

Iorrana Índira dos Anjos Ribeiro



Estudo da implantação *in vivo* de biomateriais compósitos de fosfato de cálcio e polímero

Salvador
2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS INTERATIVOS
DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS**



IORRANA ÍNDIRA DOS ANJOS RIBEIRO

**Estudo da implantação *in vivo* de biomateriais compósitos
de fosfato de cálcio e polímero**

Salvador
2013

IORRANA ÍNDIRA DOS ANJOS RIBEIRO

**Estudo da implantação *in vivo* de biomateriais compósitos
de fosfato de cálcio e polímero**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiana Paim Rosa
Co-orientador: Prof. Dr. Fúlvio Borges Miguel

Salvador
2013

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

R484 Ribeiro, Iorrana Índira dos Anjos
Estudo da implantação in vivo de biomateriais compósitos
de fosfato de cálcio e polímeros / Iorrana Índira dos Anjos
Ribeiro. – Salvador, 2013.
78 f.
Orientadora: Prof^a Dr^a Fabiana Paim Rosa.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Ciências da Saúde, 2013.

1. Tecido Ósseo. 2. Engenharia Biomédica. 3. Biomateriais.
I. Rosa, Fabiana Paim. II. Universidade Federal da Bahia. III.
Título.

CDU 612.753

IORRANA ÍNDIRA DOS ANJOS RIBEIRO

**Estudo da implantação *in vivo* de biomateriais compósitos de
fosfato de cálcio e polímero**

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

Aprovada em: _____

Banca Examinadora

Fabiana Paim Rosa – Orientadora _____
Doutora em Odontologia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Universidade Federal da Bahia.

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

Roberto Paulo Correia de Araújo _____
Doutor em Odontologia pela Universidade Federal da Bahia
Universidade Federal da Bahia.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



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

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

Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa Aprovada

Prof. Dr. Roberto Paulo Correa de Araújo Aprovada

Profa. Dra. Eliana Cristina da Silva Rigo Aprovada

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

Salvador, 10 de dezembro de 2013

Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa Fabiana Paim Rosa

Prof. Dr. Roberto Paulo Correa de Araújo Roberto Paulo Correa de Araújo

Profa. Dra. Eliana Cristina da Silva Rigo Eliana Cristina da Silva Rigo

*Aos meus pais e irmãs, por todo apoio, carinho, companhia e orações.
Esta conquista é nossa!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos e cuidado. Sei que sempre estivestes comigo.

A Eunice, minha mãe, pelos ouvidos sempre prontos a me escutar e me aconselhar da forma mais serena possível. E a Raimundo Nonato, meu pai, pelo carinho e cuidado.

Às minhas irmãs, Itana, Ivana e Ilana, pelo apoio e por compreenderem minha ausência.

A Caio Simas por me garantir companheirismo, amor, incentivo e leveza para trilhar este caminho.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Fabiana Paim Rosa, pela dedicação, pelos ensinamentos e confiança, pela contribuição e exemplo para minha vida acadêmica.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Fúlvio Borges Miguel, pelo cuidado, ensinamentos e puxões de orelha.

Ao Dr. Aryon de Almeida Barbosa Júnior, pelo tempo dedicado à análise histológica deste trabalho e à cessão do Instituto de Patologia Geral e Cutânea (IPAC), para o processamento histológico dos espécimes.

Aos pesquisadores Marcelo Prado e Daniel Navarro, do Instituto Militar de Engenharia; Alexandre Malta Rossi e Sílvia R. Albuquerque Santos, do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, pela produção e concessão dos biomateriais.

Ao Prof. Roberto Paulo C. Araújo, coordenador do programa de Pós-graduação, por todo o auxílio e pela compreensão durante as turbulências.

Às técnicas de laboratório, Elisângela e Cristina, pelos ensinamentos e cuidado no processamento dos espécimes.

Aos colegas do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais, especialmente Renata Almeida, por dividir comigo as alegrias e dificuldades deste período, e pela parceria de sempre.

