bone defects: A biomechanical, histological and radiographic analysis. **J Orthop Res.**, v.14, p.351–569, 1996

KAMITAKAHARA, M.; OHTSUKI, C.; MIYAZAKI, T. Review paper: behavior of ceramic biomaterials derived from tricalcium phosphate in physiological condition. **J. Biomater. Appl.**, v .23, n.3, p.197-212, 2008.

KAWACHI, E. Y. Fosfatos de cálcio: porosidade, cristalinidade, potencial de interface e o comportamento in vivo.. 179f. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1997

KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; KUBOTA, L. T. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Biomaterials.**, v.19, p. 2329, 1998.

KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; DOS REIS, R. R.; *et al.* Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova.**, v.23, n.4, 2000.

KHAN, S. N.; TOMIN, E.; LANE, J. M. Clinical applications of bone graft substitutes. **Orthop. Clin. North Am.**, v.31, n.3, p.389-398, 2000.

KLEIN, M.; *et al.* Pore characteristics of bone substitute materials assessed by microcomputed Tomography. **Clin. Oral Impl. Res.**, v.20, n.1, p. 67–74, jan. 2009.

KOHRI, M., *et al.* In vivo stability of biphasic calcium phosphate ceramics. **Biomaterials.**, v.14, p.299-304,1993.

KOKUBUN, S.; KASHIMOTO, O.; TANAKA, Y. Histological Verification of Bone Bonding and Ingrowth into Porous Hydroxyapatite Spinous Process Spacer for Cervical Laminoplasty. **Tohoku J. Exp. Med.**, v.173, n.3, p.337-344, 1994.

KRIEGER, S. Biocerâmica. Universidade de São Paulo, 2003.

KUBLER, N. R. Osteoinduction and reparation. **Mund Kiefer Gesichtschir.**, v.1, n.1, p.2-25, 1997.

KURASHINA, K., *et al.* In vivo study of a calcium phosphate cement consisting of alpha-tricalcium phosphate/dicalcium phosphate dibasic/tetracalcium phosphate monoxide. **Biomaterials.**, v.18, n.2, p.147-51, 1997.

KURASHINA, K. **Biomaterials**, v. 23, p. 407, 2000.

KWON, H. *et al.* Calcium phosphate bioceramics with various porosities and dissolution rates. **J. Am. Ceram. Soc.**, v. 85, n.12, p. 3129-3131, 2002.

LANGE, T.; *et al.* Proinflammatory and osteoclastogenic effects of beta-tricalciumphosphate and hydroxyapatite particles on human mononuclear cells in vitro. **Biomaterials.**, v.30, n.29, p.5312-5318, 2009.

LASCART, T.; *et al.* Utilisation du phosphate tricalcique dans les osteotomies tibiales de valgisation par addition interne. **Ann Orthopediques de L' Ouest.**, v.30, p.137-41,1998.

LAURENCIN, C.T.; CHAPTER, I. Bone graft and bone graft substitutes a brief history. In: LAURENCIN, C.T.; editors. Bone graft substitute **ASTM International.**, 2004.

LAVERNIA, C.; SHOENUNG, J. M. Calcium phosphate ceramics as bone substitutes. **Bull Am. Ceram. Soc. Ceram. Bull.**, v.70, p.95-100, 1991.

LEGEROS, R. Z. Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review. **Advances in Dental Research**, v. 2, p. 164-180, 1988.

LEGEROS, R. Z. Calcium phosphates in oral biology and medicine. **Monogr. Oral Sci.**, v.15, p.1-201, 1991.

LEGEROS, R. Z. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. **Clin. Mater.**, v.14, p. 65-88, 1993.

LEGEROS, R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clin. Orthop. Rel. Res.**, v.395, p.81-98, 2002.

LENCH, L. L. Characterization of molecular defects in X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). **J. Am. Ceram. Soc.**, v. 74, p. 1487,1994.

LEVITT, G. E.. Forming methods for apatite prothesis. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 3, n. 4, p. 683-685, 1969.

LINDE, A.; *et al.* Creation of new bone by an osteopromotive membrane technique. An experimental study in rats. **J. Oral Maxillofac Surg.**, v.51, n. 8; p.892-897, 1993.

