

OLICIES DA CUNHA

Interação biológica de membranas poliméricas bioativas em falhas ósseas induzidas em tíbias de coelhos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Cássio Ricardo Auada Ferrigno

São Paulo

2012

RESUMO

DA CUNHA, O. **Interação biológica de membranas poliméricas bioativas em falhas ósseas induzidas em tíbias de coelhos.** [Biological interaction of polymeric bioactive membranes in rabbit tibial defects]. 2012. 158 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O reparo de falhas ósseas tem sido motivo de preocupação e estudos em ortopedia. O enxerto esponjoso autógeno é consagrado e definido como padrão ouro, porém, o leito doador é limitado e a colheita pode causar grande morbidade. Tem sido proposto, ao longo dos anos, o uso de materiais naturais, sintéticos e fatores de crescimento com resultados promissores. O desenvolvimento de membranas e matrizes tridimensionais, baseado em biomateriais reabsorvíveis e biocompatíveis, tem demandado estudos voltados à síntese e avaliação. O objetivo do estudo foi avaliar o processo de reparação óssea por meio do uso de três polímeros bioativos em falhas ósseas em tíbias de coelhos. Foram estudados 48 coelhos machos, adultos jovens, distribuídos em quatro tempos experimentais (três, sete, 14 e 30 dias). Cada tíbia constituiu uma unidade experimental, de modo que foram confeccionados dois defeitos ósseos monocorticais em região proximal medial de cada tíbia. Cada tempo experimental contemplou quatro grupos: controle - sem adição de biomaterial; M1 - orifícios protegidos com Poli L Lactide co Policaprolactone / Poli Glicol Etilênico; M2 - Poli L Lactide co Policaprolactone / Poli Glicol Etilênico / β Fosfato Tricálcico e M3 - Poli L Lactide co Policaprolactone / Poli Glicol Etilênico / nano Hidroxiapatita. Ao final de cada período os indivíduos foram submetidos à eutanásia e obtidos cortes histológicos das tíbias, corados com técnica de HE, TRAP e Masson. Foram feitas análises histomorfológicas descritivas e histomorfométricas, com mensuração do tecido ósseo neoformado, porcentagem da área de trabéculas ósseas, número de osteoclastos e porcentagem de trabéculas ósseas com osteoclastos. Os dados foram submetidos aos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os resultados mostraram absorção incompleta da membrana e ausência de toxicidade. Para os períodos de 14 e 30 dias, o grupo controle exibiu matriz óssea no interior do defeito e nos grupos M1, M2 e M3, o calo ósseo formou-se no interior e em grande quantidade na superfície do defeito e no perióstio. Aos

30 dias, o grupo controle exibiu calo ósseo com maturação mais avançada que nos grupos com membranas. Aos 14 e 30 dias, a área de calo ósseo do grupo controle foi significativamente menor em relação aos grupos com membranas ($p=0,001$ e $p=0,003$ respectivamente). As lâminas dos grupos com membranas exibiram sinais de remodelação ativa tanto aos 14 como aos 30 dias, denotando o potencial osteoindutor e osteocondutor destes biomateriais. Aos 14 dias a neoformação óssea no grupo M3 (com nano-HA) foi superior ao M2 (com β -TCP), o que pode indicar que o potencial osteoindutor e osteocondutor do material M3 foi superior ao M2 nesta fase da reparação. Os resultados permitiram concluir que apesar dos biomateriais testados no experimento estimularem a neoformação óssea, a remodelação foi mais tardia.

Palavras-chave: Bioativo. Consolidação. Copolímeros. Morfometria.

ABSTRACT

DA CUNHA, O. **Biological interaction of polymeric bioactive membranes in rabbit tibial defects.** [Interação biológica de membranas poliméricas bioativas em falhas ósseas induzidas em tíbias de coelhos]. 2012. 158 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Bone gap repairs are a major concern in orthopedics. Autologous cancellous bone graft is considered the golden standard technique, but donation site is limited and it's grafting is related to greater morbidity. The use of natural and synthetic materials, as well as growth factors, has been proposed with promising outcomes. The development of membranes and tridimensional matrixes based in reabsorbable and biocompatible materials require more studies targeting their synthesis and evaluation. The aim of the present study was to evaluate the bone repair process using three osteoinductive polymers in circular bone gaps in rabbit's tibias. Forty eight young adult male rabbits were divided into four experimental moments (three, seven, fourteen and thirty days). Each tibia was considered one experimental unit, in which two monocortical bone defects were made in the proximal medial region of the bone. Each experimental time was used in the following four groups: control - without biomaterial; M1 - defects protected with Poli L Lactide co Policaprolactone / Poly Ethylene Glycol; M2 - Poli L Lactide co Policaprolactone / Poly Ethylene Glycol / β Tricalcium Phosphate and M3 - Poli L Lactide co Policaprolactone / Poly Ethylene Glycol / Hydroxyapatite. At the end of each period the animals were euthanized and histological sections were stained with HE, TRAP and Masson techniques. Histomorphologic and histomorphometric analysis were made and consisted in the measuring of new bone tissue formation, percentage of trabecular area, number of osteoclast and percentage of trabeculae with osteoclasts. Data were analyzed with Kruskal-Wallis and Mann-Whitney test. Results showed an incomplete absorption and no toxicity of membranes. At 14 and 30 days, control group showed bone callus in the defect, and groups M1, M2 and M3 showed bone callus in the defect and around the surface of the defect. At 30 days, the control group showed bone callus in a more mature phase in comparison to the groups with membranes. At 14 and 30 days, the bone callus area in the control group ($p=0.001$) was significantly smaller than the

