INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**ADIÇÃO DE COMPLEXO VITAMÍNICO EM DUAS BIOCERÂMICAS E SEU
EFEITO NA REGENERAÇÃO ÓSSEA**

RAFAEL DA SILVA BEOLCHI

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para a
obtenção do grau de Mestre em
Ciências na área de Tecnologia
Nuclear – Materiais

Orientador: Dr. Luis A. Genova

São Paulo

2009

À minha esposa, Patrícia Yoshida, por ser uma das razões deste trabalho. Mais do que isso, por ser uma das minhas razões de vida. Obrigado pela ajuda, balanceando com sua serenidade todas as minhas inquietações.

À minha filha, Mariana Yoshida Beolchi, por ser o meu Sol. Obrigado por nos iluminar, meu amor.

Aos meus pais, por plantar em nós três a semente da leitura, do estudo, da investigação. Sobretudo, pelo exemplo de vida, de família, de trabalho e de dignidade. Que eu me torne metade de quem vocês são, para que me sinta uma pessoa plena.

Aos meus irmãos, Gustavo e Renato. O primeiro, por me levar de mãos dadas às aulas, da pré-escola à faculdade, e por trilhar antes muitos dos caminhos que vim a percorrer. Ao segundo, por me mostrar a força da criatividade, da espontaneidade e do lirismo.

Quem eu seria sem vocês?

Agradecimentos

Ao programa de Pós-graduação do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, pelo legado de me fazer voltar a olhar o Universo com o deslumbramento de uma criança.

Ao Prof. Luís Antonio Genova, pela ajuda, pela orientação, pela amizade e pela confiança depositada desde o primeiro dia, e em cada uma das fases do curso. Verdadeiros Professores são difíceis de encontrar, e eu tive esse privilégio. Muito Obrigado.

Ao colega Vanderlei Ferreira, pela amizade, pela ajuda e pelo suporte nas diversas etapas deste trabalho, e por me apresentar ao Instituto.

À Profa. Ana Helena de Almeida Bressiani, pela ajuda na etapa do corte das amostras.

Ao Dr. Marcos Barbosa Salles, pela inestimável ajuda, seja na parte experimental, seja na parte acadêmica.

Ao Dr. Fabio F. Mitri Luiz, pela ajuda na parte cirúrgica, e pelos inúmeros momentos de descontração.

Ao Dr. Sérgio Allegrini Jr. pela ajuda na parte cirúrgica, e pela confiança nos meus primeiros passos em minha profissão.

Ao Dr. Marcelo Yoshimoto, pela ajuda na tomada fotográfica trans-cirúrgica.

À minha colega de profissão e de mestrado, Tamyie pela ajuda com o preparo das lâminas.

À Alethéia Pablos, pela amabilidade da ajuda na fase inicial do experimento.

À Profa. Olga, do Centro de Biotecnologia, pela simpatia e pela ajuda na microscopia.

Aos meus amigos Fábio Bevilacqua Fowler, Renato Miotto Palo e Luiz Gustavo de Mattos Abreu. Talvez vocês nem imaginem, mas tiveram um papel fundamental na conclusão desse trabalho.

ADIÇÃO DE COMPLEXO VITAMÍNICO EM DUAS BIOCERÂMICAS E SEU EFEITO NA REGENERAÇÃO ÓSSEA

Rafael da Silva Beolchi

RESUMO

Um dos objetivos da pesquisa em Biomateriais é o desenvolvimento de dispositivos que auxiliem a regeneração óssea. Duas cerâmicas sintéticas têm sido largamente utilizadas: a hidroxiapatita (HAp) e o beta fosfato tricálcico (β -TCP). Em muitas situações é desejável que a velocidade de absorção desses materiais pelo organismo seja compatível com a velocidade de crescimento ósseo, e nesses casos, o emprego da mistura dessas duas fases mostra-se vantajoso. A absorção e o crescimento ósseo são processos fisiológicos complexos, afetados, entre outras coisas, pela resposta inflamatória da região cirúrgica. Assim, uma resposta inflamatória exacerbada é potencialmente danosa, já que pode induzir a um aumento no estresse oxidativo devido à produção de radicais livres. O ataque dos radicais livres causa, entre outros efeitos danosos, a degeneração da membrana celular, que pode acarretar necrose e/ou apoptose das células da região cirúrgica. Neste trabalho, duas cerâmicas foram implantadas em fêmures de ratos: β -TCP ou a mistura bifásica 60:40% em massa de HAp: β -TCP. O crescimento ósseo foi avaliado por microscopia ótica e de fluorescência, utilizando marcadores ósseos fluorescentes. Além disso, avaliou-se o efeito da presença de um complexo vitamínico, moderador do processo inflamatório. Concluiu-se que o β -TCP puro foi mais absorvido quando comparado a mistura β -TCP-HAp, e encontram-se indícios de que a presença do composto vitamínico mediou de forma favorável a neoformação óssea.

BONE REGENERATION EFFECT AFTER THE ADDITION OF A VITAMIN COMPLEX IN TWO BIOCERAMICS

Rafael da Silva Beolchi

ABSTRACT

One of the goals of the Biomaterials research is the development of devices that help bone regeneration. Two synthetic ceramics has been widely used with that purpose: Hidroxyapatite (HAp) and Beta tricalcium phosphate (β -TCP). In many situations it is desirable that the resorption rate of these materials by the body matches the bone growth rate. In these cases, the use of a mixture between the two phases is beneficial. The material resorption and bone growth are complexes phisiological processes, influenced amongst other things by the inflammatory response of the surgical site. That being said, an exacerbated inflammatory response is potentially hazardous, since it may induce an increase of the oxidative stress due to the free radicals production. The free radicals attack causes, amongst other hazardous effects, the cell membrane degeneration which in turn may lead to cell necrosis and/or apoptosis within the surgical site. In this work, two ceramics were implanted in rats femora: β -TCP or the biphasic mixture of 60:40% in mass of HAp: β -TCP. The bone growth was assessed by both optical and fluorescence microscopy, using fluorescent bone markers. Moreover, it was also evaluated the effect of the presence of a vitamin complex, mediator of the inflammatory response. It was concluded that the pure β -TCP was more readily absorbed when compared with the mixture β -TCP-HAp, and there it was signs that the presence of the vitamin complex may have helped in a favorable way the bone neoformation.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 TECIDO ÓSSEO	4
2.1.1 HISTOLOGIA ÓSSEA	4
2.1.2 DINÂMICA DO TECIDO ÓSSEO	6
2.1.3 DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO	7
2.2 BIOMATERIAIS	8
2.2.1 BIOCERÂMICAS	12
2.2.2 – FOSFATOS DE CÁLCIO	12
2.2.3- HIDROXIAPATITA	14
2.2.4 – BETA FOSTATO TRICÁLCICO	15
2.3 - INFLAMAÇÃO/REPARAÇÃO	17
3 - OBJETIVOS	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA DIFRAÇÃO DE RAIOS-X	22
4.2 – PREPARO DAS AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	22
4.3 –EXPERIMENTAÇÃO IN VIVO	23
4.3.1 – PREPARO DOS CORPOS DE PROVA	23
4.3.2 – CIRURGIA E APLICAÇÃO DOS MARCADORES ÓSSEOS	25
4.3.3 – PREPARO DAS AMOSTRAS PARA OBSERVAÇÃO EM MICROSCÓPIO	30
4.3.4 – PREPARO PARA A HISTOLOGIA	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 DIFRAÇÃO DE RAIOS X	34
5.2 – ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	35
5.3 ANÁLISE DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA POR MICROSCOPIA DE LUZ	38
5.3.1 COLORAÇÃO POR TRICRÔMICO DE MASSON	38
5.3.2 COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA E EOSINA	45
5.4 ANÁLISE DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	50
6. CONCLUSÕES	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
8. ANEXOS	69
8.1 ANEXO 1	69
8.2 ANEXO 2	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Molde bipartido metálico utilizado para a conformação dos pinos a serem implantados.

Figura 2: Implante cerâmico após conformação, gelificação e secagem.

Figura 3: Região cirúrgica da rata da raça Wistar, após tricotomização e anti-sepsia.

Figura 4: Leito cirúrgico após primeira incisão, permitindo a visualização da fáscia muscular subjacente.

Figura 5: Perfuração do fêmur com broca de 2 mm de diâmetro.

Figura 6: Inserção do implante cerâmico no defeito ósseo femoral

Figura 7: DRX da amostra bifásica MB, indicando picos referentes à HAp e ao β -TCP.

Figura 8: DRX da amostra de β -TCP.

Figura 9: Grânulos de β -TCP (a) e grânulos de MB (b) observadas por microscopia eletrônica de varredura

Figura 10: Superfície de grânulo de β -TCP (a) e de grânulo de MB (b) observada por microscopia eletrônica de varredura

Figura 11: Detalhes dos grânulos de β -TCP (a) e de MB (b) observada por microscopia eletrônica de varredura.

Figura 12: Partículas de β -TCP (a) e de MB (b), após desaglomeração dos grânulos, observadas por microscopia eletrônica de varredura.

Figura 13: Corte transversal do fêmur de uma rata do Grupo I (controle) na região cirúrgica, após coloração com Tricrômico de Masson. A seta indica a neoformação óssea.

Figura 14: Grupo I, coloração com Tricrômico de Masson. Rarefação e relativa desorganização do tecido ósseo neoformado sobre a região da ferida cirúrgica (seta escura). A seta branca demonstra a remodelação óssea frente às novas forças depois de agredido.

Figura 15: Corte transversal do fêmur de uma rata do Grupo II (β -TCP+composto) na região cirúrgica, após coloração com Tricrômico de Masson. O material escuro no centro da ferida cirúrgica é o implante cerâmico.

Figura 16: Grupo II, coloração com Tricrômico de Masson. A seta branca demonstra osteointegração e osteocondução.

Figura 17: Imagem em maior aumento do Grupo II apresentando evidências de absorção do material cerâmico e sua substituição por tecido ósseo neoformado (seta branca).

Figura 18: Corte transversal do fêmur de animal do Grupo III (MB+composto) na região cirúrgica, após coloração com Tricrômico de Masson.

Figura 19: A seta branca indica região de osteointegração e osteocondução do osso neoformado em relação ao material implantado. A seta escura aponta região de absorção do material cerâmico, menos intensa que no grupo anterior. Grupo III, coloração com Tricrômico de Masson.

Figura 20: Micrografia de corte transversal do fêmur de animal do Grupo IV (β -TCP). Coloração com Tricrômico de Masson.

Figura 21: Micrografia anterior do Grupo IV (β -TCP) em maior aumento, onde quase não é mais possível divisar o material cerâmico implantado, com neoformação óssea mais discreta em relação ao Grupo II, que recebeu β -TCP e o composto vitamínico.

Figura 22: Micrografia de corte transversal do fêmur de animal do Grupo V (MB). Coloração com Tricrômico de Masson.

Figura 23: Osteointegração e osteocondução sobre os materiais implantares do Grupo V. Mesmo sem a presença do composto vitamínico, a fase HAp, menos absorvível favoreceu a neoformação óssea.

Figura 24: A seta branca destaca região de neoformação óssea incompleta no Grupo I (Controle). Coloração HE.

Figura 25: Micrografia da região implantar do Grupo II (β -TCP+composto). Absorção de grande parte do material cerâmico e substituição por novo tecido ósseo. Coloração HE.

Figura 26: Menor regeneração óssea no Grupo IV (β -TCP) quando comparado ao Grupo II, sugerindo que a presença do composto vitamínico exerceu um efeito benéfico no processo reparador. Coloração HE.

Figura 27: Grupo III (MB mais complexo vitamínico V. Menor taxa de substituição óssea do material cerâmico implantado, quando comparados ao ocorrido com os grupos II e IV. Coloração HE.

Figura 28: Grupo V (MB). De forma similar ao grupo anterior (III), tem-se novamente menor absorção do material cerâmico pelo organismo devido á presença da HAp. Esta técnica de coloração não apresentou evidências significativas quanto ao efeito da presença ou não do composto vitamínico. Coloração HE.

Figura 29: Picos de excitação (em preto) e de emissão luminosa (em verde) para Calceína.

Figura 30: Micrografia da região cirúrgica em animais do Grupo I (controle) em campo claro. A seta escura demonstra região óssea original, e a seta branca, a região óssea neoformada.

Figura 31: A mesma região da figura 30, sob iluminação UV (filtro 2). Tanto o osso antigo como a região óssea neoformada emitem fluorescência semelhante.

Figura 32: Contraste entre a fluorescência da calceína (seta branca) e tecido ósseo original (seta escura) sob o filtro 9 na mesma região da figura 30.

Figura 33: A visualização da mesma região cirúrgica da figura 30 permite perceber o contraste entre a fluorescência da alizarina (seta branca) e do tecido ósseo original.

Figura 34: Microscopia de Campo Claro

Figura 35: Fluorescência da calceína. A seta branca aponta regiões de remodelação óssea às novas forças depois de agredido.

Figura 36: Fluorescência da Alizarina. Novamente, A seta branca aponta que a remodelação óssea ocorreu mesmo na terceira semana após a injúria.

Figura 37: Microscopia de campo claro em maior aumento.

Figura 38: Fluorescência da Calceína demonstrando diferença na fluorescência entre osso original (escuro) e o neoformado (verde claro).

Figura 39: A fluorescência da Alizarina indica que houve remodelação óssea em toda a área da ferida cirúrgica mesmo na terceira semana após a cirurgia.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição dos materiais de implante e os respectivos grupos experimentais.

Tabela 2 - Tempo de aplicação dos marcadores ósseos com as respectivas dosagens para ratos.

Tabela 3 – Sequência de misturas etanol/água destilada utilizadas para a desidratação das amostras com os respectivos tempos de desidratação.

Tabela 4 – Condições empregadas para a etapa de embebição em resina.