LIU, D. M. Fabrication of hydroxyapatite ceramic with controlled porosity. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 8, p. 227-232, 1997.

LIU, H.; *et al.* An in vitro evaluation of the Ca/P ratio for the cytocompatibility of nano-to-micron particulate calcium phosphates for bone regeneration. **Acta biomater.**, v.5, n.4, p.1472-1479, 2008.

LU, J.; *et al.* The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone. **J Biomed Mater Res.**, v.63, p.408–412, 2002.

LU, J.; *et al.* Micro-particles of bioceramics could cause cell and tissue damage. **Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.**, v.23, n.1, p.85-89, 2006.

LUDWIG, S. C., *et al.* Osteoinductive bone graft substitutes. **Eur Spine**, v.9 Suppl 1, p.S119-25, 2000.

MAINARD, LES. Substituts osseux em 2001: Monographie Editée par GESTO (Association pour L'étude des Greffes et substitutes Tissulaires en Orthopédie) sous la direction de Dr. Mainard , Edition Romillat , Paris, 2001.

MALMSTRÖM, J.; *et al.* Bone response inside free-form fabricated macroporous hydroxyapatite scaffolds with and without an open microporosity. **Clin. Implant. Dent. Relat. Res.**, v.9, n.2, p.79-88, 2007.

MANSO, M. *et al.* Surface and interface analysis of hydroxyapatite/TiO₂ iocompatible structures. **Materials Science and Engineering**, v. 23, p. 451-454, 2003.

MARDAS, N.; KOSTOPOULOS, L.; KARRING, T. Bone and suture regeneration by e-PTFE membranes and demineralized bone matrix and the impact on calvarial growth. **Journal of Craniofacial Surgery**., v.13, p.453-462, 2002.

MARTINS, A. C. M.; *et al.* Estudo comparativo entre diferentes biomateriais e o enxerto autógeno no reparo de defeitos ósseos em ratos. **Brasilian Oral Research (Proceeding of the 26th SBPqO Annual Meeting)**., v.23, suppl. 1, p.225. 2009.

MARX, R. E.; SAUNDERS, T. R. Reconstruction and rehabilitation of cancer patients. In FONSECA, R. J. e W. H. Reconstructive Preprosthetic Oral and Maxillofacial Surgery. Philadelphia: Saunders; p.347-428, 1986.

MAVROPOULOS, E. A hidroxiapatita como removedora de chumbo. Dissertação (Mestrado). Fundação Oswaldo Cruz. Escola Nacional de Saúde Pública e Toxicologia. Rio de Janeiro, 1999.

MEYNET, J. Osteotomie tibiale de valgisation par ouverture interne: place des substituts osseux. **Ann Orthopediques de L'Ouest**.,v.30, p.171-173, 1998.

MESSORA, M. R.; *et al.* Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvaria. **J. Periodontal Res.**, v.43, n.6, p.723-729, 2008.

MISCH, C. E.; DIETSH, F. Bone-grafting materials in implant dentistry. **Implant Dent.**, v.2, n.3, p.158-67, 1993.

MONROE, E. A.; *et al.* New calcium phosphate ceramic material for bone and tooth implants. **Journal of Dental Research**, v. 50, n. 4, p. 860-862, 1971.

MORAES, P.C. Biocompatibilidade e comportamento do cimento de fosfato de cálcio, reforçado com diferentes tipos de fibras, implantado no rádio de coelhos. 2002. 73f. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2002.

MOY, P.K.; *et al.* Maxillary sinus augmentation: histomorphometric analysis of graft materials for maxillary sinus floor augmentation. **J Oral Maxillofac Surg.**, v.51, n.8, p.857-862, 1993.

MUNAR, M. L., *et al.* Effects of sintering temperature over 1,300 degrees C on the physical and compositional properties of porous hydroxyapatite foam. **Dent Mater J.**, v.25, n.1, 2006.

MUNTING, E.; MIRTCHI, A.; LEMAITRE, J. Bone repair of defects filled with a phosphocalcic hydraulic cement: an in vivo study. **Journal of Materials in Medicine**, v.4, p.337-344, 1993.

NERY, E.B.; *et al.* Bioceramics implants in surgically produced infrabony defects. **Journal of Periodontology**, v. 46, n. 6, p. 328-339, 1975.