membrane groups ($p=0.003$). The groups with membranes exhibited signs of active remodeling at 14 and 30 days, demonstrating that the biomaterials have greater osteoinduction and osteoconduction potential. At 14 days, we found more bone formation in group M3 (nano-HA) relative to group M2 (β -TCP), which may indicate that the osteoinductive / osteoconductive potentials of M3 in this bone repair phase was superior in relation to M2. The biomaterials tested in the study stimulate bone formation, but caused delayed in bone remodeling.

Key words: Bioactive. Bone healing. Copolymers. Morphometry

1 INTRODUÇÃO

O elevado número de acidentes, a longevidade e melhor qualidade de vida das pessoas e dos animais de companhia exigem e estimulam o desenvolvimento de substitutos viáveis para a recuperação e manutenção dos tecidos e órgãos. Na área de ortopedia, inúmeras situações podem resultar em falhas ósseas e, na Medicina Veterinária, frequentemente o ortopedista é desafiado a preencher defeitos ósseos de grandes proporções. O reparo retardado ou ausência de reparo destas lesões interferem e comprometem a função do aparelho locomotor por limitação mecânica e/ou dor (RAGETLY; GRIFFON, 2011).

As principais situações que resultam em defeitos ósseos críticos são os traumas (fraturas) causados por acidentes automobilísticos e processos osteolíticos em resposta ao aparecimento de neoplasias, infecções e atrito gerado por implantes metálicos soltos utilizados para estabilização de fraturas. É frequente também a ocorrência de falhas causadas por técnicas cirúrgicas como as osteotomias corretivas para desvios angulares em ossos longos, alongamentos ósseos para corrigir defeitos congênitos ou adquiridos e avanço da tuberosidade tibial (TTA) para tratamento de ruptura de ligamento cruzado cranial.

O tecido ósseo possui excelente habilidade de reparo com a mesma alta organização estrutural original, porém, a capacidade é limitada pelo tamanho e complexidade da falha. Sabe-se também que doenças endócrinas, metabólicas, degenerativas, neoplásicas, infecciosas, auto-imune, entre outras, podem dificultar ou impedir o reparo. O enxerto ósseo esponjoso autólogo é considerado "padrão ouro" para o preenchimento de falhas ou estímulo em áreas "inativas" como não uniões; contudo, o leito doador é limitado e a colheita causa grande morbidade incluindo dor e fraturas.

Dessa forma, para o reparo de grandes defeitos ósseos, têm sido propostos tratamentos baseados em diferentes princípios de biologia óssea, dentre eles, a osteoindução e osteocondução. A osteoindução é a propriedade de uma substância induzir células indiferenciadas a diferenciarem-se em células osteoprogenitoras e estas em osteoblastos, com subsequente formação de novo tecido ósseo. A osteocondução é a propriedade de um material preencher e servir como arcabouço para a proliferação e migração de células osteoprogenitoras e a sua posterior

diferenciação terminal em osteoblastos (FARDIN et al., 2010; RAGETLY; GRIFFON, 2011).

O desenvolvimento e aplicação de biomateriais osteoindutores / osteocondutores são práticas já utilizadas e que apresentam futuro promissor. Desta forma, a engenharia tecidual constitui-se em uma ciência voltada para o desenvolvimento de métodos biotecnológicos utilizados na manipulação do crescimento celular. Apesar de serem empregados desde a antiguidade, só após a Segunda Guerra Mundial, com o conhecimento da ciência dos materiais e melhor entendimento do metabolismo ósseo, é que houve grande avanço no desenvolvimento de biomateriais.