Aos meus colegas de pós-graduação, em especial, Alana Alcântara, Carlos Jefferson, Curt Hemanny, Elizabete Inês e Rita Maria Alves, pela amizade e companheirismo neste período.

Aos amigos da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), principalmente George Gonçalves, pelo auxílio, dedicação e colaboração. Conte comigo sempre!

A Júnior, funcionário do biotério da UEFS, pela eficiência e dedicação. Muito obrigada pela contribuição!

Às minhas irmãs Geilda e Luciana, aos meus cunhados amados e aos meus sobrinhos pelas horas de alegria e distração, e por compreenderem minha ausência.

Aos demais amigos, pela companhia neste caminho.

À CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu muito obrigada!

*O tempo vai passando, o passado vai pesando
O futuro ninguém sabe, ninguém vê
Vai abrir uma janela de oportunidade
Esteja pronto, de verdade, pra saltar.*

Bora – Humberto Gessinger ♪♪

RIBEIRO, Iorrana Índira dos Anjos. **Estudo da implantação *in vivo* de biomateriais compósitos de fosfato de cálcio e polímero**. Salvador, 2013. 78 f. il. Dissertação (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2013.

RESUMO

Um grande desafio para a medicina e para os pesquisadores da Área de Bioengenharia Tecidual Óssea é desenvolver e aperfeiçoar técnicas e biomateriais que possam devolver a estrutura e funcionalidade do tecido ósseo em caso de perdas ósseas extensas. Dentre os biomateriais utilizados, a hidroxiapatita tem se destacado devido à sua excelente biocompatibilidade, similaridade com a fase mineral do tecido ósseo e interação biológica com os tecidos do sítio de implantação. A associação da hidroxiapatita com polímeros é um caminho promissor, já que este compósito garante diminuição da fragilidade da biocerâmica, estimula a adesão de células e simula a composição química do tecido ósseo. Porém, além da composição, as características físico-químicas do biomaterial, como tamanho e formato, também influenciam diretamente o seu potencial osteogênico. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar a biocompatibilidade e o potencial osteogênico de biomateriais à base de hidroxiapatita no reparo ósseo. Para isso, uma amostra de 15 ratos foi utilizada, distribuídos para a composição de 3 grupos, com 5 animais cada, avaliados no ponto biológico de 15 dias de pós-operatório: Grupo GHAalg – defeito preenchido com grânulos de hidroxiapatita associada ao alginato; Grupo EHAalg – defeito preenchido com microesferas de hidroxiapatita associada ao alginato; Grupo Controle – defeito ósseo vazio, sem implantação de biomaterial. No grupo GHAalg, observou-se a deposição de matriz osteoide no centro do defeito, em permeio aos grânulos, e uma discreta inflamação crônica granulomatosa. No grupo EHAalg, notou-se a formação de delgados septos de tecido conjuntivo ao redor das microesferas e em permeio as suas partículas a deposição de um tecido conjuntivo associado à reação inflamatória crônica granulomatosa. No Grupo Controle, a neoformação óssea restringiu-se às bordas ósseas e houve preenchimento de toda extensão do defeito por tecido conjuntivo. Diante disto, concluiu-se que ambos os biomateriais foram biocompatíveis e os GHAalg tiveram comportamento osteogênico superior as EHAalg.

Palavras-chave: Biomateriais, Hidroxiapatita, Alginato, Grânulos, Microesferas.

RIBEIRO, Iorrana Índira dos Anjos. **Study of *in vivo* implantation of composite calcium phosphate biomaterials and polymer.** Salvador, 2013. 78 f. il. Theses (Master's degree in Interactive processes of systems and organs) – Health Science Institute, Federal University of Bahia, Salvador. 2013.