Tabela 5 – Valores de Excitação e Emissão para os marcadores fluorescentes.

Tabela 6 – Especificação dos filtros de fluorescência.

1. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um dos mais dinâmicos tecidos do corpo. É altamente vascularizado e apresenta enorme capacidade de auto-reparação, devido à sua característica de "remodelação óssea". Em outras palavras, ele pode alterar as suas propriedades e configurações em resposta a novas exigências mecânicas, que podem afetar sua morfologia de acordo com a intensidade e frequência exigida (SCHNEIDER, 1995). Além disso, é um dos poucos tecidos no corpo humano que apresentam a capacidade de regeneração (substituição do tecido lesado por um tecido idêntico ao anterior, com as mesmas funções fisiológicas e metabólicas) e não apenas cicatrização (associada à substituição do tecido lesado por um tecido rico em fibroblastos, que são células inespecíficas).

Casos como extirpação de tumores, enfermidades causadoras de danos irreversíveis, defeitos congênitos com perdas funcionais e atrofia com perda gradual de tecidos são alguns exemplos da necessidade do uso de biomateriais.

Nesse universo, dois biomateriais cerâmicos sintéticos, à base de fosfato de cálcio têm sido largamente utilizados: a hidroxiapatita (HAp) e o beta fosfato tricálcico (β -TCP).

A HAp é um material osteocondutor, ou seja, que permite o crescimento ósseo por meio de aposição do osso adjacente, portanto na presença obrigatória de células mesenquimais primitivas, que se diferenciam em células osteogênicas (ALBREKTSSON e JOHANSSON 2001). É biocompatível, e dessa forma, novo osso forma-se sem evidências de reações teciduais indesejáveis. Pode ser encontrada comercialmente em diversas texturas e tamanhos de partículas, por exemplo, em blocos ou grânulos, podendo ser porosos ou densos (MISCH 2000).

A HAp é resistente à absorção, que ocorre numa taxa de 1 a 2% por ano (CONSTANTINO 1994). Quando o sítio a ser regenerado é extenso, a hidroxiapatita pode formar um suporte (ou arcabouço) para que o osso possa crescer ocupando os espaços vazios e assim não permitindo que o espaço seja ocupado por tecido fibroso. Entretanto, nos casos em que a regeneração óssea é desejável, a resistência à absorção desse material pode ser prejudicial, já que

grânulos não absorvidos desse material podem ficar envoltos pela matriz óssea neoformada.

Assim como a HAp, o β -TCP também é um material osteocondutor. Ele apresenta 39% em peso de Cálcio e 20% em peso de Fósforo, similar ao conteúdo mineral do osso. LeGEROS (1991) demonstrou o uso potencial de cerâmicas de β -TCP como substratos para técnicas de regeneração tecidual e como veículo de fármacos. A absorção do β -TCP é bem mais rápida quando comparada à absorção da hidroxiapatita. Ela se dá via dissolução após um período de 6 a 18 meses. Infelizmente, a substituição do β -TCP por osso não ocorre de maneira uniforme, ou seja, pode haver menor volume ósseo do que o volume de β -TCP absorvido. Devido a isso, o uso desse material tem sido associado a outros materiais menos absorvíveis, como a HAp, de forma a compatibilizar a taxa de absorção com a taxa de crescimento ósseo (MOORE 2001).

Assim, se a absorção do material cerâmico for rápida demais, a ponto de ultrapassar a velocidade de neoformação óssea, haverá grande chance de ocorrer fibrose (cicatrização), e não formação de novo osso (regeneração).

Outra questão importante quando se trata de neoformação óssea refere-se ao metabolismo ósseo reparador. Sempre que houver agressão ao tecido, inclusive no caso de qualquer procedimento cirúrgico, ocorrerá o fenômeno da inflamação. A resposta inflamatória desencadeia uma série complexa de eventos que, tanto quanto possível, cicatriza e/ou regenera o tecido lesado. O reparo começa durante a fase ativa da inflamação, porém atinge o seu término após a influência lesiva ter sido neutralizada (ROBBINS, 1991).

Entretanto, há casos em que o processo inflamatório torna-se exacerbado, levando a uma produção excessiva de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROS) decorrente do brusco aumento do metabolismo celular, o que aumenta o estresse oxidativo dos tecidos circunvizinhos.

O ataque dos radicais livres aos lipídios tem uma natureza propagante, levando a uma degeneração da membrana celular, chamada de peroxidação lipídica (POMPÉIA, 2003).

É desejável que um biomaterial utilizado com o intuito de substituir ou aumentar o volume ósseo tenha a capacidade de controlar, ou pelo menos mediar a reação inflamatória e o conseqüente estresse oxidativo, situações normais em qualquer tecido lesado, e que podem ser danosas quando exacerbadas. Novamente, esse estresse oxidativo é decorrente do aumento do metabolismo celular durante a fase de cicatrização e reparação, e pode acarretar uma série de eventos biológicos indesejáveis e retardadores no processo cicatricial e reparador, podendo até mesmo comprometê-los.

Assim, um biomaterial que medie a resposta inflamatória, melhorando tanto a cicatrização como a quantidade de neoformação óssea no local da cirurgia, será um ótimo aliado nos casos em que a utilização de enxerto autógeno é dificultada ou contra-indicada.

Tendo esse problema em vista, SALLES (2001) desenvolveu um composto vitamínico cuja função primordial é a mediação da inflamação, controlando o estresse oxidativo e incentivando a proteção de membrana das células da região submetida à cirurgia.

Neste trabalho avaliou-se a cicatrização óssea de sítios cirúrgicos submetidos à implantação de biomateriais de diferentes composições (β -TCP puro e da mistura de HAp e β -TCP, na proporção de 60:40 em massa), acrescentando-se a estes materiais, em uma proporção de 30% em relação ao seus pesos, um composto vitamínico desenvolvido por Salles como sendo um controlador de processos inflamatórios. Com isso avaliou-se o efeito dessas diferentes composições cerâmicas e da presença do composto vitamínico na taxa e na qualidade de neoformação óssea entre os grupos experimentais e controle por meio de microscopia de luz e de fluorescência.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é um dos principais constituinte do esqueleto, agindo como suporte para as partes moles e protegendo órgãos vitais, como os contidos no crânio e no tórax. Além disso, os ossos também podem ser considerados depósito de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada para manter constante sua concentração nos líquidos corporais. Os principais constituintes do osso, a hidroxiapatita e o colágeno, atuam como um sistema compósito, e são, respectivamente, materiais cerâmico e polimérico naturais. São os responsáveis pela dureza e resistência do tecido ósseo, permitindo que ele resista à compressão e à tensão (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

2.1.1 HISTOLOGIA ÓSSEA

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo especializado, formado por células e material intercelular calcificado, chamado matriz óssea. As células componentes do tecido ósseo são os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos (ROSS et al., 1993).

Os osteoblastos são os responsáveis por sintetizar a parte orgânica da matriz óssea, composta basicamente por colágeno tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas. São capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. Os osteoblastos mantêm sua comunicação com o ambiente ao seu redor por meio de prolongamentos citoplasmáticos, que se tornam mais evidentes quando estão envolvidos pela matriz óssea calcificada, formando canalículos. A partir desse momento, o osteoblasto passa a ser chamado de osteócito (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Como não há difusão de substâncias por meio da matriz óssea, a nutrição dos osteócitos depende exclusivamente destes canalículos presentes na matriz.

Eles possibilitam a passagem de nutrientes e permitem a comunicação dos osteócitos com seus vizinhos, e também com o periósteo e com o endósteo, além do sistema vascular da matriz. Esses canalículos permitem o fluxo intercelular de íons e pequenas moléculas, como hormônios, que controlam o crescimento e o desenvolvimento dos ossos. Morfologicamente, os osteócitos são achatados e apresentam características que indicam pequena atividade sintética. Mesmo assim, são essenciais para a manutenção da matriz óssea, pois sua morte é seguida por absorção da matriz (ROSS et al., 1993, JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

O osteoblasto e o osteócito pertencem a uma linhagem de células que constituem o estágio final da diferenciação desta linhagem. As células osteoprogenitoras são células mesenquimais pluripotentes, indiferenciadas e primitivas. Possuem alta capacidade proliferativa e são capazes de se especializar em células ósseas maduras, condroblastos ou fibroblastos, de acordo com a natureza ou o grau do estímulo que recebam. São comumente encontradas em tecidos conjuntivos ao redor de vasos sanguíneos e nas superfícies dos tecidos ósseos, endósteo e periósteo.

Os osteoclastos são células móveis, gigantes, multinucleadas e que se originam a partir da fusão dos monócitos do sangue circulante. Encontram-se nas áreas de absorção do tecido ósseo, localizados em depressões da matriz, escavadas pela ação enzimática, chamadas lacunas de Howship. Os osteoclastos produzem hialuronidase, collagenase e outras enzimas que atacam a matriz e liberam íons cálcio. Também participam da eliminação dos restos de tecido ósseo que se formam durante a absorção do osso (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

O tecido ósseo pode ser dividido em dois tipos, devidos às suas diferenças morfológicas: o cortical, mais mineralizado e o trabecular, mais poroso.

O tecido cortical também conhecido como compacto, lamelar ou denso, apresenta elevada densidade, com apenas 10% de porosidade, na qual se encontram os osteócitos, canalículos e vasos sanguíneos. É um tecido de revestimento, situado na porção mais externa do osso, podendo estar coberto externamente por cartilagem articular ou periósteo, que é uma membrana

constituída por fibras colágenas, fibroblastos e uma porção celular mais profunda, constituída por células osteoprogenitoras. (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

O tecido ósseo compacto praticamente não apresenta espaços medulares, existindo, no entanto, além dos canalículos, proveniente das lacunas preenchidas por osteócitos, um conjunto de canais que são percorridos por nervos e vasos sanguíneos. (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

O tecido trabecular (esponjoso), tem densidade baixa, com porosidade variando entre 50 a 90%. Esse tecido também compreende a medula óssea, depositada em espaços constituídos por uma rede de placas finas e irregulares, denominadas trabéculas, separadas por espaços intercomunicantes. As trabéculas são recobertas pelo endóstio e, de forma similar ao perióstio, contém células da série osteogênica responsáveis pelo crescimento, reparo ósseo e remodelamento contínuos (ROSS et al., 1993).

2.1.2 DINÂMICA DO TECIDO ÓSSEO

Os osteoblastos podem secretar matriz e formar tecido ósseo por dois diferentes processos de ossificação: intramembranosa e endocondral. Entretanto, os dois processos resultam em um tecido histologicamente semelhante. A ossificação intramembranosa ocorre a partir de um tecido mesenquimal vascularizado. As células mesenquimais indiferenciadas que compõem esse tecido diferenciam-se em células osteoprogenitoras e, posteriormente, em osteoblastos. Certas regiões do tecido ósseo em formação não calcificam, correspondendo às regiões do endóstio e do perióstio. Já a ossificação endocondral ocorre com maior frequência em ossos longos e inicia-se pela formação de um molde cartilaginoso, onde o osso será formado. (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

O tecido ósseo sofre três processos ao longo da vida: modelamento, que ocorre quando o osso toma forma; reparo, que é a resposta cicatricial frente a uma injúria; e remodelamento, que se trata de processo fisiológico ósseo contínuo (SCHWAN e SOUZA, 2000).

O modelamento pode ser precedido ou não pelo molde de cartilagem (ossificação endocondral) e envolve tanto formação óssea (atividade de osteoblastos), quanto absorção (atividade de osteoclastos) (CARVALHO e BUZATO, 2005).

O remodelamento é um processo fisiológico dinâmico cujo objetivo é manter constantes os níveis iônicos do sangue, tornando disponíveis as reservas de cálcio e fósforo e colaborando para a homeostase mineral.

Na presença de um defeito ósseo (por exemplo, uma fratura) o osso pode ser completamente reconstituído pela reativação dos mesmos processos que ocorrem na embriogênese. Imediatamente após a ocorrência do defeito, forma-se um coágulo e uma rede de fibrina que preenche o espaço do defeito. Células inflamatórias migram para o local e liberam mediadores químicos e fatores de crescimento capazes de ativar as células osteoprogenitoras e de revestimento ósseo. A formação óssea estará na dependência da formação de uma ampla rede vascular e de estabilidade mecânica dos fragmentos ósseos (CARVALHO e BUZATO, 2005). Uma das características do tecido ósseo quando lesado é a capacidade de regenerar e retornar à estrutura tecidual original, sem a formação de tecido cicatricial fibrótico indiferenciado (HOLLINGER et al., 1997). Em resumo, a regeneração envolve a restituição de tecidos idênticos aos que foram lesados.

Apesar desse potencial, muitas são as ocasiões em que a regeneração óssea necessita de auxílio: nas uniões retardadas, nas não-uniões, em fraturas múltiplas ou cominutivas, nas osteotomias e no preenchimento de cavidades ou defeitos segmentares extensos (COOK e RUEGER, 1996).

2.1.3 DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO

Defeitos críticos são aqueles cujas dimensões não permitem cicatrização espontânea ao longo da vida. O padrão e o tempo de reparo variam de acordo com a espécie animal e com a localização anatômica, havendo, portanto, diferença no tamanho do defeito ósseo considerado crítico. TURNBULL E FREEMAN (1974) observaram que defeitos de 2 mm de diâmetro, confeccionados

em calvária de ratos Wistar, falharam na cicatrização em um período de 12 semanas.

ALMEIDA PRADO, num estudo de 2006, provocou defeitos ósseos de 2, 3 ou 3,5mm de diâmetro em tíbias de 54 ratos adultos, que foram sacrificados após 15, 30 e 45 dias. Verificou-se fechamento linear do defeito ósseo em todos os grupos. Comparando-se os tamanhos de defeitos em cada período, não foi encontrada diferença estatística com relação à porcentagem de área óssea. A autora concluiu que, como não houve fechamento da área total, pode-se utilizar o modelo experimental de defeito em tíbias de ratos para estudo de regeneração óssea.