Nos últimos anos, a ciência tem demonstrado grande esforço na produção de novas tecnologias na produção de biomateriais. A sua inerente multidisciplinaridade demanda a integração de áreas como: biologia, medicina, veterinária, odontologia, engenharia, química, materiais e física. Nesse contexto, a interação entre essas áreas facilita o aprimoramento e o desenvolvimento de matrizes tridimensionais, assim como rotas de síntese, processamento em formas variadas, qualidade clínica e resposta do tecido hospedeiro (DENG et al., 2005). Os polímeros são suportes (*scaffolds*) para semeadura e crescimento das células, usados amplamente na produção de biomateriais (OLIVEIRA et al., 2010).

Os polímeros bioativos são compostos químicos que exercem potente atividade biológica e o desenvolvimento de novas alternativas de tratamento com os mesmos faz-se necessário, uma vez que resulta em melhora na qualidade de vida das pessoas e animais, representada por aumento na expectativa de vida, na saúde em geral e no bem-estar. Alguns estudos demonstraram bioatividade dos polímeros isolados ou copolimerizados e / ou mediante a inclusão de aditivos como as biocerâmicas β -TCP e nano-HA. Esta bioatividade traduz-se por capacidade de sinalização celular, osteoindução e osteocondução (BIOMATERIAIS, [200-?]; HENCH; WILSON, 1993; WOLKMER, 2006; NANDI et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010).

A Regeneração Tecidual Guiada (RTG) e a Regeneração Óssea Guiada (ROG) estão entre as técnicas mais empregadas na tentativa de regeneração de tecidos. Diversos estudos demonstraram excelentes resultados na regeneração óssea associada ao uso de matrizes ou membranas obtidas mediante uso de polímeros e

cerâmicas (BECKER; BECKER, 1990; SERVICE, 2000; CASTNER; RATNER, 2002; KRUYT et al., 2006).

Após a caracterização e o desenvolvimento de um biomaterial osteoindutor / osteocondutor, os primeiros testes são realizados *in vitro*. Os testes *in vivo* são feitos na sequência e o coelho, como modelo experimental, apresenta as vantagens técnicas de fácil manejo e maior porte em relação aos ratos, camundongos e cobaias, o que permite a execução de falhas maiores. Após testes *in vitro* e *in vivo* que constatem vantagens clínicas e ausência de toxicidade ou potencial mutagênico, o biomaterial é liberado para uso clínico, onde os resultados frequentemente continuam sendo avaliados para sustentar seu uso nas diversas situações onde a estimulação do reparo é desejada.

O tema motivou a avaliação *in vivo* de três membranas poliméricas bioativas, aplicadas em defeitos produzidos em tíbias de coelhos, quanto à interação tecidual e capacidade osteoindutora / osteocondutora, para que os dados obtidos possam subsidiar novas pesquisas e uso clínico em situações que exijam aceleração do reparo ósseo.

9 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e nas condições em que o experimento foi conduzido, o estudo permitiu concluir que:

- os biomateriais testados não demonstraram toxicidade em avaliações clínicas, macroscópicas e microscópicas;
- as membranas não são completamente absorvidas até os 30 dias de observação, constituindo em um espaço entre o defeito e o periósteo;
- os biomateriais testados apresentam potencial osteoindutor e osteocondutor, pois houve maior formação de calo ósseo nos indivíduos dos grupos que receberam polímeros em relação ao controle nos períodos de 14 e 30 dias, acompanhado de estímulo apropriado da remodelação;
- no grupo controle houve remodelação óssea mais fisiológica em relação aos grupos que receberam polímeros em função do período experimental;
- o grupo polímero com nano-HA apresenta maior potencial estimulador de remodelação que os demais polímeros.