ABSTRACT

A major challenge for medicine and for researchers Area Bone Tissue Bioengineering is to develop and/or improve techniques and biomaterials that can restore the structure and function of bone tissue in case of extensive bone loss. Among the biomaterials used, hydroxyapatite, has excelled due to its excellent biocompatibility, similarity to the mineral phase of bone tissue and interaction with biological tissues of the implantation site. The combination of hydroxyapatite/polymer is a promising, since this ensures reduction of composite brittleness of bioceramics, stimulate the adhesion of cells and simulates the chemical composition of bone tissue. But, besides the composition, the physico-chemical properties of biomaterials, such as size and shape, also directly influence the osteogenic potential of the biomaterial. The objective of this study was to analyze the biocompatibility and osteogenic potential of biomaterials based on hydroxyapatite in bone repair. For this, a sample of 15 rats was used for the composition of distributed 3 groups of 5 animals each and were evaluated in the biological point of 15 days after surgery: Group GHAalg - defect filled with hydroxyapatite granules associated with alginate; Group EHAalg - defect filled with hydroxyapatite microspheres associated with alginate; Control Group - bone defect empty without implantation of biomaterial. In the group GHAalg observed the deposition of osteoid matrix in the center of the defect, interspersed with granules, and a discrete chronic granulomatous inflammation. In the group EHAalg noted the formation of thin septa of connective tissue surrounding and permeating the microspheres its particles depositing a tissue associated with chronic granulomatous inflammatory reaction. In the control group bone formation was restricted to the edges of bone and was filling the entire length of the defective tissue. Before this it was concluded that both biomaterials were biocompatible and osteogenic GHAalg behaved EHAalg the top.

Keywords: Biomaterials, Hydroxyapatite, Alginate, Granules, Microspheres.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Esquema da evolução dos biomateriais na substituição óssea.	22
Figura 2	Esquema da organização espacial de biomateriais com formato de (a) microesferas e (b) grânulos.	25
Figura 3	Interface tecido circundante-biomaterial.	26
Figura 4	Organização nanoestrutural do tecido ósseo.	27
Quadro 1	Classificação dos fosfatos de cálcio quanto a sua relação Ca/P.	28
Figura 5	Representação da estrutura cristalina da hidroxiapatita no modelo de esferas rígidas.	28
Quadro 2	Possíveis substituições iônicas nos sítios de Ca^{+2} , PO_4^{-3} e OH^- .	29
Figura 6	Estrutura dos blocos da molécula de alginato.	32
Figura 7	Formação do hidrogel de alginato de cálcio	33
Quadro 3	Número de animais de acordo com o grupo experimental e ponto biológico.	39
Figura 8	Grânulos de HA acondicionados em tubos plásticos do tipo <i>eppendorfs</i> .	39
Figura 9	Microesferas de HA associadas ao alginato acondicionados em tubos plásticos do tipo <i>eppendorfs</i>	40
Figura 10	Analgesia e sedação por meio de injeção intramuscular.	42
Figura 11	Tricotomia da região da calvária.	42
Figura 12	Tecido ósseo exposto.	42
Figura 13	Confecção do defeito ósseo com fresa trefina.	42
Figura 14	Demarcação do defeito ósseo na porção mediana da calvária.	42
Figura 15	Defeito ósseo crítico confeccionado.	42
Figura 16	Implantação do biomaterial.	42
Figura 17	Sutura do retalho com pontos interrompidos.	42
Figura 18	Desenho esquemático do defeito crítico em calvária de rato.	43
Figura 19	GHAalg 15 D	46
Figura 20	EHAalg 15 D	46

Figura 21	Controle 15 D	47
Figura 22	GHAalg 15 D	47
Figura 23	EHAalg 15 D	48
Figura 24	Controle 15 D	48
Figura 25	Controle 15 D	49
Figura 26	GHAalg 15 D	49
Figura 27	GHAalg 15 D	50
Figura 28	GHAalg 15 D	50
Figura 29	EHAalg 15 D	51
Figura 30	GHAalg 15 D	51
Figura 31	EHAalg 15 D	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