2.2 BIOMATERIAIS

A definição de biomaterial é um tema controverso. Segundo WILLIAMS (1987) o termo se refere a qualquer substância, sintética ou natural, que pode ser utilizada de forma transitória ou permanente pelos tecidos constituintes dos seres vivos.

De acordo com a norma ISO 10993-1:1997 (Biological evaluation of medical devices – Part 1: Evaluation and testing), biomaterial é todo material sintético, natural ou natural modificado, destinado a estar em contato e interagir com o sistema biológico.

Casos como extirpação de tumores, enfermidades causadoras de danos irreversíveis, defeitos congênitos com perdas funcionais e atrofia com perda gradual de tecidos são exemplos da necessidade do uso de biomateriais

Além disso, há casos em que existe associação de diversos materiais, como no caso de fabricação de válvulas cardíacas sintéticas (compostas por materiais metálicos e poliméricos). Outro exemplo é o caso de cirurgias para aumento ou recuperação de volume ósseo, em que geralmente são utilizados materiais cerâmicos (como substitutos ósseos) e poliméricos (na forma de membranas) conjuntamente.

A perda de tecido ósseo pode ocorrer por diversos fatores: como trauma, fraturas, patologias e também procedimentos cirúrgicos. Muitas vezes, devido à perda de substância óssea, não há reparo completo, resultando em um defeito que pode implicar comprometimento da estética e perda parcial ou total da função da estrutura lesada (GRANDI, 2007)

A partir do trabalho de BRANEMARK et al. (1969), os implantes de titânio endo-ósseos surgiram como uma promissora possibilidade de reabilitação oral. Entretanto, para agirem como reabilitadores, devem ser suportados por tecido ósseo. Um dos maiores problemas para a sua instalação é a absorção gradual que o osso alveolar sofre normalmente após extrações, traumas ou infecções, provocando uma redução em sua espessura e/ou sua altura, de forma que, freqüentemente, a quantidade de osso remanescente é insuficiente para o suporte apropriado dos implantes de titânio (ATWOOD 1971, ZADEH 2004). Em muitos casos, portanto, para uma reabilitação segura e previsível, necessita-se de maior quantidade de osso do que o disponível no sítio cirúrgico, devendo-se assim, lançar mão de técnicas de aumento de volume ósseo.

Segundo parâmetros da Sociedade Européia de Biomateriais (1986), é importante definir os seguintes termos a seguir:

- Implante: Dispositivo colocado no corpo, sepultado parcial ou totalmente abaixo do epitélio, com intenção de permanecer por longo período de tempo. Não apresenta tecido vivo.
- Enxerto: Tecido transferido de um local doador para um local receptor, sofrendo ou não algum tipo de tratamento. Apresenta tecido vivo.
- Transplante: Aplica-se a estruturas completas (órgãos), transferidas de um local a outro, ou de uma pessoa a outra, com objetivo de re-estabelecer função.

Independentemente da técnica de aumento de volume ósseo utilizada, alguns requisitos são necessários para que haja boas chances de sucesso. Dentre esses requisitos pode-se citar a necessidade de que o leito ósseo receptor

seja vascularizado, e que haja contato entre o enxerto e/ou implante e osso (ou seu periósteo), de onde células osteoblásticas migrarão para formar primeiro uma interface e posteriormente proliferar (BURSTEIN 1985). Além disso, deve ocorrer uma adequada cobertura de tecido mole, para prevenir a contaminação da região (GOLDBERG 1987).

É possível classificar os biomateriais em duas categorias principais: os de origem biológica e os de origem sintética. Os de origem biológica podem ser autógenos (ou autólogos), quando o material pertence ao próprio indivíduo e implantes alógenos, que englobam todo tipo de material proveniente de outra fonte que não o próprio indivíduo: homogêneos, quando são provenientes da mesma espécie, porém de indivíduos diferentes e xenógenos ou heterógenos, que são obtidos de outras espécies animais.

Por último, os implantes aloplásticos, que são biomateriais sintéticos, e podem ser divididos em metálicos, cerâmicos, polímeros e compósitos

Considera-se o enxerto de osso autógeno como o melhor tipo de material possível, sendo uma referência para a avaliação da eficiência dos demais tipos de implantes. (ALBREKTSSON 1980, FREIDLANDER 1987, MERKX et al 2003). O osso autógeno apresenta características biológicas e estruturais ideais, que inclui a capacidade de se revascularizar. É o único biomaterial que apresenta as quatro características desejáveis: osteointegração, osteocondução, osteoindução e osteogênese (ERBE 2001), que são definidas abaixo:

1. *Osteointegração*: Capacidade de unir-se quimicamente ao osso, sem interposição de tecido fibroso.
2. *Osteocondução*: Capacidade de permitir o crescimento ósseo sobre sua superfície.
3. *Osteoindução*: Capacidade de induzir a diferenciação de células indiferenciadas do tecido circunvizinho em células ósseas.
4. *Osteogênese*: formação de novo osso por células osteoblásticas presentes no material.

Infelizmente o emprego dos enxertos ósseos autógenos é limitado quando se trata de defeitos segmentares extensos, havendo relatos de mais de 50% de falhas nestas situações (ENNEKING et al.1980). Outro problema relacionado à utilização do enxerto ósseo autógeno, segundo BURCHARDT (1983), consiste na dificuldade de sua obtenção, exigindo intervenção cirúrgica paralela, que acarreta aumento da morbidade pós-operatória e enfraquecimento do leito doador.

As contra-indicações mais comuns para os materiais homogêneo e xenogêneo são as possíveis reações a antígenos que eles possam conter, e a possibilidade de transmissão de microorganismos; ambas as contra-indicações, cabe destacar, podem ser eliminadas por meio de processamentos adequados (ERBE et al. 2001).

Embora os materiais homogêneos estejam prontamente disponíveis em bancos de ossos, eliminando o problema de dor e queda da resistência da região doadora, um dos principais problemas relacionados ao emprego deste tipo de material é que ele se comporta como um grande espaço morto ou como um corpo estranho, que não é protegido pelo sistema imunológico (FREDERICK-LORD *et al.* 1988). Os autores citados avaliaram 283 pacientes submetidos tratamento com implantes homogêneos, e relataram que a incidência de infecções chegava a 12% destes.

Assim, uma excelente alternativa é a utilização de adequados biomateriais sintéticos que estimulem, ou que pelo menos criem condições para a neoformação óssea e que, além disso, não apresentem os problemas dos materiais acima descritos. Isso desencadeou o aumento do interesse, e o conseqüente crescimento na pesquisa dessa categoria de biomaterial.

Os biomateriais sintéticos podem ser metálicos, cerâmicos, poliméricos ou compósitos. Devem apresentar características específicas para cada tipo de função desejada, e não devem: sofrer modificações físico-químicas durante a esterilização, produzir radicais livres, ser cancerígeno, incitar reações inflamatórias, ou qualquer outro sinal de rejeição (BUDDY 1996).

2.2.1 BIOCERÂMICAS

No caso de cirurgias odontológicas, os biomateriais aloplásticos mais populares para aumento do volume ósseo são os cerâmicos, e podem diferir grandemente entre si, principalmente quanto à composição e quanto ao tipo de interface com o tecido vivo. Muitos materiais dessa classe tem-se destacado por apresentar boas propriedades mecânicas, alta estabilidade química e biocompatibilidade. As cerâmicas empregadas nesses casos são denominadas biocerâmicas, podendo ser bioativas (HAp, biovidro), biotoleráveis (alumina, zircônia) ou absorvíveis (fosfatos de cálcio) (HENCH, 1998).

A alumina é um exemplo de cerâmica biotolerável. Ela pode ser fabricada densa ou porosa. É utilizada principalmente na confecção de implantes dentais e próteses de quadril devido à sua grande resistência mecânica, ao desgaste e à corrosão. Quando utilizada como próteses de quadril, ela é adaptada ao tecido ósseo no ato cirúrgico por pressão, e esse tipo de fixação é chamado de fixação morfológica. Também é largamente utilizada fora do contexto de cirurgias ósseas, em próteses dentais (RATNER, 1996).

Semelhante à alumina, a zircônia também é um material biotolerável disponível. Apresenta boa tenacidade à fratura e boa resistência à flexão, entretanto apresenta também baixo módulo de elasticidade e maior taxa de desgaste.

Outro exemplo de material aloplástico cerâmico é a categoria dos biovidros. Após a implantação, esse tipo de biomaterial sofre modificação superficial, dando origem a uma camada de hidroxiapatita carbonatada, bioativa, que se liga diretamente ao osso. Esse tipo de fixação é denominado fixação bioativa. (RATNER, 1996).

2.2.2 – FOSFATOS DE CÁLCIO

Levando-se em conta o caso de correção de defeitos ósseos, sobretudo aqueles que dizem respeito à odontologia, os biomateriais aloplásticos mais

utilizados são os cerâmicos à base de fosfato de cálcio. Diferentes fases podem ser utilizadas, dependendo da taxa de absorção desejada.

Os biomateriais a base de fosfato de cálcio disponíveis comercialmente diferem na origem (natural ou sintético), na composição (hidroxiapatita, beta fosfato tricálcico, etc), em sua forma física (grânulos, blocos, pastas, revestimentos de implantes metálicos e compósitos). A maioria apresenta propriedades desejáveis para serem utilizados como substitutos ósseos, devido à sua bioatividade, capacidade de formar uma interface muito resistente com o osso, e osteocondutividade.

Dentre os biomateriais a base de fosfato de cálcio, dois são os mais utilizados: a hidroxiapatita (HAp) e o beta fosfato tricálcico (β -TCP). Na área odontológica podem ser utilizados em casos de aumento da crista alveolar, defeitos periodontais, próteses buco-maxilo-faciais, preenchimento de cavidades ósseas após remoções de cistos, etc. (CUNNINGHAM, 2005).

Esse tipo de biomaterial pode ser absorvido por meio de dois mecanismos: dissolução e fagocitose (ou mediação celular) (ERBE 2001). No caso de dissolução, que depende do material à base de fosfato de cálcio sendo utilizado, de sua solubilidade e também do pH do meio, novas fases podem se formar como, por exemplo, o fosfato de cálcio amorfo e o di fosfato de cálcio di-hidratado. Já a fagocitose é parte do processo biológico da resposta imunológica, realizado por células chamadas macrófagos. A fagocitose é a captura de um material particulado ou de microorganismos pelos macrófagos.

A taxa de absorção desses materiais pelo organismo também depende de fatores intrínsecos. Por exemplo, quanto maior a área de superfície específica, maior a taxa de absorção. Inversamente, à medida que a cristalinidade do material aumenta, sua taxa de absorção diminui. Outros fatores, como a substituição de íons Cálcio por íons Flúor no caso da HAp, e o acréscimo de íons Magnésio ao β -TCP também contribuem para o aumento da taxa de absorção.

Como já foi discutido anteriormente, se a absorção do material cerâmico for rápida demais, ultrapassando a velocidade de neoformação óssea, haverá grande chance de ocorrer fibrose, e não formação de novo osso.

Vale a pena ressaltar a diferença na taxa de absorção entre β -TCP e a HAp. O primeiro é absorvido mais rapidamente que o segundo, que praticamente não sofre absorção. A utilização de uma mistura bifásica, contendo essas duas biocerâmicas é uma interessante saída que vem sendo reportada para o controle da taxa de absorção. Quanto maior a proporção de β -TCP, mais absorvível será a mistura cerâmica.

Além disso, esses biomateriais, quando porosos, são capazes de ligarem-se e transportarem proteínas morfogenéticas ósseas endógenas. De forma similar, podem agir como veículos transportadores de fármacos (LeGEROS 2002, LeGEROS 2003). A presença de tais fármacos incorporados ao material cerâmico não é fundamental, porém são procedimentos que visam o aperfeiçoamento das características dessa categoria de biomateriais. Nesse caso, as cerâmicas bifásicas de HAp e β -TCP apresentam uma vantagem, já que a fase HAp, mais estável, torna-se responsável pela manutenção da integridade física do implante, enquanto que a fase β -TCP, absorvível, atua como veículo, levando a substância incorporada até os sítios ativos, seja pela circulação sanguínea, seja pela difusão pelos tecidos adjacentes (RIBEIRO 2003).

2.2.3- HIDROXIAPATITA

A HAp é um material bioativo osteocondutor e pode ser natural ou sintética. Ela permite o crescimento ósseo por meio de aposição do osso adjacente, e para isso é necessário que haja células mesenquimais primitivas que irão se diferenciar em células osteogênicas (ALBREKTSSON e JOHANSSON 2001). Em sua presença, novo osso forma-se sem evidências de reações teciduais indesejáveis, o que atesta sua biocompatibilidade. Pode ser encontrada comercialmente em diversas texturas e tamanhos de partículas, por exemplo, em blocos ou grânulos, podendo ser porosos ou densos (MISCH 2000).

Uma de suas características, já descrita anteriormente, é que a HAp é resistente à absorção pelo organismo, que ocorre numa taxa de 1 a 2% por ano (CONSTANTINO 1994).

Em um estudo com ovelhas, HAAS et al (2003) descobriram em testes mecânicos de tração que a HAp utilizada em elevações sinusais aumentou significativamente a resistência à tração de implantes quando comparada a regiões que não foram submetidas a técnicas de aumento ósseo. Entretanto, esses valores eram menores em comparação aos valores obtidos com enxertos autógenos.

Em outro estudo também com ovelhas, os mesmos autores acima, em 2002, avaliaram o efeito de diferentes biomateriais na taxa de contato entre osso e implante numa região de elevação sinusal. Utilizaram três grupos: grupo controle (sem material), HAp e osso autógeno. A conclusão foi de que ambos os grupos (HAp e osso autógeno) apresentaram uma maior taxa de contato osso-implante em comparação ao grupo controle.