NERY, E. B., *et al.* Tissue response to biphasic calcium phosphate ceramic with different ratios of HA/beta TCP in periodontal osseous defects. **J Periodontol.**, v.63, n.9, p.729 -35, 1992.

NORDSTRÖM, E. G.; KARLSSON, K. H. Carbonatedoped hidroxyapatite. **J. Mater. Sci.: Mater. Med.**, v.1, p.182, 1990.

OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R. Efeito da atividade física no osso normal e na prevenção e tratamento da osteoporose. **Rev Bras Med Esporte.**, v.12, n. 3, Mai/Jun 2006.

OLSZTA, M. J.; *et al.* Bone structure and formation: A new perspective. **Gower Materials Science and Engineering**, R 58 p.77–116, 2007.

ONO, I.; TATESHITA, T.; NAKAJIMA, T. Evaluation of a high density polyethyelene fixing system for hydroxyapatite ceramic implants. **Biomaterials**, v.21, p.143-151, 2000.

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

PATEL, Z. S.; *et al.* Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. **Bone.**, v.43, n.5, p.931-940, 2008.

PETERSON, B.; *et al.* Osteoinductivity of commercially available demineralized bone matrix. **J Bone Joint Surg. Am.**, v.86, p.2243-2250, 2004.

PINTO, L.P.; CUNHA FILHO, J.J.; BELTRÃO, G.C. Sítios intrabucais doadores de enxertos ósseos. **Rev Bras Implant Proteseimplant.**, v.11, n.43, p. 243-248, 2004.

PORTER, J.R.; RUCKH, T.T.; POPAT, K.C. Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies. **Biotechnol Prog.**, v.12, 2009.

PRUSS, A.; *et al.* Validation of the 'Marburg bone bank system' for thermoinfection of allogenic femoral head transplants using selected bacteria, fungi, and spores. **Biologicals.**, v.31, n.4, p.287-294, 2003.

PRYOR, M.E.; SUSIN, C.; WIKESJÖ, U.M. Validity of radiographic evaluations of bone formation in a rat calvaria osteotomy defect model. **J. Clin. Periodontol**, v.33, n.6, p.455-460, 2006.

RAYNAUD, S. *et al.* Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio III. Mechanical properties and degradation in solution hot pressed ceramics. **Biomaterials**, v. 23, p. 1081-1089, 2002.

REDDI, A. H. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. **J Bone Joint Surg Am.**, v.83-A Suppl 1, n.Pt 1, p.S1-6, 2001.

REDDI, A. H; MARSHALL, R.; URIST. A renaissance scientist and orthopedic surgeon. **J Bone Joint Surgery Am.**, v.85, p.3-7, 2003.

REMEDIOS, A. Bone and bone healing. **Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.**, v.29, p.1029-1044, 1999.

RIBEIRO Jr, G. Cirurgia de enxerto inlay em rebordo alveolar atrófico na maxila, usando hidroxiapatita absorvível HAP-91®, como preparação para colocação de implantes. In: BICALHO, S.M.C.M; *et al.* HAP-91® e Col.HAP-91®. **Casuísticas e Estudos Científicos**. Belo Horizonte. JHS Laboratório. 1ªed., p.171-180, 2004.

RIGO, E. C. S. *et al.* Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação. **Dental Press Periodontia Implantol.**, v. 1, n. 3, p. 39-50, 2007.

ROBEY, P.G. The biochemistry of bone. **Biol. Metab. Clin. North Am.** v.18, p.859-902, 1989.

ROSA, A.L, *et al.* Efeito das condições de preparação e sinterização sobre a porosidade da hidroxiapatita. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 14, n. 3, p. 273-277. 2000.

RUMPLER, M.; *et al.* The effect of geometry on three-dimensional tissue growth. **J. R. Soc. Interface.**, v.5, n.27, p.1173-1180, 2008.

SAKANO, H.; *et al.* Treatment of the instable distal radius fracture with external fixation and a hydroxyapatite spacer. **J. Hand Surg.**, v.26, p.923-929, 2001.

SANADA, J. T., *et al.* Análise histológica, radiográfica e do perfil de imunoglobulinas após implantação de enxerto de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco em músculo de ratos. **J Appl Oral Sci.**, v.11, n.3, p.209-215, 2003.