REFERÊNCIAS

- ANDREA, C. E.; BLEGGI, L. F.; ALVES, M. T. S. Análise da morfometria nuclear: descrição da metodologia e o papel dos softwares de edição de imagem. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, n. 1, p. 51-57, 2008.
- BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.
- BAUER, H. C.; TORNKVIST, H.; NILSSON, O. S. Effects of bisphosphonates on the incorporation of calcium-45 and 3H-proline in orthotopic and in demineralized matrix-induced bone in rats. **Bone**, v. 7, n. 2, p. 129-135, 1986.
- BECKER, W.; BECKER, B. Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets and for implant dehiscences. Surgical techniques and case reports. **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 10, p. 377-391, 1990.
- BIOMATERIAIS, [200-?] Disponível em: <<http://www.biomateriais.com.br/telas/default/>>. Acesso em: 30 abr. 2011.
- BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, p. 337342, 2003.
- BOYNE, P. Restoration of osseous defects in maxillofacial casualites. **The Journal of the American Dental Association**, v. 78, p. 767-776, 1969.
- CAI, Z.; ZHANG, T.; DI, L.; XU, D. M.; XU, D. H.; YANG, D. A. Morphological and histological analysis on the in vivo degradation of poly (propylene fumarate)/(calcium sulfate/ β -tricalcium phosphate). **Biomedical microdevices Online**, 2011. Doi: 10.1007/s10544-011-9532-8. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/nm16165512074471/fulltext.pdf>>. Acesso em: 12 abr 2011.
- CALLAN, D. Guided tissue regeneration without a stage 2 surgical procedure. **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 13, n. 2, p. 172-179, 1993.
- CASTNER, D. G.; RATNER, B. D. Biomedical surface science: Foundations to Frontiers. **Surface Science**, v. 500, n. 1-3, p. 28-60, 2002.
- CELESTE, S. A.; RAHAL, S. C.; PEREIRA-JÚNIOR, O. C. M.; SEQUEIRA, J. L.; MELO, S. M. Resposta tecidual a implantes de discos de poliuretana de mamona nas formas pré-moldada ou biomassa moldada. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 12, p. 1089-1095, 2010.

CORDEN, I. A.; JONES, C. D.; RUDD, P. CHRISTIAN, S. Physical and biocompatibility properties of poly-e-caprolactone produced using in situ polymerization: a novel manufacturing technique for long-fibre composite materials. **Biomaterials**, v. 21, p. 713-724, 2000.

DA CUNHA, O. **Interação biológica de membranas poliméricas bioativas em falhas ósseas induzidas em tíbias de coelhos**. 2012. 158 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

DAHLIN, C.; GOTTLow, J.; LINDE, A. Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand**, v. 24, p. 13-19, 1990.

DEBUSSCHER, F.; AUNOBLE, S.; ALSAWAD, Y.; CLEMENT, D.; LE HUEC, J. C. Anterior cervical fusion with a bio-resorbable composite cage (beta TCP-PLLA): clinical and radiological results from a prospective study on 20 patients. **European Spine Journal**, v. 18, p. 1314–1320, 2009.

DECLERCQ, H. A.; VERBEECK, R. M.; DE RIDDER, L. I.; SCHACHT, E. H.; CORNELISSEN, M. J. Calcification as an indicator of osteoinductive capacity of biomaterials in osteoblastic cell cultures. **Biomaterials**, v. 26, p. 4964-4974, 2005.

DENG, M.; SHI, J.; SMITH, A. J.; JIN; Y. Effects of transforming growth factor beta1 (TGFbeta-1) and dentin non-collagenous proteins (DNCP) on human embryonic ectomesenchymal cells in a three-dimensional culture system. **Archives of Oral Biology**, v. 50, n. 11, p. 937-945, 2005.

DENG, X.; HAO, J.; WANG, C. Preparation and mechanical properties of nanocomposites of poly(D,L-lactide) with Ca-deficient hydroxyapatite nanocrystals, **Biomaterials**, v. 22, p. 2867-2873, 2001.

DENISSEN, H.; DE GROOT, K. Immediate dental root implants from synthetic dense calcium hidroxyapatite. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 42, n. 5, p. 551-556. 1979.

DINARVAND, P.; SEYEDJAFARI, E.; SHAFIEE, A.; JANDAGHI, A. B.; DOOSTMOHAMMADI, A.; FATHI, M. H.; FARHADIAN, S.; SOLEIMANI, M. New Approach to Bone Tissue Engineering: Simultaneous Application of Hydroxyapatite and Bioactive Glass Coated on a Poly(L-lactic acid) Scaffold. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 3, p. 4518–4524, 2011.

DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. The osteoblast: A sophisticated fibroblast under central surveillance. **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1501-1504, 2000.

EL-WARRAK, A. O.; OLMSTEAD, M.; APELT, D.; DEISS, F.; NOETZLI, H.; ZLINSKY, K.; HILBE, M.; BERTSCHAR-WOLFSBERGER, R.; JOHNSON, A. L.; AUER, J.; RECHENBERG, B. V. An Animal Model for Interface Tissue Formation in Cemented Hip Replacements. **Veterinary Surgery**, v. 33. p. 495–504, 2004.

FARDIN, A. C.; JARDIM, E. C. G.; PEREIRA, F. C.; GUSKUMA, M. H.; ARANEGA, A. M.; GARCIA JÚNIOR, I. R. Enxerto ósseo em odontologia: revisão de literatura. **Innovations Implant Journal: Biomaterials and Esthetics**. São Paulo, v. 5, n. 3, p. 48-52, 2010.

FEINBERG, S. E.; AGHALOO, T. L.; CUNNINGHAM JR., L. L. Role of tissue engineering in oral and maxillofacial reconstruction: findings of the 2005 AAOMS. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 63, n. 10, p.1418-1425, 2005.