15 D	15 dias
<i>ad libitum</i>	Expressão latina que significa “à vontade”
BO	Borda óssea
BTO	Bioengenharia Tecidual Óssea
CBPF/RJ	Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas/Rio de Janeiro
CEUA	Comitê de Ética em Pesquisas no Uso de Animais
CGm	Célula gigante multinucleada
DFDBA	Demineralized Frezzer Dried Bone Allograf
EHAalg	Microesferas de hidroxiapatita associada ao alginato
FDBA	Frezzer Dried Bone Allograf
G	Grânulos
GHAalg	Grânulos de hidroxiapatita associada ao alginato
Goldner	Tricômico de Masson-Goldner
HA	Hidroxiapatita
HAalg	Hidroxiapatita associada ao alginato
HE	Hematoxilina-eosina
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IME/RJ	Instituto Militar de Engenharia/Rio de Janeiro
IPAC	Instituto de Patologia Geral e Cutânea
KOH	Hidróxido de potássio
M	Microesferas
m	Macrófagos
MEC	Matriz Extracelular
nanoHA	Hidroxiapatita nanoestruturada
No	Neoformação óssea
PCL	Policaprolactona
PGA	Poli(ácido glicólico)
PIFG	Picrossírius <i>red</i>
PLA	Poli(ácido láctico)
PVA	Poli(álcool vinílico)
RDm	Região da dura-máter
Ri	Reação inflamatória crônica
rpm	Rotações por minuto

Tc	Tecido conjuntivo
Tcf	Tecido conjuntivo frouxo
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
UFBA	Universidade Federal da Bahia
Vc	Veia central
Vs	Neovascularizado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	TECIDO ÓSSEO.....	19
2.2	BIOENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA E BIOMATERIAIS.....	22
2.2.1	Propriedades físico-químicas dos biomateriais.....	25
2.2.2	Hidroxiapatita.....	28
2.2.3	Alginato.....	32
2.2.4	Compósitos de fosfatos de cálcio e polímeros.....	35
3	OBJETIVOS.....	36
3.1	OBJETIVO GERAL.....	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1	AMOSTRA.....	39
4.2	BIOMATERIAIS.....	40
4.2.1	Grânulos de hidroxiapatita.....	40
4.2.2	Esferas de hidroxiapatita com alginato.....	41
4.3	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	42
4.4	ETAPA LABORATORIAL.....	44
5	RESULTADOS.....	45
6	DISCUSSÃO.....	54
7	CONCLUSÕES.....	61
	REFERÊNCIAS.....	63
	ANEXO	74

1 INTRODUÇÃO

As perdas ósseas extensas representam grande desafio para os profissionais da área da saúde, como os ortopedistas e cirurgiões-dentistas, e para os pesquisadores da área da Bioengenharia Tecidual Óssea (BTO), uma vez que, nessas condições, a regeneração ocorre de forma limitada e o reparo é finalizado com a deposição de tecido conjuntivo fibroso. (CACENDDA et al., 2003; KIM et al., 2006; BIANCON FILHO et al., 2011) Muitas dessas perdas produzem sequelas que comprometem a função e a estética tecidual e, conseqüentemente, a qualidade de vida dos indivíduos acometidos por ela. (SOUZA, 2010) Diante dessas limitações, técnicas regenerativas e biomateriais têm sido desenvolvidos e aperfeiçoados, com o objetivo de favorecer os mecanismos regenerativos. (LEONEL et al., 2003)

Dentre os diferentes biomateriais utilizados na atualidade, as biocerâmicas de fosfato de cálcio têm sido amplamente utilizadas em técnicas regenerativas ósseas. Isto devido a sua excelente biocompatibilidade, à similaridade com a fase mineral do tecido ósseo e à interação biológica com os tecidos do sítio de implantação. (AZA; AZA; AZA, 2005; BOROJEVIC, 2008) Das biocerâmicas de fosfato de cálcio utilizadas, a hidroxiapatita (HA) se destaca devido a sua similaridade com a fase mineral do tecido ósseo, por ser termodinamicamente estável em pH fisiológico, biocompatível e por garantir uma ligação forte com o osso adjacente. (AZEVEDO et al., 2007)