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

SANTOS, L. A. Desenvolvimento de cimento de fosfato de cálcio reforçado por fibras para uso na área médico-odontológica. 2002. Tese (doutorado)- Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2002.

SCHENK, K., BÜHRER, P.; FILHO J.S. In: Regeneração Óssea Guiada em Implantodontia 1. ed., p. 49-100, 1996.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clin. Orthop. Related Research.**, v. 205, p.299-308, 1986.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O.; MILAM, S. B. Reconstruction of bone using calcium phosphate bone cements: a critical review. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.57, p.1122-1126, 1999.

SIMION, M.; FONTANA, F. Autogenous and xenogeneic bone grafts for the bone regeneration. A literature review. **Minerva Stomatol.**, v.53, n.5, p.191-206, 2004.

SOGAL, A.; TOFE, A. J. Risk assessment of bovine spongiform encephalopathy transmission through bone graft material derived from bovine bone used for dental applications. **J Periodontol.**, v.70, n.9, p.1053-1063, 1999.

STEIN, R. S.; SILVA, J.B; DA SILVA, V.D. Comparative study of bone neoformation using autologous grafting and three replacements: bone defects in rats. **Rev Bras Ortop.**, v.44, n.4, p.330-335, 2009.

TADIC, D.; EPPLE, M. A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone . **Biomaterials.**, v.25, p.987-994, 2004.

TAGA, R.; *et al.* Autogenous and allogeneous bone graft placed in the guinea pig critical size calvaria defect. **Rev Bras Cir Implant.**, v.7, n.26, p.37-44, 2000.

TATE, M.K.; *et al.* The osteocytes. **Int. J Biochem. Cell Biol.**, v.36, p.1-8, 2004.

TOMFORD, W.W. Bone allografts: Past, Present and future. **Cell Tissue Bank.**, v.1, p.105-109, 2000.

URIST, M. R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, v.150, n.698, p.893-899, 1965.

VACCARO, A.R. The Role of the Osteoconductive Scaffold in Synthetic Bone. **Graft. Orthopedics.**, v.25, (suppl 5), p.71- 78, 2002.

VACCARO, A.R.; *et al.* Bone grafting alternatives in spinal surgery. **Spine J.**, v.2, n.3, p.206-215, 2002.

VALLET-REGI, M. Introduction to the world of biomaterials. **Anales de Química.**, v.93, p.6, 1997.

WALSH, W. R.; *et al.* Beta-TCP bone graft substitutes in a bilateral rabbit tibial defect model. **Biomaterials.**, v.29, n.3, p.266-271, 2008.

VASCONCELOS, L. W. *et al.* Enxerto ósseo autógeno em seio maxilar com implantes imediatos. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent**, v. 52, n. 1, p. 35-41, 1998.

VON ARX, T.; *et al.* Lateral ridge augmentation and implant placement: an experimental study evaluating implant osseointegration in different augmentation materials in the canine mandible. **Int J Oral Maxillofac Implants.**, v.16, n.3, p.343-354, 2001.

XIE, Y. *et al.* **Biomaterials**, v. 27, p. 2761, 2006.

WANG, H. *et al.* Ca/P ratio effects on the degradation of hydroxyapatite in vitro. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 67 A, p.599-608, 2003.

WEIBEL, E. R. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. **Int Rev Cytol.**, v.26, p.235-302, 1969.

WILLIAMS, *et al.* Conferência de consensos sobre definições em Biomateriais. Chester, 1991.

WILLIAMS, D. F. In Definitions in biomaterials. Amsterdam: Elsevier, 1987 p. 66-71.

WOJCIECH SUCHANEK, M.Y. Processing and properties of hidroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. **Materials Research Society.**, v.13, n.1, p.94-117, 1998.

YAMADA, S, *et al.* Osteoclastic resorption of biphasic calcium phosphate ceramic in vitro. **Journal of biomedical materials research.**, v.37, cap.3, p. 346-352, 1997.

ZAMBUZZI, W. F.; *et al.* Avaliação histológica do implante do osso fetal bovino acelular e desmineralizado em subcutâneo de ratos. **Rev Bras Ortop.**, v.41, n.6, p. 227-232, 2006.