FERRIGNO, C. R. A.; DELLA NINA, M. I.; FANTONI, D. T. Osteossínteses com placas associadas a enxertos de proteína morfogenética óssea (Gen-Tech®) em fraturas distais de rádio-ulna em cães com menos de 6 quilos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 65-69, 2007.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, HHS, Dental devices; reclassification of tricalcium phosphate granules and classification of other bone grafting material for dental bone repair. **Final rule. Fed Regist**, v. 70, n. 81, p. 21947-21950, 2005.

FRANZ-ODENDAAL, T. A.; HALL, B. K.; WITTEN, P. E. Buried Alive: How Osteoblasts Become Osteocytes. **Developmental Dynamics**, v. 235, p.176-190, 2006.

GAMBLE, M. The hematoxylins and eosin. In: BANCROFT, J. D.; GAMBLE, M. **Theory and practice of histological techniques**. Churchill Livingstone: Elsevier, 2008. 6. ed. Cap. 9, p. 121-134.

GOMES, K.; PIPPI, N. L.; BRAGA, F. V. A.; KROLIKOWISKI, G.; SOARES, A. V.; PIGATTO, G. M. Osso bovino esponjoso inorgânico liofilizado em bloco no reparo de fístula oronasal induzida em cães. **Ciência Rural**, v. 37, n. 1, p. 159-164, 2007.

GUO, X.; PARK, H.; YOUNG, S.; KRETLOW, J. D.; VAN DEN BEUCKEN, J. J.; BAGGETT, L. S.; TABATA, Y.; KASPER, F. K.; MIKOS, A. G.; JANSEN, J. A. Repair of osteochondral defects with biodegradable hydrogel composites encapsulating marrow mesenchymal stem cells in a rabbit model. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 1, p. 39-47, 2010.

HAO, J.; LIU, Y.; ZHOU, S.; LI, Z.; DENG, X. Investigation of nanocomposites based on semi-interpenetrating network of [l-poly (e-caprolactone)]/[net-poly (e-caprolactone)] and hydroxyapatite nanocrystals. **Biomaterials**, v. 24, p. 1531–1539, 2003.

HASSNA, R. R.; RAMAY, M.; ZHANG, J. Biphasic calcium phosphate nanocomposite porous scaffolds for load-bearing bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 25, p. 5171–5180, 2004.

HE, X.; MACMAHON, S.; HENDERSON II, T. D.; GRIFFEY, S. M.; CHENG, L. W. Ricin Toxicokinetics and Its Sensitive Detection in Mouse Sera or Feces Using Immuno-PCR. **Plos One**, v. 5, n. 9, p. 1-8, 2010.

HENCH, L. L.; WILSON, J. **An introduction to bioceramics**. Singapore: World Scientific Publishing Company CO, 1993, p. 181-198.

HENRIKSEN, K.; NEUTZSKY-WULFF, A. V.; BONEWALD, L. F, KARSDAL, M. A. Local communication on and within bone controls bone remodeling - Review. **Bone**, v. 44, p. 1026–1033, 2009.

HOFBAUER, L. C.; SCHOPPET, M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. **Journal American Medical Association**, v. 292, n. 4, p. 490-495, 2004.

HUGHES, D. E.; WRIGHT, K. R.; UY, H. L.; SASAKI, A.; YONEDA, T.; ROODMAN, G. D.; MUNDY, G. R.; BOYCE, B. F. Biophosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. **Journal of Bone and Mineral Research**., v. 10, p. 1478-1487, 1995.

IGNÁCIO, H.; MAZZER, N.; BARBIERI, C. H.; CHIERICI, G. Uso da poliuretana derivada do óleo de mamona para preencher defeitos ósseos diafisários segmentares do rádio - Estudo experimental em coelho. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 32, n. 10, p. 815-821, 1997.

JACQUES, J. W.; FAGUNDES, D. J.; FIGUEIREDO, A. S.; INOUE, C. M.; SCAPULATEMPO, R. P.; SASSIOTO, M. C. P. O papel da poliuretana de mamona como substituto do enxerto ósseo autógeno em coelhos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgões**, v. 31, n. 4, p. 236-241, 2004.

JUNG, Y.; KIM, S. S.; KIM, Y. H.; KIM, S. H.; KIM, B. S.; KIM, S., CHOI, C. Y.; KIM, S. H. A poly(lactic acid)/calcium metaphosphate composite for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 26, p. 6314-6322, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In:_____.**Histologia básica: texto/atlas**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2008. Cap. 8, p. 185-152.