HALLMAN, SENNERBY E LUNDGREN, em 2002, relataram não haver diferenças significativas na quantidade de osso neoformado quando utilizaram osso autógeno ou uma mistura de osso autógeno e HAp bovina numa proporção de 20:80 por peso.

2.2.4 – BETA FOSTATO TRICÁLCICO

Assim como a HAp, o beta fosfato tricálcico (β -TCP) também é um material osteocondutor. O β -TCP foi desenvolvido na década de setenta, a partir da mistura de diferentes fosfatos de cálcio comerciais e pode ser fabricado com poros interconectados. Essas propriedades permitem a migração de nutrientes, fatores de crescimento e células osteogênicas entre os poros da infra-estrutura de β -TCP. Dessa forma ocorre tanto neoformação óssea como também a absorção do implante (LINOVITZ 2002).

As características de porosidade também são úteis para sua capacidade de agir como veículo de transporte de fármacos. Além disso, algumas características podem estimular os mecanismos de reparo de forma a promover a regeneração do tecido ósseo. Entre essas características têm-se a presença de uma rede de

poros interconectados, com dimensões suficientemente grandes para que células e vasos sanguíneos possam penetrar (JONES 2009).

De acordo com LeGEROS (1991), o β -TCP apresenta 39% em peso de Cálcio e 20% em peso de Fósforo, similar ao conteúdo mineral do osso. O mesmo autor demonstra em 2003, o uso potencial de cerâmicas de β -TCP como substratos para técnicas de regeneração tecidual e como veículo de fármacos. A absorção do β -TCP é bem mais rápida e se dá via dissolução após um período de 6 a 18 meses. Infelizmente, a substituição do β -TCP por osso não ocorre de maneira uniforme, ou seja, pode haver menor volume ósseo do que o volume de β -TCP absorvido. Devido a isso, e conforme discutido anteriormente, o uso desse material tem sido associado a outros materiais menos absorvíveis, como a HAp (MOORE 2001).

FUGAZZOTO et al, em 1997, estudaram a resposta de diferentes materiais, entre eles o β -TCP, com a utilização de membranas, em 1503 implantes com deiscências ou fenestrados (exposição parcial do implante). Obteve grande taxa de sucesso no recobrimento por tecido ósseo das espiras dos implantes previamente expostas, com a utilização do β -TCP como material.

Em um estudo realizado por ZERBO et al. 2001, envolvendo o tratamento de maxilas atróficas, oito meses depois de realizada a cirurgia, a maior parte dos grânulos de β -TCP foi absorvida. Osso e osteóides foram encontrados em contato com os grânulos remanescentes. Não foram encontrados sinais de inflamação. Os autores concluíram que o β -TCP é um bom material para implante na região sinusal maxilar.

Em 2004, ARTZI et al. compararam a eficiência do β -TCP (material aloplástico) e do osso bovino inorgânico (implante xenógeno), em diferentes períodos de cicatrização, em cães. Perceberam que houve completa regeneração óssea em todos os defeitos, provando que os dois materiais são biocompatíveis. Entretanto, após 24 meses, todas as partículas de β -TCP tinham sido absorvidas, pelo organismo dos animais, enquanto as partículas de osso bovino ainda ocupavam uma grande área da região submetida à cirurgia, sem sinais de absorção.

GOSAIN, também em 2004, avaliou diferentes proporções de HAp e β -TCP como material em um estudo de defeitos ósseos críticos na calvária de ovelhas adultas e observou uma relação inversamente proporcional entre a concentração de HAp na mistura e a quantidade de osso neoformado. O autor concluiu que não houve aumento de osso significativo quando utilizou HAp pura e acredita que a introdução de macroporos no biomaterial possa melhorar a neoformação óssea, assim como o aumento da proporção de um componente de rápida absorção, como o β -TCP.

2.3 - INFLAMAÇÃO/REPARAÇÃO

Como já foi citado anteriormente, se a absorção do material cerâmico pelo organismo for rápida demais, a ponto de ultrapassar a velocidade de neoformação óssea, haverá grande chance de ocorrer fibrose, e não formação de novo osso.

Outra questão importante quando se trata de neoformação óssea refere-se ao metabolismo ósseo reparador. Sempre que houver agressão ao tecido, inclusive no caso de qualquer procedimento cirúrgico, ocorrerá o fenômeno da inflamação. A resposta inflamatória desencadeia uma série complexa de eventos que, tanto quanto possível, cicatriza e/ou regenera o tecido lesado. O reparo começa durante a fase ativa da inflamação, porém atinge o seu término após a influência lesiva ter sido neutralizada (ROBBINS, 1991).

Entretanto, há casos em que o processo inflamatório torna-se exacerbado, levando a uma produção excessiva de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROS) decorrente do brusco aumento do metabolismo celular, o que aumenta o estresse oxidativo dos tecidos circunvizinhos.

A produção descontrolada dos radicais livres pode provocar inúmeras patologias como: arteriosclerose, inflamações crônicas, doenças degenerativas e câncer. Muitos são os alvos desses radicais livres como, por exemplo, as proteínas, os lipídeos e os ácidos nucleicos. Os primeiros podem se denaturar ou simplesmente perder a sua função. Isso pode ocorrer, pois o DNA danificado pode produzir falhas na transcrição, provocando uma mutação ou, conforme a

intensidade da agressão, inviabilizar a vida da célula, o que finalizaria em morte por apoptose ou por necrose. O ataque dos radicais livres aos lipídios tem uma natureza propagante, levando a uma degeneração da membrana celular, chamada de peroxidação lipídica (POMPÉIA, 2003).

Um biomaterial para aumento ósseo, entre outras características, deve possuir a capacidade de controlar, ou pelo menos mediar a reação inflamatória e o conseqüente estresse oxidativo que, como foi dito anteriormente, são situações normais em qualquer tecido lesado, e que podem ser danosas quando exacerbadas. Novamente, esse estresse oxidativo é decorrente do aumento do metabolismo celular durante a fase de cicatrização e reparação, e pode acarretar uma série de eventos biológicos indesejáveis e retardadores no processo cicatricial e/ou reparador, podendo até mesmo comprometê-los.

Assim, um biomaterial que mediasse a resposta inflamatória, melhorando tanto a cicatrização como a quantidade de neoformação óssea no local da cirurgia, seria um ótimo aliado nos casos em que a utilização de enxerto autógeno é dificultada ou contra-indicada.

É importante salientar que, devido ao aumento do metabolismo celular durante a cicatrização, ocorre uma diminuição do pH na região afetada. A absorção por dissolução, citada anteriormente, depende do pH adjacente, e assim, quanto menor o pH, maior a taxa de absorção de determinados tipos de implantes cerâmicos, como o β -TCP (LeGEROS 1988). Como discutido anteriormente, se a absorção do implante cerâmico for rápida demais, a ponto de ultrapassar a velocidade de neoformação óssea, haverá grande chance de ocorrer fibrose, e não formação de novo osso (SALLES, 2007).

É possível perceber, dessa forma, que a queda no pH pode influir de maneira negativa na absorção de certos materiais cerâmicos, como o β -TCP, tornando-a acelerada, o que não é desejável, já que aumenta o risco de formação de tecido fibrótico. Além disso, o processo inflamatório, quando exacerbado, é danoso aos tecidos circunvizinhos, por causa do estresse oxidativo.

Diante do exposto, pode-se notar a importância de se buscar mecanismos de controle e modulação do processo inflamatório para que ocorra boa reparação óssea. Tendo esse problema em vista, SALLES (2001) desenvolveu um composto

vitamínico cuja função primordial é a mediação da inflamação, controlando o estresse oxidativo e incentivando a proteção de membrana das células da região submetida à cirurgia. Um sítio cirúrgico com inflamação mediada melhora as condições para a cicatrização óssea. O composto desenvolvido pelo autor tem em sua composição 15% de alfa-tocoferol (vitamina E), 10% de complexo B em pó, 5% de carbonato de magnésio, 5% de sulfato de zinco e 15% de ácido glutâmico. (nº Prot. Pat.– 004346 / depósito nº – POI-105259-4).

Em 2001, o autor avaliou a resposta óssea de cães frente à instalação de implantes de titânio (Ti) associados à poliuretana de mamona (poliol), contendo o composto vitamínico. Ao fim do estudo, o autor concluiu que, nos grupos em que utilizou o composto vitamínico, as reações do tecido adjacente ao poliol e implantes de Ti correspondentes foram menos agressivas, tornando-os mais toleráveis aos tecidos periféricos. Constatou também que ocorreu uma diminuição na resposta inflamatória quando da presença do composto. Com isso houve um aumento significativo da neoformação óssea local, principalmente na região supracortical.

ALLEGRINI, em 2003, avaliou a resposta óssea de tíbias de coelhos frente à implantação do complexo vitamínico e HAp com diferentes tipos de superfície de implantes de Ti, e concluiu que não houve diferença significativa em relação à quantidade de osso neoformado no grupo experimental quando comparados aos grupos em que houve apenas implantação de HAp. Porém, nesse mesmo trabalho, ficou evidente o processo acelerado de deposição óssea no caso dos grupos que foram aplicados com o complexo vitamínico e HAp em comparação aos implantados apenas com HAp.

SALLES, em 2007, em um estudo imunoistoquímico, concluiu que nos grupos em que utilizou o complexo vitamínico foi possível verificar estatisticamente uma redução significativa da imunorreatividade positiva para o fator nuclear kapa-beta (NF-kB). O fator de transcrição kapa-beta é o precursor de um conjunto de fatores de transcrição envolvidos na promoção de expressão de mais de 150 genes participantes de uma ampla variedade de processos biológicos como o de resposta imune, inflamação e absorção óssea. Segundo seu

estudo, devido à diminuição da imunorreatividade, comprova-se a efetiva proteção na manutenção do equilíbrio redox celular devido ao composto vitamínico.

3. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho podem ser sistematizados como segue:

1. Avaliar a regeneração óssea de sítios cirúrgicos em fêmures de ratos Wistar submetidos à implantação de β -TCP puro e da mistura de HAp e β -TCP, na proporção de 60:40 em massa.
2. Acrescentar aos materiais de implante o composto vitamínico desenvolvido por Salles (2001), na proporção de 35% em relação à massa do material cerâmico, comparando a resposta óssea dos diversos grupos.
3. Analisar possíveis diferenças quanto à velocidade e qualidade de neoformação óssea entre os grupos por microscopia de luz e de fluorescência.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Para este estudo foram utilizadas duas composições diferentes de fosfatos de cálcio sintéticos: beta fosfato tricálcico (β -TCP) puro, e uma mistura de hidroxiapatita (HAp) e de β -TCP, na proporção de 60:40 em massa, ambos fabricados pela Degradable Solutions AG (Schlieren, Suíça) e cedidos pela Ultradent Products Inc. (Salt Lake City, EUA). Além disso, também foi utilizado o composto desenvolvido por SALLES (2001), com composição de 15% de alfa-tocoferol (vitamina E), 10% de complexo B em pó, 5% de carbonato de magnésio, 5% de sulfato de zinco e 15% de ácido glutâmico. (nº Prot. Pat.– 004346 / depósito nº – POI-105259-4) e colágeno bovino da Extratus (Mairiporã, Brasil).

4.1 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

Amostras das duas diferentes composições utilizadas neste estudo (β -TCP puro, e a mistura bifásica HAp / β -TCP, que serão designadas neste texto como β -TCP e MB) foram submetidas à difração de raios-X para determinação das fases cristalinas presentes, identificando-se os picos dos difratogramas obtidos por comparação com os padrões da JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards).

4.2 – PREPARO DAS AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Amostras das duas diferentes composições utilizadas foram também observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) podendo-se avaliar o tamanho e morfologia tanto dos aglomerados de partículas, como também das partículas individuais. Para isso as amostras foram depositadas sobre uma fita adesiva dupla-face aderida ao porta-amostra do MEV, sendo recobertas por uma fina camada de ouro, por meio da técnica de “sputtering”.

4.3 – EXPERIMENTAÇÃO IN VIVO

4.3.1 – PREPARO DOS CORPOS DE PROVA

Para a produção dos corpos de prova para implante, além das duas composições cerâmicas, (β -TCP e MB), foi utilizado também colágeno bovino (cuja função é a de aglutinante ou ligante), e o complexo vitamínico (composto de 15% de alfa-tocoferol (vitamina E), 10% de complexo B em pó, 5% de carbonato de magnésio, 5% de sulfato de zinco e 15% de ácido glutâmico).

As proporções em que esses componentes foram misturados são apresentadas na Tabela 1, que indica também a especificação dos 5 grupos experimentais nos quais os animais foram divididos. Observa-se que os animais do Grupo I, de controle, não tiveram nenhum material implantado.

Os aglomerados dos materiais cerâmicos foram triturados com auxílio de um almofariz e pistilo com a finalidade de fraturá-los em aglomerados menores, além de facilitar a mistura com os demais componentes (colágeno bovino e/ou composto vitamínico).

Tabela 1. Composição dos materiais de implante e os respectivos grupos experimentais.