ZENÓBIO, E.G.; *et al.* Avaliação do comportamento biológico de dois materiais sintéticos, a base de fosfato de cálcio (Biopatita® e Osteogen®) após implantação em alvéolos de ratos. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.27, p.73-85, 1998.

Apêndices

APÊNDICES

Encontram-se em apêndices os valores morfométricos individuais de Densidade de volume (%), Volume total da região do enxerto (mm^3) e Volume absoluto (mm^3) de tecido ósseo, material enxertado e tecido conjuntivo, assim como de Número absoluto de osteoblastos e osteócitos ($\times 10^2$), para os diferentes grupos de tratamento, durante os períodos de 30, 90 e 180 dias.

APÊNDICE A - DENSIDADE DE VOLUME

Valores individuais das densidades de volume (%) de tecido ósseo, de material enxertado e de tecido conjuntivo no processo de reparo ósseo para grupo de tratamento com **enxerto autógeno** nos diferentes períodos pós-cirúrgicos

	30dias	90dias	180dias
TECIDO ÓSSEO			
A	39,85	45,72	47,61
B	40,41	45,06	50,52
C	48,04	40,99	29,78
D	38,00	36,62	29,07
E	31,45	44,25	50,34
Média±DPM	39,55±5,93	42,52±3,76	41,46±11,05
ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO			
A	29,16	37,74	34,23
B	31,18	33,96	32,23
C	33,19	24,12	48,57
D	43,3	37,98	42,29
E	31,81	25,17	35,86
Média±DPM	33,72±5,54	31,79±6,72	38,63±6,71
TECIDO CONJUNTIVO			
A	30,99	16,54	18,16
B	28,41	20,98	17,25
C	18,77	34,89	21,65
D	18,7	25,4	28,64
E	36,74	30,58	13,8
Média±DPM	26,72±7,89	25,67±7,32	19,9±5,62

Valores individuais das densidades de volume (%) de tecido ósseo, de biomaterial e de tecido conjuntivo no processo de reparo ósseo para grupo de tratamento com **HA** nos diferentes períodos pós-cirúrgicos

	30dias	90dias	180dias
TECIDO ÓSSEO			
A	11,75	9,93	4,28
B	6,59	9,92	12,75
C	8,41	13,43	16,56
D	12,08	10,46	7,11
E	2,81	12,29	36,43
Média±DPM	8,32±3,84	11,20±1,57	15,42±12,67
BIOMATERIAL (HA)			
A	59,55	52,67	52,31
B	46,98	53,72	49,34
C	45,66	52,26	55,47
D	43,67	46,40	52,34
E	93,53	60,51	49,10
Média±DPM	57,87±20,87	53,11±7,08	51,71±2,61
TECIDO CONJUNTIVO			
A	28,70	37,40	46,38
B	46,43	36,36	37,91
C	45,93	34,31	27,97
D	44,25	43,14	40,55
E	3,66	27,20	14,47
Média±DPM	33,81±18,37	35,69±5,76	32,87±12,52

Valores individuais das densidades de volume (%) de tecido ósseo, de biomaterial e de tecido conjuntivo no processo de reparo ósseo para grupo de tratamento com **TCP** nos diferentes períodos pós-cirúrgicos

	30dias	90dias	180dias
TECIDO ÓSSEO			
A	7,27	52,93	44,24
B	16,69	40,60	39,20
C	8,14	22,66	54,19
D	6,78	49,06	45,21
E	16,03	25,05	31,91
Média±DPM	10,98±4,93	38,06±13,73	42,95±8,20
BIOMATERIAL (TCP)			
A	27,63	26,68	25,93
B	27,42	32,78	11,04
C	37,21	11,90	18,80
D	34,22	26,33	29,20
E	33,26	25,07	15,19
Média±DPM	31,95±4,29	24,55±7,67	20,03±7,49
TECIDO CONJUNTIVO			
A	65,10	20,39	29,83
B	55,89	26,62	49,76
C	54,65	65,44	27,01
D	59,00	24,61	25,59
E	50,71	49,88	52,90
Média±DPM	57,07±5,38	37,39±19,43	37,02±13,20

Valores individuais das densidades de volume (%) de tecido ósseo, de biomaterial e de tecido conjuntivo no processo de reparo ósseo para grupo de tratamento com **HA/TCP** nos diferentes períodos pós-cirúrgicos