KINANE, D. F. Local antimicrobial therapies in periodontal disease. **Annals of the Royal Australasian College of Dental Surgeons**, v. 15, p. 57-60, 2000.

KOBAYASHI, Y.; UDAGAWA, N.; TAKAHASHI, N. Action of RANKL and OPG for Osteoclastogenesis. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, v. 19, n. 1, p. 61–72, 2009.

KOORT, J. K.; MAKINEN, T. J.; SUOKAS, E.; VEIRANTO, M.; JALAVA, J.; TORMALA, P.; ARO, H. T. Sustained release of ciprofloxacin from an osteoconductive poly(DL)-lactide implant . **Acta Orthopaedica**, v. 9, n. 2, p. 295–301, 2008.

KRUYT, M. C.; PERSSON, C.; JOHANSSON, G.; DHERT, W. J.; DE BRUIJN, J. D. Towards Injectable Cell-based Tissue-Engineered Bone: The Effect of Different Calcium Phosphate Microparticles and Pre-Culturing. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 2, p. 309-317, 2006.

LAURENCE, S.; BAREILLE, R.; BAQUEY, C.; FRICAIN, J. C. Development of a resorbable macroporous cellulosic material used as hemostatic in an osseous environment. **Journal Biomedical Materials Research**, v. 73, n. 4, p. 422-429, 2005.

LI, Z.; LI, Z. B. Repair of mandible defect with tissue engineering bone in rabbits. **Australia and New Zealand Journal Surgery**, v. 75, p. 1017-1021, 2005.

LI, J.; MORI, S.; KAJI, Y.; MASHIBA, T.; KAWANISHI, J.; NORIMATSU, H. Effect of bisphosphonate (incadronate) on fracture healing of long bones in rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, p. 969-979, 1999.

MARKS, J. R. S. C.; ODGREN, P. R. Structure and development of the skeleton. In: BILEZIKIAN, J. P.; RAISZ, L. G.; RODAN, G. A. **Principles of bone biology**. 2. ed., San Diego, Academic Press, 2002. Cap.1, p.3-15.

MARTIN, T. J.; GOOI, J. H.; SIMS, N.A. Molecular Mechanisms in Coupling of Bone Formation to Resorption. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, v. 19, n. 1, p. 73–88, 2009.

MEI, L. H. I. Polímeros biodegradáveis. In: ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais - fundamentos & aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. Cap 6, p. 177-184.

MENEZES, L. M.; FREITAS, M. P. M.; GONÇALVES, T. S. Biocompatibilidade dos materiais em Ortodontia: mito ou realidade? **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, v. 14, n. 2, p. 144-157, 2009.

NAKAHAMA, K. Cellular communications in bone homeostasis and repair. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 67, p. 4001-4009, 2010.

NANDI, S. K.; ROY, S.; MUKHERJEE, P.; KUNDU, B.; DE, D. K.; BASU, D. Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review. **Indian Journal Medicine Research**, v. 132, p. 15-30, 2010.

OHARA, G. H.; KOJIIMA, K. E.; ROSSI, J. C.; TELLES, M.; SOARES, T. V. C. Estudo experimental da biocompatibilidade do polímero poliuretana de mamona implantada intra-óssea e intra-articular em coelhos. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 3, n. 2, p. 62-68, 1995.

OLIVEIRA, L. S. A. F.; OLIVEIRA, C. S.; MACHADO, A. P. B.; ROSA, F. P. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras – Artigo de Revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, n. 9, p. 37-44, 2010. Supplement, 1.

ORÉFICE, R. L. Materiais poliméricos - ciência e aplicação como biomateriais. In: ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais - fundamentos & aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. Cap 4, p. 88-156.

PAUL, B.; MELLONING, J.; TOWLE, H.; GRAY, J. Use of a collagen barrier to enhance healing in human periodontal furcation defects. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 12, p.123-131, 1992.

PAPE, H. C.; MARCUCIO, R.; HUMPHREY, C.; COLNOT, C.; KNOBE, M.; HARVEY, E. J. Trauma-Induced Inflammation and Fracture Healing. **Journal Orthopedic Trauma**. v. 24, n. 9, p. 522-5259, 2010.

PENG, H.; USAS, A.; OLSHANSKI, A.; HO, A. M.; GEARHART, B.; COOPER, G. M.; HUARD, J.. VEGF Improves, Whereas sFlt1 Inhibits, BMP2-Induced Bone Formation and Bone Healing Through Modulation of Angiogenesis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 20, n. 11, p. 2017-2027, 2005.

PEREIRA, M. M.; BUONO, V. T. L.; ZAVAGLIA, C. A. C. Materiais metálicos - ciência e aplicação como biomateriais. In: ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais - fundamentos & aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. Cap 2, p. 41-58.