	Especificação	Mat. Cerâmico	Composto	Colágeno
Grupo I	Controle	--	--	--
Grupo II	β -TCP+Composto	2.0g β -TCP (55%)	0,8g (22%)	0,8g (22%)
Grupo III	MB+Composto	2.0g MB (55%)	0,8g (22%)	0,8g (22%)
Grupo IV	β -TCP	2.0g β -TCP (70%)	--	0,8g (30%)
Grupo V	MB	2.0g MB (70%)	--	0,8g (30%)

Os componentes, conforme as proporções da tabela 1, foram misturados em almofariz, com a adição de gotas de água, de modo a se obter uma mistura na forma de pasta com consistência e plasticidade adequadas à conformação das peças de implante. A pasta resultante foi então aplicada, com o auxílio de uma espátula, de modo a preencher a cavidade cilíndrica (2 mm de diâmetro e 30 mm de altura) de um molde bipartido, confeccionado para este fim (Figuras 1 e 2). O corpo cilíndrico conformado, ainda dentro do molde, foi mantido por 10 minutos entre 2 e 6° C, em um refrigerador, para que o colágeno gelificasse, fornecendo resistência mecânica suficiente para que pudesse ser seccionado com estilete, em diversos cilindros com altura de 5 mm, que foram removidos do molde e acondicionados em frascos separados individuais. Todo material a implantar utilizado foi esterilizado no CTRS/IPEN com uma fonte de cobalto 60 (Gammacell-220 Cobalt-60 Gamma Irradiator, Atomic Energy of Canada, Commercial Products, Ottawa, Canada). A dose de radiação total foi de 25 kGy.

Figura 1: Molde bipartido metálico utilizado para a conformação dos pinos a serem implantados.

Figura 2: Implante cerâmico após conformação, gelificação e secagem.

4.3.2 – CIRURGIA E APLICAÇÃO DOS MARCADORES ÓSSEOS

A experimentação animal seguiu a norma internacional para utilização de animais em experimentos, e foi aprovada pela Comissão de Ética Experimental do IPEN (ANEXO 7.1).

Foram utilizadas trinta ratas adultas, com aproximadamente 3 meses de idade, da raça Wistar e com peso aproximado de 250 a 300 g. Os animais foram mantidos no biotério do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares e foram divididos aleatoriamente em cinco grupos, (seis animais para cada grupo) de acordo com o apresentado na Tabela 1.

Estudos como o de PARKER (2007) em humanos e DAVID (2006) em ratos comprovam que pacientes do sexo feminino apresentam um maior risco de comprometimento na regeneração óssea.

Além das diferenças hormonais, a razão da diferença na regeneração óssea entre os gêneros permanece desconhecida. Um estudo *in vitro* comparativo entre ratos e ratas, revelou um número de células tronco mesenquimais inferior nas fêmeas quando comparado com os machos, o que pode ser a causa de sua capacidade regenerativa diminuída (STRUBE et al, 2009).

Sabendo que a menor capacidade óssea regenerativa é uma condição normal em fêmeas, neste estudo foram utilizados animais de apenas um sexo de forma a isolar possíveis diferenças no reparo ósseo entre os dois gêneros.

Os fármacos utilizados para a obtenção da anestesia dos animais foram: Rompun i.m. (Cloridrato de (2–2,6-xilidino) - 5,6 - dihidro - 4H - 1,3 – tiazina), sedativo analgésico e relaxante muscular em concentração de 5mg/kg, e Ketalar i.m. (Cloridrato de Ketamina), anestésico geral em concentração de 35mg/kg. Com essa proporção de dosagem obteve-se uma sedação profunda, por aproximadamente 90 a 120 minutos. De forma complementar, utilizou-se também a lidocaína (anestésico local) a 3% com epinefrina, com apresentação em tubetes de 1,8ml, com a finalidade de promover uma melhor anestesia no local e uma eficaz hemostasia, facilitando os procedimentos operatórios.

Os animais foram isolados em gaiolas distintas, de acordo com o grupo experimental a que pertenciam e receberam sem restrições, água e ração seca adequada (NUVILAB) sob temperatura ambiente constante de 21°C.

O sítio cirúrgico escolhido foi a porção proximal dos fêmures esquerdo e direito de cada animal (Figura 3). A região foi tricotomizada e feita anti-sepsia com gluconato de clorexidina a 2% e iodopovidona (Figura 3). Após a anti-sepsia, foi realizada exérese da pele expondo as fáscias musculares, com bisturi (nº 5) munido de lâmina 15. A exposição do fêmur foi obtida com o rebatimento dos músculos vasto lateral e bíceps femoral até o periósteo, que foi deslocado com objetivo de proporcionar o acesso e visão à área operatória (Figura 4) (GOIA, 2008).

Figura 3: Região cirúrgica da rata da raça Wistar, após tricotomização e anti-sepsia.

Figura 4: Leito cirúrgico após primeira incisão, permitindo a visualização da fáscia muscular subjacente.

Defeitos ósseos com 2mm de diâmetro por aproximadamente 3 mm de profundidade foram criados com o auxílio de brocas acopladas a um contra-ângulo com redução de 16:1, movido por um motor elétrico com velocidade de

1.000 rpm e 30 N/cm² de torque, sob constante irrigação (solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9%) (Figura 5). Com auxílio de espátulas, o implante foi colocado em cada um dos fêmures das ratas. (Figura 6) Os animais do grupo controle (I) não receberam qualquer material. Cada fêmur dos ratos dos grupos experimentais foi capaz de acomodar apenas um implante. Dessa forma, ao final do experimento, foram obtidas doze amostras de cada grupo.

Figura 5: Perfuração do fêmur com broca de 2 mm de diâmetro.

Figura 6: Inserção do implante cerâmico no defeito ósseo femoral.

Após a inserção dos materiais, foi realizada a sutura muscular com um ponto simples separado e a sutura da pele com ponto simples, utilizando fios de sutura mononylon agulhado (3/8 CR - 3,0cm). A assepsia, após o procedimento de sutura, foi feita com gluconato de clorexidina a 0,12% (GOIA, 2008).

Durante o período pós-operatório dos animais, foram aplicados marcadores de deposição óssea que atuam sobre a apatita óssea, com o intuito de evidenciar os períodos de deposição do novo osso (HAAS *et al.*, 1998). Foram administrados diferentes corantes em diferentes períodos de tempo: imediatamente após a cirurgia, foi administrada a OXITETRACICLINA (Terramicina®, Pfizer, Brasil)– 25mg/Kg associada ao tampão 60mg/Kg de fosfato de sódio dibásico anidro (NaHPO_4) diluídos em 3ml de soro sob agitação ultrassônica. A aplicação deste corante nessa etapa traz um benefício, já que é bacteriostático e foi aplicado em dose de ataque suficiente para os animais logo após a cirurgia. Na primeira semana após a cirurgia, foi repetida a dosagem realizada inicialmente, no pós operatório (OXITETRACICLINA [Terramicina®, Pfizer, Brasil]– 25mg/Kg associado ao tampão 60mg/Kg de fosfato de sódio dibásico anidro [NaHPO_4] diluídos em 3ml de soro sob agitação ultrassônica).

Na segunda semana, foi administrada a CALCEÍNA (Vetec Química, RJ, Brasil) – 20mg/Kg associado ao tampão 60mg/Kg de fosfato de sódio dibásico anidro [NaHPO_4] diluídos em 3ml de soro, também sob agitação ultrassônica.

Finalmente, na terceira semana, aplicou-se a ALIZARINA (Vetec Química, RJ, Brasil) – 30mg/kg associado ao tampão 60mg/Kg de fosfato de sódio dibásico anidro (NaHPO_4) diluídos em 3ml de soro, sob agitação ultrassônica. Este protocolo é uma adaptação para ratos, realizada por PABLOS (2003), do protocolo proposto e utilizado no Programa de Pós-Graduação de Anatomia Funcional: Estrutura e Ultra-Estrutura do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (KÖNIG *et al* 1998; TAKUMIDA *et al* 1997) e está resumido na Tabela 2.

Tabela 2. Tempo de aplicação dos marcadores ósseos com as respectivas dosagens para ratos.

Tempo após intervenção cirúrgica	Marcador	Dose por kg do animal
Imediatamente	Oxitetraciclina	25mg
7 dias	Oxitetraciclina	25mg
14 dias	Calceína	20mg
21 dias	Alizarina	30mg
28 dias	Sacrifício	--

Assim, após o período de cicatrização de quatro semanas, os animais foram sacrificados em câmara de gás carbônico, e tiveram seus fêmures removidos para tratamento de inclusão em resina e posterior confecção de lâminas, visando a visualização microscópica. Após a dissecação dos tecidos moles, os blocos ósseos e os implantes foram removidos e, posteriormente, as amostras foram fixadas, sendo imersas em solução neutra de formalina a 4,0%, durante um período de 30 (trinta) dias.

4.3.3 – PREPARO DAS AMOSTRAS PARA OBSERVAÇÃO EM MICROSCÓPIO

Após o período de imersão em formalina, as amostras foram lavadas em água corrente durante 12 horas e desidratadas por meio de uma série de etanol absoluto e água destilada, conforme a tabela 3.

Após a desidratação, as amostras passaram pela etapa de inclusão com resina, que preenche todos os espaços vazios do corpo de prova, fornecendo a resistência mecânica para que o material possa ser manipulado nas etapas seguintes de preparação para observação microscópica, sem que sofram degradação. Para tanto, as amostras foram agrupadas e imersas em recipientes próprios para a inclusão, de modo a permanecerem na parte profunda destes e

com o longo eixo disposto paralelamente ao plano horizontal. Os recipientes continham resina plástica Technovit 7200 VCL (Kultzer & Co, Wehrhein, Alemanha) com a inclusão de 1% de BPO (peróxido de benzoíla) dissolvido em álcool absoluto (etanol) em diversas concentrações seriadas. A tabela 4 exibe os detalhes. De acordo com DONATH *et al.*, (1992) a seqüência e o tempo de imersão nas diferentes soluções permite a substituição periódica do álcool etílico pela resina glicolmetacrilato.

Tabela 3 – Sequência de misturas etanol/água destilada utilizadas para a desidratação das amostras com os respectivos tempos de desidratação.

Sequência	Mistura etanol/H₂O (% em volume)	Tempo de desidratação (em horas)
1	50 / 50	24
2	70 / 30	48
3	80 / 20	24
4	90 / 10	72
5	96 / 4	72
6	100 / 0	72
7	100 / 0	48

Tabela 4 – Condições empregadas para a etapa de embebição em resina

Seqüência	Mistura Tecnovit 7200 VLC +1% de BPO/Etanol (% em volume)	Tempo de embebição (em horas)
1	30/70	24 horas
2	50/50	24 horas
3	70/30	24 horas
4	100/0	48 horas

Ao final da seqüência de embebição, as amostras foram colocadas em formas de inclusão, preenchidas com glicolmetacrilato Technovit® 7200 VLC a 100%. A polimerização foi obtida com um aparelho de fotopolimerizador calibrado com tempos de polimerização adequados às normas do fabricante (20 minutos). Ao final do processo, formou-se uma película viscosa sobre a superfície do bloco, devido à inibição da polimerização pelo oxigênio da atmosfera.

4.3.4 – PREPARO PARA A HISTOLOGIA

O processamento histológico foi executado para que se pudesse analisar as amostras obtidas pelos métodos de fluorescência e de campo claro com corante tricrômico de Masson e hematoxilina e eosina.

Dessa forma, o conjunto osso-implante embutido em resina foi fixado com o auxílio de um porta-amostra em uma máquina de corte (Isomet 2000) de modo que o disco diamantado com espessura de 0,2 mm ficasse posicionado transversalmente ao longo eixo do osso. Foi utilizada uma carga de 100g a uma velocidade de corte de 2.000 RPM. Nos cortes obtidos foi possível observar toda a área cirúrgica circunferencial. Foram obtidas não mais do que duas lâminas por fêmur. Cada corte teve aproximadamente 600 µm de espessura e foram colados individualmente em lâminas de acrílico utilizando uma gota de cianoacrilato (SuperBonder®, Loctite, Brasil).

O polimento foi obtido com a utilização de uma seqüência de lixas de granulação 1.200, 2.400 e 4.000 mesh, sob pressão constante em uma máquina de polimento, modelo Panambra DP9U. O objetivo era o de se obter lâminas com superfícies polidas e de espessura de 20-30 µm, para que fossem examinadas por microscopia óptica de luz transmitida.

Após esses procedimentos, as lâminas foram visualizadas sob microscopia óptica de fluorescência. O microscópio óptico utilizado pertence ao Laboratório do Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, modelo Carl Zeiss Axioskop 40. Foram utilizados os conjuntos de filtro 9 (excitação 450-490nm, emissão 515nm) e 14 (excitação 510-560nm, emissão

590nm). Uma descrição mais detalhada da técnica de fluorescência, e suas vantagens e desvantagens encontra-se na seção 5.4 (Microscopia de fluorescência).

Lâminas representativas de cada grupo foram coradas pelos métodos de coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM), seguindo os protocolos descritos no Anexo I. As lâminas foram então analisadas por microscopia óptica de luz transmitida.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Nas figuras 7 e 8 são apresentados os difratogramas de raios-X (DRX) das duas diferentes composições (β -TCP e MB) estudadas. Comparando-se os picos encontrados nos dois difratogramas com os padrões cristalográficos da JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards).

Figura 7: DRX da amostra bifásica MB, indicando picos referentes à HAp e ao β -TCP.

Pode-se constatar pela figura 7 que todos os picos encontrados no difratograma da amostra bifásica MB correspondem aos picos referentes à HAp (em azul) ou ao β -TCP (em vermelho), de acordo com os padrões da JCPDS. Já

na figura 8 tem-se o difratograma da amostra β -TCP, cujos picos coincidem, pelo JCPDS, com àqueles identificados como sendo desta fase.

Figura 8: DRX da amostra de β -TCP.

A figura 8 representa os picos da amostra de β -TCP. Pelo padrão da JCPDS em vermelho, é possível perceber a correspondência aos picos do β -TCP.

5.2 – ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As micrografias dos grânulos das composições β -TCP e MB são apresentadas na figura 9.

Figura 9: Grânulos de β -TCP (a) e grânulos de MB (b) observada por microscopia eletrônica de varredura.

Observa-se na figura 10 que a superfície do grânulo de β -TCP apresenta um empacotamento mais homogêneo e regular de partículas, com uma menor incidência de defeitos que os encontrados no grânulo de MB.