	30dias	90dias	180dias
TECIDO ÓSSEO			
A	12,85	15,23	14,88
B	7,76	11,86	5,02
C	4,65	16,39	17,89
D	17,24	21,96	16,55
E	22,55	-----	9,73
Média±DPM	13,01±7,18	16,36±4,19	12,81±5,34
BIOMATERIAL (HA/TCP)			
A	44,72	62,99	51,68
B	60,66	52,35	43,62
C	61,45	61,10	58,03
D	68,53	40,34	58,83
E	49,69	-----	51,47
Média±DPM	57,01±9,62	54,19±10,33	52,72±6,14
TECIDO CONJUNTIVO			
A	42,43	21,78	33,44
B	31,58	35,79	51,36
C	33,90	22,51	24,08
D	14,23	37,70	24,62
E	27,76	-----	38,80
Média±DPM	29,98±10,31	29,45±8,47	34,47±11,29

APÊNDICE B - VOLUME TOTAL DA REGIÃO DO ENXERTO

Valores individuais do volume total da região do enxerto (mm³) no processo de reparo ósseo para o grupo de tratamento com **enxerto autólogo** nos diferentes períodos pós-cirúrgicos

	30dias	90dias	180dias
A	48,79	59,28	51,41
B	47,21	48,79	51,93
C	50,88	49,83	55,61
D	66,62	52,46	54,56
E	56,13	41,44	69,25
Média±DPM	53,92±7,85	50,36±6,44	56,55±7,31

Valores individuais do volume total da região do enxerto (mm³) no processo de reparo ósseo para o grupo de tratamento com **HA** nos diferentes períodos pós-cirúrgicos

	30dias	90dias	180dias
A	49,78	53,92	55,54
B	59,63	58,90	54,44
C	55,44	57,11	56,48
D	70,06	53,13	72,99
E	63,35	76,97	64,19
Média±DPM	59,65±7,70	60,01±9,77	60,73±7,85

Valores individuais do volume total da região do enxerto (mm³) no processo de reparo ósseo para o grupo de tratamento com **TCP** nos diferentes períodos pós-cirúrgicos

	30dias	90dias	180dias
A	47,21	36,73	49,73
B	31,91	35,68	37,41
C	46,01	15,56	44,70
D	41,13	44,12	39,56
E	34,48	42,02	27,82
Média±DPM	40,15±6,80	34,82±11,33	39,84±8,24

Valores individuais do volume total da região do enxerto (mm³) no processo de reparo ósseo para o grupo de tratamento com **HA/TCP** nos diferentes períodos pós-cirúrgicos

	30dias	90dias	180dias
A	55,54	69,95	57,79
B	60,10	50,20	57,32
C	47,32	66,81	56,69
D	53,18	58,58	65,97
E	49,99	-----	53,24
Média±DPM	53,23±4,95	61,38±8,87	58,20±4,70

APÊNDICE C - VOLUMES ABSOLUTOS DE TECIDO ÓSSEO, BIOMATERIAL E TECIDO CONJUNTIVO

Valores individuais do volume absoluto (mm³) de tecido ósseo, de biomaterial e de tecido conjuntivo no processo de reparo ósseo para grupo de tratamento com **enxerto autógeno** nos diferentes períodos pós-cirúrgicos

	30dias	90dias	180dias
TECIDO ÓSSEO			
A	19,44	27,10	24,48
B	19,08	21,98	26,24
C	24,45	20,43	16,56
D	25,32	19,21	15,86
E	17,65	18,34	34,86
Média±DPM	21,18±3,45	21,41±3,46	23,6±7,81
ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO			
A	14,23	21,89	17,60
B	14,72	18,98	16,74
C	16,89	13,60	27,01
D	28,85	18,96	23,07
E	17,86	26,42	24,83
Média±DPM	18,51±5,97	19,97±4,68	21,85±4,50
TECIDO CONJUNTIVO			
A	13,53	9,64	8,71
B	12,93	9,98	8,47
C	8,40	16,97	11,85
D	10,31	12,94	14,91
E	19,32	12,16	8,94
Média±DPM	12,89±4,14	12,33±2,94	10,57±2,78