O desenvolvimento de novas biocerâmicas, com propriedades melhoradas, contribui para aumentar as possibilidades de utilização desse biomaterial na área da biomedicina. Uma nova perspectiva é a associação da biocerâmica com um polímero, com o intuito de mimetizar o tecido ósseo e associar a bioatividade do fosfato de cálcio com a biodegradabilidade do polímero. (TORRES et al., 2013) Um biopolímero muito utilizado com esse fim é o alginato. Este biomaterial é biocompatível, não tóxico, não imunogênico, biodegradável e hidrofílico. (AUGST; KONG; MOONEY, 2006) Em contato com o cátion de cálcio (Ca^{+2}), ele pode formar hidrogeis, que apresentam biocompatibilidade, biodegradabilidade e podem ser implantados no corpo de forma minimamente invasiva. (LEE; MOONEY, 2012)

Os biomateriais podem ser obtidos em diferentes formas e formatos: pasta, gel,

cimento, pó, grânulos, esferas, microesferas e arcabouços tridimensionais – discos e cilindros, por exemplo.

Biomateriais com formato de microesferas podem ser implantados por meio de sistemas injetáveis, em procedimentos cirúrgicos minimamente invasivos. (BARRIAS et al., 2005) Além disso, a organização espacial das microesferas no sítio de implantação cria um interstício entre elas que favorece a difusão de nutrientes e fatores de crescimento, bem como a angiogênese, essencial às atividades celulares observadas durante o reparo tecidual. Biomateriais com formato de grânulos, ao serem implantados no defeito ósseo, têm uma organização espacial diferente, semelhante a um mosaico. Este interstício, formado entre as partículas, é menor do que aquele observado entre as microesferas e pode interferir no processo de reparo. A variação na distribuição de tamanho desses grânulos ou microesferas é outro fator que interfere na formação desse interstício. Se esta variação for ampla, as partículas de tamanho menor ocuparão os espaços presentes entre as maiores e reduzirá, assim, o interstício entre as partículas.

As propriedades físico-químicas de cada biomaterial irão interferir na resposta tecidual à implantação e torna-se, assim, indispensável a caracterização do biomaterial quanto a composição, formato, microestrutura, tamanho de partícula, porosidade, área e química de superfície. (LAVIK; LANGER, 2004; GARG et al., 2012; CATAURO et al., 2013)

Diante disto, previamente à sua utilização clínica, os biomateriais necessitam ser avaliados *in vivo* quanto à sua biocompatibilidade e ao comportamento osteogênico, o que irá garantir eficácia e segurança na sua utilização. Assim, o objetivo deste estudo foi o de avaliar a biocompatibilidade e o potencial osteogênico após implantação de biomaterial compósito de hidroxiapatita e alginato em defeito ósseo.

Revisão da literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

Esta seção compreende duas subseções que tratam, respectivamente: (a) a breve caracterização do tecido ósseo e de defeitos ósseos críticos; (b) e a bioengenharia tecidual óssea, os biomateriais e sua relação com o tecido ao qual foi implantado.

2.1 TECIDO ÓSSEO

O osso é um tecido mineralizado, altamente vascularizado, especializado, dinâmico e complexo. É constituído por células envoltas numa matriz com elementos orgânicos e inorgânicos (HING, 2004; MARTINS et al., 2010) e tem como principal função a sustentação e proteção dos órgãos do corpo, mas também funciona como um reservatório mineral, principalmente de cálcio; e de células hematopoiéticas. (HING, 2004; SALGADO; COUTINHO; REIS, 2004) Cinco tipos celulares – osteoblastos, osteócitos, osteoclastos, células osteoprogenitoras e de revestimento ósseo – estão associadas a este tecido. Estas atuam em conjunto para garantir a formação, manutenção e remodelação da matriz óssea. (CACENDDA et al., 2003; MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005)

A matriz extracelular (MEC) óssea é uma matriz mineralizada, composta por dois principais constituintes: colágeno e cristais de HA [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$]. O colágeno tipo I é o elemento fundamental da parte orgânica da matriz óssea e confere a ela elasticidade e resistência à tração. Lipídeos, peptídeos, proteínas, glicoproteínas e polissacarídeos também fazem parte da matriz orgânica, porém em menor quantidade. A parte inorgânica da matriz é constituída, essencialmente, por minerais de cálcio e fósforo, organizados na forma de cristais de HA. Em menor quantidade encontram-se íons de sódio, flúor, magnésio e carbonato. Este composto inorgânico confere à matriz óssea dureza e resistência à compressão. (RIMINUCCI; BIANCO, 2003; HING, 2004; MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005)