Figura 10: Superfície de grânulo de β -TCP (a) e de grânulo de MB (b) observada por microscopia eletrônica de varredura.

Observando-se os mesmos materiais em maior aumento (Figuras 10 e Figura 11), pode-se observar que as partículas de β -TCP são maiores e mais

regulares que as de MB, o que certamente interferiu nas características do empacotamento dos grânulos. Como MB é uma mistura de β -TCP e HAp, por similaridade, poderia deduzir-se que as partículas maiores são de β -TCP e as menores de HAp. No entanto não se avançou em outros procedimentos e análises para que isso pudesse ou não ser confirmado.

(a)

(b)

Figura 11: Detalhes dos grânulos de β -TCP (a) e de MB (b) observadas por microscopia eletrônica de varredura.

(a)

(b)

Figura 12: Partículas de β -TCP (a) e de MB (b), após desaglomeração dos grânulos, observadas por microscopia eletrônica de varredura.

5.3 ANÁLISE DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA POR MICROSCOPIA DE LUZ

Para análise das lâminas histológicas sob microscopia óptica, foram realizadas duas técnicas de coloração: o Tricrômico de Masson (TM) e Hematoxilina e Eosina. O protocolo utilizado para as duas técnicas está descrito no Anexo 2.

5.3.1 COLORAÇÃO POR TRICRÔMICO DE MASSON

O termo tricrômico é um nome genérico que se refere a técnicas que utilizam três corantes visando à demonstração microscópica seletiva de diferentes tecidos. É uma técnica particularmente sensível para demonstrar a presença de fibras colágenas. Além disso, tecido muscular (não presente neste estudo), fibrina e eritrócitos também podem ser destacados por meio dessa técnica.

Apesar do fato da forte ligação entre corante e tecido ser de natureza eletrostática, os meios pelos quais é obtida a coloração sequencial por uma série de corantes aniônicos estão relacionados com a estrutura física tanto do corante como do tecido. A regra geral nesse tipo de coloração é a de que corantes de maior peso molecular irão penetrar e interagir com tecidos menos densos. Assim, os tecidos mais densos, menos permeáveis só conseguirão ser corados quando expostos a corantes de menor peso molecular (BANCROFT, 1996). No caso deste estudo, a sequência de corantes foi hematoxilina, seguida pela fucsina e por fim, a anilina azul (maiores detalhes podem ser encontrados no Anexo 2). Algumas técnicas de tricrômico de Masson utilizam um corante chamada escarlata de Biebrich (mais avermelhado) na lugar da fucsina (magenta).

A anilina azul liga-se ao colágeno, o que justifica a cor azul tanto do osso neoformado, como do osso original, o que pode ser verificado nas micrografias a seguir.

No grupo controle, em que não houve colocação de implante cerâmico, é possível observar que ocorreu neoformação óssea na região cirúrgica, porém incompleta (Figura 13, seta escura). Esse fato fica patente quando se observa a

rarefação e relativa desorganização do tecido ósseo neoformado sobre a região da ferida cirúrgica, quando comparado ao restante do osso (Figura 14, seta escura). Pode-se constatar na região de cortical óssea (seta branca), a ocorrência de remodelações do osso, que está se adaptando às novas forças depois de agredido.

Com relação aos animais do grupo II, que receberam implantes de β -TCP com a adição do composto vitamínico, pode-se observar um crescimento ósseo mais intenso e organizado. (Figuras 15 a 17).

Figura 13: Corte transversal do fêmur de uma rata do Grupo I (controle) na região cirúrgica, após coloração com Tricrômico de Masson. A seta indica a neoformação óssea.

É possível visualizar o tecido ósseo crescendo justaposto aos grânulos cerâmicos, evidência de que ocorreu osteointegração e osteocondução (Figura 16, seta branca). É importante lembrar que a maior solubilidade do β -TCP favorece sua absorção pelo organismo. É possível constatar essa absorção do material cerâmico e sua substituição por tecido ósseo neoformado (Figura 17, seta branca).

Figura 14: Grupo I, coloração com Tricrômico de Masson. Rarefação e relativa desorganização do tecido ósseo neoformado sobre a região da ferida cirúrgica (seta escura). A seta branca demonstra a remodelação óssea frente às novas forças depois de agredido.

Figura 15: Corte transversal do fêmur de uma rata do Grupo II (β -TCP+composto) na região cirúrgica, após coloração com Tricrômico de Masson. O material escuro no centro da ferida cirúrgica é o implante cerâmico.

Figura 16: Grupo II, coloração com Tricrômico de Masson. A seta branca demonstra osteointegração e osteocondução.

Figura 17: Imagem em maior aumento do Grupo II apresentando evidências de absorção do material cerâmico e sua substituição por tecido ósseo neoformado (seta branca).

Ao compararmos as imagens obtidas a partir dos animais do Grupo II com as do Grupo III (Figuras 18 e 19), que receberam implantes de MB com a adição do composto vitamínico, observa-se que para os últimos o material cerâmico foi menos absorvido. Essa observação é coerente, já que MB possui 40% em massa de HAp, que é uma fase com menor taxa de absorção pelo organismo. Também neste caso é possível observar os fenômenos de osteointegração e osteocondução do osso neoformado em relação ao material implantado, sobretudo devido ao desvio que o osso cortical efetuou, guiando-se pela presença do material cerâmico (Figura 19, seta branca). Além disso, de forma similar aos casos anteriores, é possível visualizar neoformação óssea sobre áreas de absorção de material, que provavelmente ocorreram nas regiões do material cuja fase β -TCP, mais solúvel e absorvível, estava originalmente presente (seta escura).

As micrografias apresentadas nas Figuras 20 e 21 são referentes aos animais do grupo IV que receberam implantes de β -TCP, sem adição do composto vitamínico. Praticamente não é mais possível divisar o material cerâmico implantado. Além disso, observa-se uma neoformação óssea mais discreta (Figura 21). Este é um comportamento significativamente diferente do observado para os animais do Grupo II (Figuras 15 a 17), que tiveram como diferença, a incorporação do complexo vitamínico. Assim, é possível que a ausência do complexo vitamínico tenha acarretado uma reação inflamatória exacerbada para os animais do Grupo IV, o que por sua vez reduziu a taxa de neoformação óssea. Por outro lado, o aumento do pH local provocado pela inflamação, favorece a absorção mais rápida do β -TCP (LeGEROS 1988). Portanto, a ausência do complexo vitamínico possivelmente levou a uma maior inflamação, que ao aumentar o pH local, provocou uma maior taxa de absorção da cerâmica pelo organismo. Entretanto, isso não significou uma taxa de neoformação óssea mais rápida ou efetiva, como se poderia esperar. Ao contrário, a maior inflamação retardou a neoformação óssea.

Figura 18: Corte transversal do fêmur de animal do Grupo III (MB+composto) na região cirúrgica, após coloração com Tricrômico de Masson.

Figura 19: A seta branca indica região de osteointegração e osteocondução do osso neoformado em relação ao material implantado. A seta escura aponta região de absorção do material cerâmico, menos intensa que no grupo anterior. Grupo III, coloração com Tricrômico de Masson.

Figura 20: Micrografia de corte transversal do fêmur de animal do Grupo IV (β -TCP). Coloração com Tricrômico de Masson.

Figura 21: Micrografia anterior do Grupo IV (β -TCP) em maior aumento, onde quase não é mais possível divisar o material cerâmico implantado, com neoformação óssea mais discreta em relação ao Grupo II, que recebeu β -TCP e o composto vitamínico.

Finalmente, pelos resultados obtidos com os animais do Grupo V, que receberam implantes da mistura bifásica MB, sem adição do composto vitamínico, pode-se constatar de forma mais clara a integridade do material cerâmico (Figuras 22 e 23). De forma similar aos demais grupos, novamente é possível perceber a osteointegração e osteocondução sobre os materiais implantares, o que comprova a biocompatibilidade do material. Além disso, mesmo sem a presença do composto vitamínico, a fase HAp, menos absorvível, favoreceu a neoformação óssea, ao contrário do que ocorreu no Grupo IV, onde a presença de um material mais absorvível favoreceu a formação de tecido cicatricial.

A comparação das figuras 17 (Grupo II - β -TCP + composto vitamínico) e 21 (Grupo IV - β -TCP) indica que a presença do composto vitamínico favoreceu a neoformação óssea. De forma similar, ao compararmos as figuras 19 (Grupo III – MB + composto vitamínico) e 23 (Grupo V - MB), observa-se a melhor qualidade de cicatrização óssea no caso em que o composto foi utilizado em conjunto com o material cerâmico

5.3.2 COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA E EOSINA

A técnica de coloração por Hematoxilina e Eosina (HE) envolve a aplicação de um corante básico (hematoxilina), que colore estruturas basófilas de azul, e outro corante ácido à base de álcool, a eosina, que colore as estruturas eosinófilas em rosa claro.

No Grupo I, em que não houve implante de material cerâmico, é possível confirmar que ocorreu neoformação óssea na região cirúrgica, porém incompleta. Esse fato fica patente quando se observa a rarefação e relativa desorganização do tecido ósseo neoformado sobre a região da ferida cirúrgica, quando comparado ao restante do osso (Figura 24, seta branca).

Figura 22: Micrografia de corte transversal do fêmur de animal do Grupo V (MB).
Coloração com Tricrômico de Masson.

Figura 23: Osteointegração e osteocondução sobre os materiais implantares do Grupo V. Mesmo sem a presença do composto vitamínico, a fase HAp, menos absorvível favoreceu a neoformação óssea.

Figura 24: A seta branca destaca região de neoformação óssea incompleta no Grupo I (Controle). Coloração HE.

Nos demais grupos, que receberam implantes cerâmicos, é possível perceber a íntima relação entre tecido ósseo neoformado e material implantado. No caso do Grupo II, que recebeu implante de β -TCP e composto vitamínico, é possível perceber como grande parte do material cerâmico sofreu absorção e substituição por novo tecido ósseo (Figura 25). A figura 26, referente ao grupo IV (sem adição do complexo vitamínico), apresenta uma imagem semelhante, porém exibe menor regeneração óssea, o que sugere, concordando com a análise feita nas imagens coloridas por tricrômico de Masson, que a presença do composto vitamínico tenha exercido um efeito benéfico no processo reparador.

Com relação às análises das micrografias obtidas a partir dos animais dos grupos III (MB mais complexo vitamínico, Figura 27) e V (MB sem complexo vitamínico, Figura 28), de novo é possível verificar para ambos, a menor taxa de substituição óssea do material cerâmico implantado, quando comparados ao ocorrido com os grupos II e IV (β -TCP com e sem o complexo vitamínico, respectivamente). Tem-se neste caso, novamente, a menor absorção do material cerâmico pelo organismo, devido à presença da HAp. Quanto ao efeito da

presença ou não do composto vitamínico, na quantidade e qualidade da neoformação óssea, esta técnica de coloração não apresentou evidências significativas como as obtidas com a coloração de tricrômico de Masson. Entretanto, é possível distinguir novamente os fenômenos de osteointegração e osteocondução, devido às áreas de justaposição osso-implante.

Figura 25: Micrografia da região implantar do Grupo II (β -TCP+composto). Absorção de grande parte do material cerâmico e substituição por novo tecido ósseo. Coloração HE.

Figura 26: Menor regeneração óssea no Grupo IV (β -TCP) quando comparado ao Grupo II, sugerindo que a presença do composto vitamínico exerceu um efeito benéfico no processo reparador. Coloração HE.

Figura 27: Grupo III (MB mais complexo vitamínico). Menor taxa de substituição óssea do material cerâmico implantado, quando comparados ao ocorrido com os grupos II e IV. Coloração HE.

Figura 28: Grupo V (MB). Menor absorção do material cerâmico pelo organismo devido à presença da HAp.

5.4 ANÁLISE DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Conforme descrito na tabela 2 da seção Materiais e Métodos, os marcadores ósseos fluorescentes aplicados foram: oxitetraciclina imediatamente e após 1 semana da cirurgia, calceína após 2 semanas da cirurgia e alizarina após 3 semanas da cirurgia.

Um material é dito fluorescente quando os elétrons das últimas camadas dos átomos que o compõem são capazes de absorver uma quantidade de energia suficiente para promover uma excitação eletrônica. Essa energia deve ser proveniente de radiação eletromagnética de fontes externas e pode ou não estar na faixa da luz visível. Caso a fonte de energia não seja eletromagnética e sim mecânica, o processo é chamado de triboluminescência; caso a origem desta energia de excitação seja térmica, então o processo é chamado termoluminescência.

Ao receberem energia de radiação eletromagnética, e após serem promovidos a camadas eletrônicas mais energéticas, os elétrons de materiais fluorescentes emitem energia na forma de um fóton de menor energia ao retornar à sua posição original. O processo de excitação leva em torno de 10^{-15} segundos (1 femtossegundo), e a emissão, ao redor de 10^{-12} segundos (1 picossegundo). Quando esse relaxamento ocorre em tempos inferiores a 10^{-5} segundos, foi convencionado chamar fluorescência. Em períodos maiores de tempo, convencionou-se chamar fosforescência.

Por volta da metade do século XIX, o cientista britânico Sir George G. Stokes observou pela primeira vez que um mineral chamado fluorita exibia fluorescência quando iluminado com radiação ultravioleta (UV), e cunhou a expressão “fluorescência”. Stokes observou que a luz fluorescente apresentava comprimentos de onda maiores que a luz de excitação, um fenômeno que passou a ser conhecido como Lei de Stokes.

Assim, de acordo com a lei de Stokes, a luz emitida sempre terá maior comprimento de onda do que a luz de excitação. Tendo isso em mente, é viável que uma amostra excitada com comprimento de onda próximo de 490 nm

(próximo ao verde) emita por fluorescência uma luz mais energética e com menor comprimento de onda, por exemplo com comprimento de onda próximo a 450 nm (ao redor da azul).