Valores individuais do volume absoluto (mm³) de tecido ósseo, de biomaterial e de tecido conjuntivo no processo de reparo ósseo para grupo de tratamento com **HA** nos diferentes períodos pós-cirúrgicos

	30dias	90dias	180dias
TECIDO ÓSSEO			
A	5,85	5,35	2,38
B	3,93	5,84	6,94
C	4,66	7,67	9,35
D	8,46	5,56	5,19
E	1,78	9,46	23,38
Média±DPM	4,94±2,47	6,78±1,76	9,45±8,19
BIOMATERIAL (HA)			
A	29,64	28,40	29,05
B	28,01	31,64	26,86
C	25,31	29,85	31,33
D	30,59	24,65	38,20
E	59,25	46,58	31,52
Média±DPM	34,56±13,95	32,22±8,43	31,39±4,25
TECIDO CONJUNTIVO			
A	14,29	20,17	24,11
B	27,69	21,41	20,64
C	25,46	19,60	15,80
D	31,00	22,92	29,60
E	2,32	20,94	9,29
Média±DPM	20,15±11,78	21,01±1,28	19,89±7,77

Valores individuais do volume absoluto (mm³) de tecido ósseo, de biomaterial e de tecido conjuntivo no processo de reparo ósseo para grupo de tratamento com **TCP** nos diferentes períodos pós-cirúrgicos

	30dias	90dias	180dias
TECIDO ÓSSEO			
A	3,43	19,44	22,00
B	5,33	14,49	14,67
C	3,74	3,53	24,22
D	2,79	21,64	17,89
E	5,53	10,53	8,88
Média±DPM	4,16±1,21	13,93±7,25	17,53±6,08
BIOMATERIAL (TCP)			
A	13,04	9,80	12,89
B	8,75	11,70	4,13
C	17,12	1,85	8,40
D	14,08	11,62	11,55
E	11,47	10,54	4,23
Média±DPM	12,89±3,10	9,10±4,13	8,24±4,05
TECIDO CONJUNTIVO			
A	30,73	7,49	14,83
B	17,83	9,50	18,62
C	25,14	10,18	12,07
D	24,27	10,86	10,12
E	17,48	20,96	14,72
Média±DPM	23,09±5,55	11,80±5,27	14,07±3,21

Valores individuais do volume absoluto (mm³) de tecido ósseo, de biomaterial e de tecido conjuntivo no processo de reparo ósseo para grupo de tratamento com **HA/TCP** nos diferentes períodos pós-cirúrgicos

	30dias	90dias	180dias
TECIDO ÓSSEO			
A	7,14	10,65	8,60
B	4,66	5,95	2,91
C	2,20	10,95	10,14
D	9,17	12,86	10,92
E	11,27	-----	5,18
Média±DPM	6,89±3,58	10,11±2,94	7,55±3,40
BIOMATERIAL (HA/TCP)			
A	24,84	44,06	29,86
B	36,46	26,28	25,00
C	29,08	40,82	32,90
D	36,45	23,63	38,81
E	24,84	-----	27,40
Média±DPM	30,33±5,81	33,70±10,24	30,80±5,35
TECIDO CONJUNTIVO			
A	23,57	15,24	29,41
B	18,98	17,97	13,65
C	16,04	15,04	16,24
D	7,57	22,08	20,66
E	13,88	-----	19,86
Média±DPM	16,01±5,95	17,58±3,29	19,96±5,99

APÊNDICE D - NÚMERO ABSOLUTO DE OSTEOLASTOS E OSTEÓCITOS

Valores individuais do número absoluto ($\times 10^2$) de osteoblastos e osteócitos envolvidos no processo de reparo ósseo para grupo de tratamento com **enxerto autógeno** nos diferentes períodos pós-cirúrgicos

	30dias	90dias	180dias
OSTEOBLASTOS			
A	145,43	83,79	33,97
B	160,00	95,09	45,18
C	114,37	51,36	45,09
D	118,34	59,35	51,57
E	54,71	65,17	22,39
Média±DPM	118,57±40,41	70,95±10,82	39,64±11,53
OSTEOCITOS			
A	194,78	136,55	170,57
B	182,76	112,01	107,30
C	162,43	119,32	111,06
D	135,49	149,94	85,50
E	217,39	118,86	113,52
Média±DPM	178,57±31,23	127,33±15,54	117,59±31,62