PEREIRA, M. M.; VASCONCELOS, W.; ZAVAGLIA, C. A. C. Materiais cerâmicos - ciência e aplicação como biomateriais. In: ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais - fundamentos & aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. Cap 3, p. 59-86.

RAGETLY, G. R.; GRIFFON, D. J. The rationale behind novel bone grafting techniques in small animals. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 24, n. 1, p. 01-08, 2011.

RAGGATT, L. J.; PARTRIDGE, N. C. Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 33, p. 25103–25108, 2010.

RAISZ, L. G.; RODAN, G. A. Embryology and cellular biology of bone. In: AVIOLI, L. V.; KRANE, S. M. **Metabolic bone disease**. 3. ed. San Diego, Academic Press, 1998. Cap. 1, p. 1-22.

ROCHA, M. N. **Estudo de revestimento de fosfato de cálcio em substratos de titânio denso e poroso**. 2010. 169 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Faculdade de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

ROETHER, J. A.; BOCCACCINE, A. R.; HENCH, L. L.; MAQUET, V.; GAUTIER, S.; JÉRÔME, R. Development and in vitro characterisation of novel bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams and Bioglass for tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 23, p. 3871-3878, 2002.

- RORIZ, V. M.; SOUZA, S. L.; TABA, M. PALIOTO, D. B. Treatment of Class III Furcation Defects With Expanded Polytetrafluoroethylene Membrane Associated or Not With Inorganic Bone Matrix/Synthetic Cell-Binding Peptide: A Histologic and Histomorphometric Study in Dogs. **Journal Periodontology**, v. 77, n. 3, p. 490-497, 2006.
- ROSANNA, D. T.; VITTORIO, B.; SANTI, S. Biocompatibility and integrin-mediated adhesion of human osteoblasts to poly(dl-lactide-co-glycolide) copolymers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, p. 161-169, 2004.
- ROSENBERG, A. E. Bones, Joints, and Soft-Tissue Tumors. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. **Pathologic basis of disease**. 8. ed. Philadelphia: Saunders, 2010. Cap. 26, p. 1205-1256.
- ROZEN, N.; LEWINSON, D.; BICK, T.; MERETYK, S.; SOUDRY, M. Role of Bone Regeneration and Turnover Modulators in Control of Fracture. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, v. 17, n. 3, p. 197-213, 2007.
- RUEDI, T.; BASSETT, C. Repair and remodeling in milipore-isolated defects in cortical bone. **Acta Anatomica**, v. 68, p. 509-531, 1967.
- RUMI, M. N.; DEOL, G. S.; SINGAPURI, K. P.; PELLEGRINI JR., V. D. The origin of osteoprogenitor cells responsible for heterotopic ossification following hip surgery: an animal model in the rabbit. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 23, p. 34-40, 2005.
- SAKATA, M. M.; RINCON, M. C. A.; DUEK, E. A. R. Estudo da Interação Polímero/Cartilagem/Osso Utilizando Poli (Ácido Lático-co-Ácido Glicólico) e Poli (p-Dioxanona) em Côndilo Femural de Coelhos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 14, n 3, p. 176-180, 2004.
- SANG-HOON, R. Bone-like apatite-forming ability and mechanical properties of poly(e-caprolactone)/silica hybrid as a function of poly(e-caprolactone) content. **Biomaterials**, v. 25, p. 1167-1175, 2004.
- SANGINÁRIO, V.; GINEBRA, M. P.; TANNER, K. E., PLANELL, J. A.; AMBROSIO, L. Biodegradable and semi-biodegradable composite hydrogels as bone substitutes: morphology and mechanical characterization. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, p. 447-454, 2006.
- SCHINDELER, A.; MCDONALD, M. M.; BOKKO, P.; LITTLE, D. G. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 19, p. 459-466, 2008.
- SCULEAN, A.; DONOS, N.; BLAES, A.; LAUERMANN, M.; REICH, E.; BRECX, M. Comparison of enamel matrix proteins and bioabsorbable membranes in the treatment of intrabony periodontal defects. A split-mouth study. **Journal Periodontology**, v. 70, n. 3, p. 255-62, 1999.
- SERVICE, R. F. Tissue engineers build new bone. **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1498-1500, 2000.

SHAPIRO, F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. **European Cells and Materials**, v. 15, p. 53-76, 2008.

SHIKINAMIA, Y.; MATSUSUEB, Y.; NAKAMURAC, T. The complete process of bioresorption and bone replacement using devices made of forged composites of raw hydroxyapatite particles/poly L-lactide (F-u-HA/PLLA). **Biomaterials**, v. 26, p. 5542–5551, 2005.