O fenômeno de fluorescência persiste enquanto a excitação eletromagnética é incidida sobre o material. Quando a excitação cessa, o mesmo ocorre com a fluorescência.

Os marcadores fluorescentes possuem espectros característicos exclusivos para absorção (ou excitação) e emissão de luz (veja o exemplo destes espectros para o caso da calceína, na figura 29), assim como comprimentos de onda específicos nos quais ocorre o máximo de absorção e o máximo de emissão. Um marcador fluorescente ideal deveria apresentar estes espectros de absorção e de emissão de forma separada, sem que houvesse sobreposição dos mesmos; no entanto, há essa sobreposição, com os maiores comprimentos de onda do espectro de excitação coincidindo com os menores do espectro de emissão. Essa sobreposição deve ser minimizada ou reduzida por meio da seleção de filtros de excitação, de difusores de raios e de filtros de emissão. Caso contrário, a luz de excitação mais forte irá se sobrepor à luz de emissão mais fraca, diminuindo significativamente o contraste da amostra. Para que se tenha o máximo de intensidade de fluorescência, o fluorocromo (nome dado aos materiais fluorescentes) geralmente é excitado, com o auxílio de filtros adequados, no comprimento de onda específico de máxima excitação.

No caso do uso simultâneo de mais de um marcador fluorescente é desejável que estes apresentem curvas de excitação semelhantes e curvas de emissão bem separadas, e que não haja sobreposição das curvas do espectro luminoso. Infelizmente, raros marcadores se adequam satisfatoriamente a essas características.

A tabela 5 apresenta os valores médios encontrados na literatura, de comprimentos de onda nos quais ocorre a máxima excitação e emissão para os corantes utilizados neste trabalho (ABRAMOWITZ M- Olympus America, Inc., DAVIDSON M W. - National High Magnetic Field Laboratory, The Florida State University).

Figura 29: Picos de absorção (excitação, em preto) e de emissão luminosa (em verde) para Calceína.

Tabela 5 – Valores de Excitação e Emissão para os marcadores fluorescentes

Marcador	Intervalo de Excitação (nm)	Intervalo de Emissão (nm)
Tetraciclina	390	560
Calceína	495	520
Alizarina	530-560	580

Os valores para Calceína e Alizarina diferem pouco na literatura, o que não ocorre no caso da Tetraciclina. Isso pode ser devido ao fato de não existir uma única variedade desse antibiótico. O desconhecimento das curvas de excitação e emissão no caso desse marcador pode induzir a erros durante a interpretação dos resultados.

Autores como VIENNEAU (1997) apresentam valores de excitação e emissão respectivamente de 375 e 512 nm para a tetraciclina, que pouco diferem dos valores da tabela 5.

Entretanto, estudos como o de GLAZIER (1995) discordam dos valores de emissão para tetraciclina. Segundo o autor, esse material foi excitado na faixa de 390, produzindo um espectro de luz emitida que situou-se entre 420 e 600 nm. Isso pode ser uma desvantagem, já que seu largo espectro de emissão se sobrepõe ao espectro dos demais fluorocromos utilizados.

Outro fator que deve ser levado em conta é a fluorescência natural do tecido ósseo, que atinge valores de picos de emissão de luz entre 410 e 500nm quando submetidos a radiação UV, valores que se sobrepõe aos relatados na literatura para a emissão fluorescente da tetraciclina. Fukushima, Araki e Yamada (1987) relataram em seu estudo que a piridinolina, um amino-ácido do colágeno de ligações cruzadas, é responsável pela emissão de uma forte fluorescência. Os resultados de intensidade de fluorescência se apresentaram da seguinte forma: a hidroxiapatita natural dental apresentou o menor valor de intensidade de fluorescência, e a piridinolina, maior. A fluorescência da hidroxiapatita natural e da piridinolina atinge valores de picos de emissão de luz entre 410 e 500 nm quando submetidos a radiação UV, e a luz emitida apresenta um espectro que vai desde o azul claro até o branco intenso (VILLARROEL 2004).

Isso exposto, conclui-se que tanto tetraciclina como o osso natural fluorescem sob UV e emitem luz em comprimentos de onda semelhantes (420-600 e 410-500nm respectivamente). Isso é indesejável, já que tanto osso neoformado (corado pelo marcador fluorescente) como o osso antigo (fluorescente por natureza) irão emitir luz em comprimentos muito próximos, dificultando ou inviabilizando a diferenciação dessas estruturas.

Adicionalmente, um estudo (O'BRIEN, 2002) teve como objetivo refinar o método de detecção de diversos marcadores ósseos fluorescentes para determinar a sequência ótima de forma que todos os agentes fluorescessem igualmente. Segundo os autores, a melhor sequência de corantes foi alizarina-xilenol laranja-calceína-calceína azul. A tetraciclina foi excluída do estudo pelos autores devido a problemas recorrentes com sua capacidade de quelar íons cálcio quando aplicada sequencialmente a outros marcadores.

Neste estudo observou-se que a utilização da tetraciclina como marcador fluorescente não se mostrou eficiente, já que não permitiu extrair resultados

consistentes referentes á neoformação óssea. Isto é devido às incertezas e variações quanto as suas curvas de excitação e de emissão, e principalmente devido a sua fluorescência ser próxima à fluorescência natural do tecido ósseo quando esse é submetido a radiação UV. As figuras 30, 31, 32 e 33 ilustram micrografias de uma mesma região cirúrgica de animais do Grupo I (controle) sob campo claro e sob três diferentes filtros, respectivamente. Foram utilizados para detecção dos marcadores utilizados (tetraciclina, calceína e alizarina) respectivamente o conjunto de filtros 2, 9 e 14 (Carl Zeiss), cujas especificações encontram-se na tabela 6, indicados para a detecção quando usados esses marcadores.

Tabela 6 – Especificação dos filtros de fluorescência

Filtro	Faixa de Excitação	Faixa de Emissão
2	365	420
9	450-490	515
14	510-560	590

Sob UV (filtro 2, figura 31), é possível perceber que tanto osso neoformado, como osso antigo fluorescem de maneira semelhante, dificultando a diferenciação entre as estruturas. Nas demais micrografias (figuras 32 e 33), é possível diferenciar com mais facilidade o tecido neoformado do tecido ósseo original. A seta branca sinaliza tecido ósseo neoformado, e a seta escura, o tecido ósseo antigo.

Figura 30: Micrografia da região cirúrgica em animais do Grupo I (controle) em campo claro. A seta escura demonstra região óssea original, e a seta branca, a região óssea neoformada.

Figura 31: A mesma região da figura 30, sob iluminação UV (filtro 2). Tanto o osso antigo como a região óssea neoformada emitem fluorescência semelhante.

Figura 32: Contraste entre a fluorescência da calceína (seta branca) e tecido ósseo original (seta escura) sob o filtro 9 na mesma região da figura 30.

Figura 33: A visualização da mesma região cirúrgica da figura 30 permite perceber o contraste entre a fluorescência da alizarina (seta branca) e do tecido ósseo original.

As figuras 34, 35 e 36 são respectivamente micrografias de campo claro, sob o filtro 9 (para visualização da calceína) e sob o filtro 14 (para visualização da alizarina) de um fêmur do grupo II.

Figura 34: Microscopia de campo claro de corte transversal do fêmur de animal do Grupo II.

Figura 35: Fluorescência da calceína. A seta branca aponta regiões de remodelação óssea às novas forças depois de agredido.

Figura 36: Fluorescência da Alizarina. Novamente, a seta branca aponta que a remodelação óssea ocorreu mesmo na terceira semana após a injúria.

Por essas imagens é possível visualizar as diferenças de deposição óssea entre a segunda e terceira semana observando a diferença de cor e intensidade dos dois marcadores. O osso antigo não fluoresce, sinal de que a neoformação óssea ficou concentrada na área da ferida cirúrgica. Também é possível perceber na região de tábua óssea remodelações do osso que está se adaptando às novas forças depois de agredido (setas brancas).

As imagens 37, 38 e 39 mostram detalhes da mesma lâmina apresentada nas figuras anteriores, e nas mesmas sequências (campo claro, filtro 9 e filtro 14).

Figura 37: Microscopia de campo claro em maior aumento.

Figura 38: Fluorescência da Calceína demonstrando diferença na fluorescência entre osso original (escuro) e o neoformado (verde claro).

Figura 39: A fluorescência da Alizarina indica que houve remodelação óssea em toda a área da ferida cirúrgica mesmo na terceira semana após a cirurgia.

Levando em conta o modelo animal estudado, a técnica de análise microscópica por fluorescência não proporcionou dados conclusivos para a verificação de possíveis diferenças quanto à qualidade ou quantidade de neoformação óssea entre os diferentes tipos de implante estudados.

Entretanto, notam-se as regiões em que houve neoformação óssea e atividade osteoblástica nos diferentes períodos (duas e três semanas). É possível perceber que a maior parte das regiões coloridas em verde (calceína) e vermelho (alizarina) estão sobrepostas. Além disso, é possível notar também que mesmo na terceira semana, na fronteira entre osso antigo e osso neoformado, houve metabolismo ósseo. Isso evidencia que nesse modelo animal, o metabolismo ósseo continua a agir em toda a ferida, não ocorrendo de forma gradual e lamelar.

6. CONCLUSÕES

A biocompatibilidade da mistura bifásica de HAp / β -TCP e do β -TCP foi confirmada pela observação da osteocondução e osteointegração nos implantes por meio das diferentes técnicas de análise empregadas. O β -TCP, como era de se esperar, foi mais absorvido pelo organismo do que a mistura bifásica de HAp / β -TCP.

Quando comparamos os grupos que receberam o mesmo material cerâmico, variando a presença do composto vitamínico, há indícios de que a presença deste último tenha favorecido uma melhor e maior regeneração de tecido ósseo, quando comparado aos grupos que não receberam esse material.

No caso em que uma cerâmica mais absorvível foi utilizada (β -TCP), ficou evidente que o material foi substituído por novo osso quando utilizado em conjunto com o composto vitamínico, havendo sinais claros de regeneração. Na falta do composto vitamínico, essa cerâmica foi rapidamente absorvida pelo organismo, o que não acarretou uma neoformação óssea mais rápida ou efetiva. Ao contrário, a maior inflamação retardou a neoformação óssea.

Quando se utilizou a mistura bifásica (HAp + β -TCP), a presença do composto vitamínico também favoreceu a regeneração óssea, conforme verificado microscopicamente. Entretanto, mesmo no caso em que a mistura bifásica foi utilizada isoladamente, a regeneração óssea foi melhor quando comparada com o grupo em que se utilizou o β -TCP.

A análise por microscopia de fluorescência foi limitada para a verificação de possíveis diferenças quanto à qualidade ou quantidade de neoformação óssea entre os tipos de implante estudados. Entretanto, esta técnica evidencia que nesse modelo animal o reparo ósseo continuou a agir em toda a ferida, durante o período analisado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBREKTSSON T. *In vivo* studies of bone grafts. **Orthop Scand**. 1980; v.51, p. 9–17.
- ALBREKTSSON T. JOHANSSON C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **Eur Spine J**. 2001; v.10, p. S96-S101,
- ALLEGRINI S. J. Efeito da proteína morfogenética óssea e do composto vitamínico associados a mineral ósseo bovino com diferentes superfícies de implantes em tíbias de coelhos. São Paulo: 2003. (Tese de doutorado - Departamento de Anatomia Funcional Estrutura e Ultraestrutura, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).
- ALMEIDA PRADO F. DE, ANBINDER A. L., JAIME A. P. G., LIMA A.P., BALDUCCI I., ROCHA R. F. DA. Defeitos ósseos em tíbias de ratos: padronização do modelo experimental. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**. 2006; v. 18 (1), p.7-13
- ARTZI Z., WEINREB M., GIVOL N., ROHRER M. D., NEMCOVSKY C. E., PRASAD H. S., TAL H. Biomaterial resorption rate and healing site morphology of inorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate in the canine: a 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 2004; v. 19 (3), p. 357-68.
- ATWOOD D. A Reduction of residual ridges: a major oral disease entity. **J Prosthet Dent**. 1971; v. 26 (3), p. 266-279.
- BANCROFT S. Theory and Practice of Histological Techniques, 4th Ed. 1996, p. 129.
- BRANEMARK P. I., LINDSTROM J., OHLSSON A. Intra-osseous anchorage of dental protheses. **Scand J Plast Reconstr Surg**. 1969; v.3, p. 1-100.
- BRUCHARDT H. The biology of bone repair. **Clinical ortopaedics and releated research**. 1983; v.174, p.28-42.

- BUDDY D., RATNER A. S., HOFFMAN F. J., SCHOEN J. E. Biomaterials Science, An introduction to Materials in Medicine; ed. Academic Press; cap. 2; 1996.
- BURCHARDT H. The biology of bone repair. **Clinical ortopaedics and releated research**. 1983; v.174 p.28-42.
- BURSTEIN F. D., CANALIS R. F. Studies on the osteogenic potential of vascularizedperiosteum: behavior of periosteal flaps transferred onto soft tissue. **Otolaryngol Head Neck Surg**. 1985; v.93, p.731–735.
- CARVALHO H.F.; BUZATO C.B.C. **Células: uma abordagem multidisciplinar**. 1ª ed. São Paulo: Editora Manole, 2005; p.34-49.
- CONSTANTINO P. D., FREIDMAN C. D. Synthetic bone graft substitutes. **Otolaryngol. Clin. North Am**. 1994; v.27, p. 1037–73.
- COOK S.D., RUEGER D.C. Osteogenic protein-1: biology and applications. **Clin. Orthop.Relat Resar**. 1996; v.324, p.29-38.
- CUNNINGHAM L. L. The use of calcium phosphate cements in the maxillofacial region **J Long Term Eff Med Implants**. 2005; v.15 (6), p.609-15.
- DAVID V., LAFAGE-PROUST M. H., LAROCHE N., CHRISTIAN A., RUEGSEGGER P., VICO L. Two week longitudinal survey of bone architecture alteration in the hindlimbunloaded rat model of bone loss: sex differences. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 2006; v.290, p.E440-7.
- DONATH, K. LAASS, M. GÜNZL, H. J. The histopathology of different foreign-body reactions in oral soft tissue and bone tissue. *Virchows Archiv. A.: Pathological Anatomy and histopathology*. 1992; v.420, p.131-137.
- ENNEKING W. F., EADY J. L., BURCHARDT H. Autogenous cortical bone grafts in the construction of segmental skeletal defects. **J Bone Joint Surg**. 1980; v.62 (A), p. 1039.
- ERBE E. M., MARX J. G., CLINEFF T. D., BELLINCAMPI L. D. Potential of an ultraporous beta tricalcium phosphate synthetic cancellous bone void filler and bone marrow aspirate composite graft. **Eur Spine J**. 2001; v. 10, p. s141-46.