Valores individuais do número absoluto ($\times 10^2$) de osteoblastos e osteócitos envolvidos no processo de reparo ósseo para grupo de tratamento com **HA** nos diferentes períodos pós-cirúrgicos

	30dias	90dias	180dias
OSTEOBLASTOS			
A	18,41	23,96	19,28
B	17,58	20,30	34,70
C	13,54	48,80	29,13
D	25,74	21,60	34,66
E	33,76	91,11	63,93
Média±DPM	21,80±8,00	41,15±30,27	36,34±16,65
OSTEOCITOS			
A	68,33	91,52	60,34
B	73,87	92,47	97,03
C	53,20	104,57	85,88
D	100,51	89,65	101,96
E	137,66	261,11	183,70
Média±DPM	86,72±33,21	127,86±74,72	105,78±46,43

Valores individuais do número absoluto ($\times 10^2$) de osteoblastos e osteócitos envolvidos no processo de reparo ósseo para grupo de tratamento com **TCP** nos diferentes períodos pós-cirúrgicos

	30dias	90dias	180dias
OSTEOBLASTOS			
A	4,96	37,53	80,20
B	0	58,20	90,30
C	11,70	18,39	82,87
D	2,41	75,24	66,05
E	9,11	147,95	102,38
Média±DPM	5,64±4,78	67,46±49,82	84,36±14,95
OSTEOCITOS			
A	28,87	166,98	210,07
B	23,78	93,07	78,64
C	43,20	57,72	185,04
D	29,83	192,44	101,77
E	59,89	320,42	152,46
Média±DPM	37,01±14,42	166,13±101,96	145,60±55,14

Valores individuais do número absoluto ($\times 10^2$) de osteoblastos e osteócitos envolvidos no processo de reparo ósseo para grupo de tratamento com **HA/TCP** nos diferentes períodos pós-cirúrgicos

	30dias	90dias	180dias
OSTEOBLASTOS			
A	17,33	47,09	57,27
B	20,58	66,04	47,98
C	43,52	44,38	35,78
D	18,50	52,20	49,42
E	59,45	-----	65,63
Média±DPM	31,87±18,80	52,43±9,63	51,21±11,14
OSTEOCITOS			
A	168,68	210,98	94,62
B	196,30	121,12	135,71
C	124,44	154,31	93,10
D	178,19	146,98	110,39
E	291,48	-----	179,86
Média±DPM	191,82±61,67	158,35±37,86	122,74±36,23

Anexos

ANEXOS

ANEXO A - Ofício de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Fone: (14)3235-8356

e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. N° 018/2007

Bauru, 01 de outubro de 2007.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado “**Avaliação histomorfométrica comparativa do processo de reparo de defeitos ósseos perenes em calvária de ratos tratados com beta-trifosfato, hidroxiapatita sintética, hidroxiapatita sintética + beta-trifosfato e osso autógeno**”, de autoria de Angélica Cristina de Oliveira Martins foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator **aprovando** o projeto foi aceito em reunião desta Comissão, realizada no dia 13 de setembro de 2007.

Atenciosamente,

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e
Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Rumio Taga
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO B - Ofício de Aprovação de Alteração do Título do Projeto de Pesquisa **Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Fone: (14)3235-8356

e-mail: mferrari@fob.usp.br

Proc. Nº 018/2007

Bauru, 10 de fevereiro de 2010.

Senhor Professor,

Aprovamos “*ad referendum*” desta Comissão, a solicitação de Vossa Senhoria para a alteração do título do projeto de pesquisa “Avaliação histomorfométrica comparativa do processo de reparo de defeitos ósseos perenes em calvária de ratos tratados com beta-trifosfato, hidroxiapatita sintética, hidroxiapatita sintética + beta-trifosfato e osso autógeno”, de autoria de Angélica Cristina de Oliveira Martins sob sua orientação, para “Avaliação histomorfométrica comparativa do processo de reparo de defeitos ósseos perenes em calvária de ratos tratados com β -fosfato tricálcio, hidroxiapatita sintética, hidroxiapatita sintética + β -fosfato tricálcio e osso autógeno”, considerando que não há impedimentos éticos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Rumio Taga

Docente do Departamento de Ciências Biológicas