SHIRANE, H. Y.; ODA, D. Y.; PINHEIRO, T. C.; DA CUNHA, M. R. Implantes de biomateriais em falha óssea produzida na fíbula de ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**. v. 45, n. 5, p. 478-482, 2010.

SIKAVITSAS, V. I.; BANCROFT, G. N.; LEMOINE, J. J.; LIEBSCHNER, M. A.; DAUNER, M.; MIKOS, A. G. Flow perfusion enhances the calcified matrix deposition of marrow stromal cells in biodegradable nonwoven fiber mesh scaffolds. **Annals of Biomedical Engineering** v. 33, n. 1, p. 63-70, 2005.

SIPOS, P. M.; LOOS, B. G.; ABBAS, F.; TIMMERMAN, M. F.; VAN DER VELDEN, U. The combined use of enamel matrix proteins and a tetracycline-coated expanded polytetrafluoroethylene barrier membrane in the treatment of intra-osseous defects. **Journal of Clinic Periodontology**, v. 32, n. 7, p. 765-772, 2005.

SZABO, G.; HUYS, L.; COULTHARD, P.; MAIORANA, C.; GARAGIOLA, U.; BARABÁS, J.; NÉMETH, Z.; HRABÁK, K.; SUBA, Z. A prospective multicenter randomized clinical trial of autogenous bone versus beta-tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevation: histologic and histomorphometric evaluation. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 20, n. 3, p. 371-381, 2005.

TEMENOFF, J. S.; PARK, H.; JABBARI, E.; CONWAY, D. E.; SHEFFIELD, T. L.; AMBROSE, C. G.; MIKOS, A. G. Thermally Cross-Linked Oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) Hydrogels Support Osteogenic Differentiation of Encapsulated Marrow Stromal Cells In Vitro. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 5-10, 2004.

TEITELBAUM, S. L. Bone resorption by osteoclasts. **Science**, v. 289, n. 5484, p.1504-1508, 2000.

WARRER, K.; GOTFREDSEN, K.; HJORTING-HANSEN, E.; KARRING, T. Guided tissue regeneration ensures osseointegration of dental implants placed into extraction sockets. An experimental study in monkeys. **Clinical Oral Implants Research**, v. 2, n. 4, p. 166-171, 1991.

WARRER, K.; KARRING, T.; NYMAN, S.; GOGOLEWSKI, S. Guided tissue regeneration using biodegradable membranes of polylactic acid or polyurethane, **Journal of Clinic Periodontology**, v. 19, n. 9, pt. 1, p. 633-640, 1992.

WEILER, A.; HOFFMANN, R. F. G.; STÄHELIN, A. C.; HELLING, H. J.; SÜDKAMP, N. P. Biodegradable Implants in Sports Medicine: The Biological Base. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery**, v. 16, n. 3, p. 305–321, 2000.

WIKESJO, U. M.; QAHASH, M.; THOMSON, R. C.; COOK, A. D.; ROHRER, M. D.; WOZNEY, J. M.; HARDWICK, W. R. rhBMP-2 significantly enhances guided bone regeneration. **Clinical Oral Implants Research**, v. 15, n. 2, p.194-204. 2004.

WILLIAMS, D. F. **Definitions in biomaterials**. Amsterdam: Elsevier, 1987.

WOLKMER, T.M. **Obtenção e caracterização de hidroxiapatita porosa pelo método gelasting de espumas para uso como implantes**. 2006. 139 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2006.

ZELLIN, G.; LINDE, A. Importance of delivery systems for growth-stimulatory factors in combination with osteopromotive membranes. An experimental study using rhBMP-2 in rat mandibular defects. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 35, p. 181-190, 1997.

ZHANG, M.; LIU, L.; ZHOU, W.; CHENG, L.; GUO, X. D. Interfacial fabrication and property of hydroxyapatite/polylactide resorbable bone fixation composites. **Current Applied Physics**, v. 5, p. 516–518, 2005.

ZHANG, S.; REVELL, P. A.; EVANS, S. L.; TUKE, M. A.; GREGSON, P. J. In vivo biocompatibility and mechanical study of novel bone-bioactive materials for prosthetic implantation. **Journal of Biomedical Matererial Research**, v. 46, n. 2, p. 279-286, 1999.

ZHONGKUI, H.; PEIBIAO, Z.; CHAOLIANG, H.; XUEYU, L. Nano-composite of poly(L-lactide) and surface grafted hydroxyapatite: Mechanical properties and biocompatibility. **Biomaterials**, v. 26, p. 6296–6304, 2005.

ZHOU, H.; LEE, J. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 7, p. 2769-2781, 2011.