- FREDERICK LORD C., GEBHARDT M. C., TOMFORD W. W., MANKIN H. J.
Infection in bone allografts. **J Bone Joint Surg.** 1988; v. 62(A), p.369-76.
- FREIDLANDER G. E. Current concepts review: bone grafts. **J Bone Joint Surg.** 1987; v. 69A, p. 786.
- FUGAZZOTTO P. A., SHANAMAN R. et al. Guided bone regeneration around titanium implants: report of the treatment of 1,503 sites with clinical reentries. **Int J Periodontics Restorative Dent.** 1997; v. 17(3), p. 292-9.
- FUKUSHIMA Y., ARAKI T., YAMADA M. O. Topography of fluorescence and its possible composites in human teeth. **Cellular and Molecular Biology.** 1987; v. 33 (6) p. 1431-1436.
- GLAZIER S A., HORVATH J. J. Feasibility of fluorescence detection of tetracycline in media mixtures employing a fiber optic probe **Analytical letters.** 1995; vol. 28 (15), p. 2607-2624.
- GOIA T. S. Avaliação *in vitro* e *in vivo* de ligas porosas de ti-13nb-13zr obtidas por metalurgia do pó. São Paulo: 2008. (Dissertação de mestrado – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Autarquia associada à Universidade de São Paulo).
- GOLDBERG V. M., STEVENSON S. Natural history of autografts and allografts. **Clin Orthop.** 1987; v. 225, p.7–16.
- GOSAIN A. K., RIORDAN P. A., SONG L., AMARANTE M. T., KALANTARIAN B., NAGY P. G., WILSON C. R., TOTTH J. M., MCINTYRE B. L. A. 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part II. Bioengineering implants to optimize bone replacement in reconstruction of cranial defects. **Plast Reconstr Surg.** 2004; v. 114, p.1155-63.
- GRANDI G. Análise histomorfométrica comparativa entre o cimento de beta-TCP e os grânulos de beta-TCP/Hap no reparo ósseo de calotas cranianas de ratos Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul Faculdade de Odontologia Programa de pós-graduação em Odontologia Porto alegre 2007.

- HAAS R., DONATH K., FODINGER M., WATZEK G. Bovine hydroxyapatite for maxillary sinus grafting: comparative histomorphometric findings in sheep. **Clin Oral Implants Res.** 1998; v. 9, p.107-116.
- HAAS R., BARON M., DONATH K., ZECHNER W., WATZEK G. Porous hydroxyapatite for grafting the maxillary sinus: a comparative histomorphometric study in sheep. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2002; v. 17(3), p. 337-346.
- HAAS R., BARON M., ZECHNER W., MAILATH-POKORNY G. Porous hydroxyapatite for grafting the maxillary sinus in sheep: comparative pullout study of dental implants. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2003; v.18 (5), p. 691-696.
- HALLMAN M., SENNERBY L., LUNDGREN S. A. clinical and histological evaluation of implant integration in the posterior maxilla after sinus floor augmentation with autogenous bone, bovine hydroxyapatite, or a 20:80 mixture. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2002; v. 17 (5), p. 635-643.
- HENCH, L. L. Bioceramics, a clinical success. **Ceram Bull.** 1998; p. 67-74.
- HENCH, L. L. Bioceramics. **J Am Ceramic Soc.** 1998; v.81, p. 1705-28.
- HOLLINGER, J.O.; BREKKE, J.; GRUSKIN, E. et al. Role of bone substitutes. **Clin. Orthop.** 1997; n.324, p.55-65.
- HULBERT S. F., KLAWITTER J. J. Tissue reaction to three ceramics of porous and non porous structures. **J Biomed Mater Res.** 1972; v. 6, p.347.
- JONES, J. R. New trends in bioactive scaffolds: The importance of nanostructure. **J Eur Ceram Soc.** 2009, v. 29 p.1275–128.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido Ósseo. In: Junqueira, L. C., Carneiro, J. (ed.) **Histologia Básica.** 10ª.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p.488.
- KÖNIG B., BECK,T.J., KAPPERT H.F., KAPPERT C.C., MASUKO T.S. A study of different calcification area in newly formed bone 8 weeks after insertion of dental implants in rabbit tibias. **Ann Anat.** 1998; v.180, p.471-5.

- LeGEROS R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Adv Dent Res.** 1988; v.2, p.164-180.
- LeGEROS R. Z. Calcium Phosphates in oral biology and medicine. **Basel.** 1991; p. 110.
- LeGEROS R. Z. Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review. **Clin Orthop.** 2002; v. 395, p. 81-98.
- LeGEROS R. Z, LIN S., ROHANIZADEH R., MIJARES D., LEGEROS J. P. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. **J Mater Sci Mater Med.** 2003; v.14, p. 201-9.
- LINOVITZ R. J., PEPPERS T. A. Use of an advanced formulation of beta-tricalcium phosphate as a bone extender in interbody lumbar fusion. **Orthopedics.** 2002; v. 25 (supl 5), p.s585-9.
- MERKX M. A., MALTHA J. C., STOELINGA, P. J. Assesment of the value of anorganic bone additives in sinus floor augmentation: a review of clinical reports. **J Oral Maxillofac Surg.** 2003; v.32(1), p. 1-6.
- MISCH C. E. Implantes Dentários Contemporâneos: 2ª Edição, Santos, 2000.
- MOORE R. W, GRAVES S. E., BAIN G. I. Synthetic Bone Graft Substitutes. **Anz J Surg.** 2001; v.71, p. 354–361.
- O'BRIEN F. J., TAYLOR D., LEE T.C. An improved labelling technique for monitoring microcrack growth in compact bone **Journal of Biomechanics.** 2002; v.35, p.523–526
- PABLOS A. B. Avaliação da influência das drogas antiinflamatórias não-esteroidais sobre a reparação óssea na diabetes experimental: 2003. (Dissertação de mestrado – Laboratório de Fisiopatologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).
- PARKER M. J., RAGHAVAN R., GURUSAMY K. Incidence of fracture-healing complications after femoral neck fractures. **Clin Orthop Relat Res.** 2007; v.458, p.175-9.

- POMPEIA C., LIMA T., CURI R. (Review) Arachidonic acid cytotoxicity: can arachidonic acid be a physiological mediator of cell death? **Cell Biochem Funct.** 2003; v. 21 (2), p.97-104.
- RATNER B. D. Biomaterials Science: Academic Press; Reprint edition (1996).
- RIBEIRO C. Processamento e caracterização de cerâmicas à base de hidroxiapatita e fosfato de cálcio. São Paulo: 2003. (Dissertação de mestrado – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Autarquia associada à Universidade de São Paulo).
- ROBBINS L. S. Patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4. edição, 1991.
- ROSS M. H., REITH E. J., ROMRELL L. J. Osso. In: Ross, M. H., Reith, E. J., Romrell, L. J. (ed.). Histologia: Texto e Atlas. 2a Ed. São Paulo: Panamericana, 1993. p.141-160.
- SALLES M. B. Micro-elementos funcionais alterando a biocompatibilidade do polímero de poliuretano de mamona (poliol) em enxertos ósseos: estudo desenvolvido em cães. São Paulo: 2001. (Dissertação de mestrado - Departamento de Anatomia Funcional Estrutura e Ultraestrutura do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).
- SALLES M. B. Avaliação do estresse oxidativo agudo após trauma cirúrgico realizado em tecido ósseo de ratos wistar. São Paulo: 2007. (Tese de doutorado - Departamento de Anatomia Funcional Estrutura e Ultraestrutura do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).
- SCHNEIDER V., OGANOV V., LeCLANC A., KAKMONOV A., TAGGART L., BARULIN A., HUNTOON C., GRIGORIEV A., VARONIN L. Bone and body mass changes during space flight. **Acta Astronautica.** 1995; .v36, nº 8-12, p. 463-466.
- SCHWAN L., SOUZA A. C. A. Imobilização e osteoporose. In: Jeckel-Neto EA, Cruz IBMd (ed.). **Aspectos biológicos e geriátricos do envelhecimento II.** Porto Alegre: EDIPUCRS, 2000. p.253-274.

- STRUBE P., METHA M., BAERENWALDT A., TRIPPENS J., WILSON C. J., ODE A., PERKA C., DUDA G. N., KASPER G. Sex-specific compromised bone healing in female rats might be associated with a decrease in mesenchymal stem cell quantity. **Bone**. 2009; Aug 10.
- TAKUMIDA M., ZHANG D. M., YAJIN K., HARADA Y. Polychromatic labeling of otoconia for the investigation of calcium turn over. **Orl J Otorhinolaryngol Relat. Spec**. 1997; v. 59, p. 4-9.
- TURNBULL R.S., FREEMAN E. Use of wounds in the parietal bone of the rat for evaluating bone marrow for grafting into periodontal defects. **J Periodont. Res**. 1974; v.9, n.39,.
- VIENNEAU D. S., KINDBERG C. G. Development and validation of a sensitive method for tetracycline in gingival crevicular fluid by HPLC using fluorescence detection **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**. 1997; vol. 16 (1), p. 111-117.
- VILLARROEL M., JORQUERA C., GOMES O. M. M., GOMES J. C., Fluorescência: uma contribuição na vitalidade natural do dente humano. **Odontol Estet Dent**. 2004; v.3 (12), p.397-406.
- WILLIAMS D. F., Definitions in Biomaterials. **Progress in Biomedical Engineering**, 1987; v. 4.
- ZERBO I. R., BRONCKERS A. L. et al. Histology of human alveolar bone regeneration with a porous tricalcium phosphate. A report of two cases. **Clin Oral Implants Res**. 2001; v. 12(4), p. 379-84.
- ZADEH H. Implant site development: clinical realities of today and the prospects of tissue engineering. **J Calif Dent Assoc**. 2004; v. 32(12), p. 1011-20.

8. ANEXOS

8.1 ANEXO 1

Parecer - Projeto Nº 22/CEPA-IPEN/SP

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa **“AVALIAÇÃO DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA APÓS ENXERTIA DE BETA TRI FOSFATO DE CÁLCIO PURO E MISTURA BIFÁSICA DE HIDROXIAPATITA E BETA TRI FOSFATO DE CÁLCIO (60:40) EM ASSOCIAÇÃO A COMPOSTO VITAMÍNICO: ESTUDO EM RATOS”** de responsabilidade do pesquisador **ANA HELENA DE ALMEIDA BRESSIANI** foi considerado **APROVADO**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados, a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou finais, dependendo da duração do projeto) referentes ao andamento da pesquisa. Após o término da pesquisa, uma cópia do trabalho, em CD ou disquete, deve ser encaminhada a este CEPA .

São Paulo, 04 de abril de 2008

Prof. Dra. Nanci do Nascimento
Coordenadora do CEPA-IPEN

IPEN-CNEN/SP
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL
Av Prof Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária - CEP 05508-000 - São Paulo - SP
Telefone: (011) 3133-9698 - Fax (011) 3133-9694
E-mail: nnascime@ipen.br

8.2 ANEXO 2

PROTOCOLO MODIFICADO DE COLORAÇÃO DAS LÂMINAS HISTOLÓGICAS.

1. HEMATOXILINA E EOSINA (HE)

- a. Álcool 100° durante 3 minutos
- b. Álcool 95° durante 3 minutos
- c. Álcool 70° durante 3 minutos
- d. Água corrente durante 10 minutos
- e. Hematoxilina durante 5 minutos
- f. Água corrente durante 3 minutos
- g. Álcool ácido uma lavagem
- h. Água corrente durante 20 minutos
- i. Eosina durante 2 minuto
- j. Álcool 95° durante 1 minutos
- k. Álcool 100° durante 2 minutos
- l. Álcool 100° durante 2 minutos
- m. Secagem das lâminas no ambiente
- n. Montagem da lamínula com resina

2. TRICRÔMICO DE MASSON

- a. Álcool 100° durante 3 minutos
- b. Álcool 95° durante 3 minutos

- c. Álcool 70° durante 3 minutos
- d. Água corrente durante 10 minutos
- e. Hematoxilina durante 5 minutos
- f. Água corrente durante 3 minutos
- g. Álcool ácido uma lavagem
- h. Água corrente durante 20 minutos
- i. Fucsina ácida durante 2 minutos
- j. Água corrente durante 3 minutos
- k. Colocar em várias trocas de água destilada
- l. Solução Fosfotungstáica 5% e Ácido Molíbdico 5% (1/1) durante 5 minutos
- m. Azul de anilina-acética até corar
- n. Água corrente durante 3 minutos
- o. Álcool 95° durante 1 minuto
- p. Álcool 100° durante 2 minutos
- q. Álcool 100° durante 2 minutos
- r. Secagem das lâminas no ambiente
- s. Montagem da lâmina com resina.