O tecido ósseo apresenta adequada capacidade remodeladora e regenerativa; este último mecanismo ocorre de forma semelhante ao da osteogênese embrionária

(CACENDDA et al., 2003; HING, 2004; DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005), por isso permite que lesões ósseas pequenas se reparem sem a formação de cicatriz. (AI-AQL et al., 2008) A regeneração óssea envolve uma integração complexa de células, fatores de crescimento, hormônios, nutrientes, estabilidade mecânica e MEC; e ocorre por meio de uma cascata de mecanismos moleculares bem organizados, iniciados em resposta a uma lesão. (DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005; AI-AQL et al., 2008)

No entanto, em condições inóspitas, como em locais que apresentem suprimento sanguíneo comprometido, em áreas de difícil consolidação e em perdas ósseas extensas, a regeneração ocorre de forma limitada. Nestes casos, o reparo é finalizado por fibrose. (CANCEDDA et al., 2003; MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005; CARDOSO et al., 2006; KIM et al., 2006; MIGUEL et al., 2006) Nessas situações, torna-se premente estabelecer condições para que o tecido ósseo possa regenerar-se de forma completa. (JIANG et al., 2010) Neste sentido, os pesquisadores da área da BTO têm buscado desenvolver novas técnicas regenerativas e novos biomateriais, assim como aperfeiçoar os já existentes, com o intuito de restabelecer a continuidade do defeito e fornecer estímulos à osteogênese, de forma a acelerar o processo de regeneração. (LEONEL et al., 2003; LAVIK; LANGER, 2004; BIANCON FILHO et al., 2011)

2.2 BIOENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA E BIOMATERIAIS

A Bioengenharia Tecidual é um campo emergente, multidisciplinar, que aplica os princípios das ciências biológicas e das engenharias para o desenvolvimento de biomateriais e/ou técnicas regenerativas que melhorem e/ou restaurem a função tecidual comprometida. (BOROJEVIC, 2008; ARMENTANO et al., 2010)

Trata-se de uma área de extrema relevância para a qualidade de vida da população, devido às modificações demográficas e sociais observadas nas últimas décadas. Essas são caracterizadas, principalmente, pelo aumento progressivo da expectativa de vida das populações humanas, que gera a necessidade de garantir cada vez mais um padrão de vida compatível com custo econômico e qualidade social aceitáveis. Ademais, atualmente, há uma maior exposição a lesões

traumáticas por parte da população jovem, com maior frequência em regiões de alta densidade populacional. (SALGADO; COUTINHO; REIS, 2004; BOROJEVIC, 2008; PAULA et al., 2009)

Dentro deste campo, tem-se a BTO, cujo objetivo é reestabelecer a estrutura, mas, sobretudo, a funcionalidade do tecido ósseo. Para tanto, é preciso entender a estrutura óssea, sua mecânica e desenvolvimento. (AMINI; LAURENCIN; NUKAVARAPU, 2012) Nesse sentido, enxertos ósseos podem ser utilizados com esta finalidade.

Os enxertos podem ser classificados em:

(1) *Autógeno*. É obtido de um sítio doador do próprio paciente. (DALAPICULA et al., 2006) Devido a este fator, tem alta biocompatibilidade e baixa imunogenicidade. Ainda, possui todas as propriedades requeridas para um enxerto ósseo – osteocondução, osteoindução, osteogênese – por isso é considerado o padrão-ouro para implantes ósseos. Entretanto, algumas limitações dificultam o seu uso, como o aumento da morbidade e a necessidade de uma segunda cirurgia, fato que pode trazer danos ao paciente, como hemorragia, infecção e dor crônica. (AMINI; LAURENCIN; NUKAVARAPU, 2012)

(2) *Aloenxerto* ou *enxertos homogêneos*. É obtido de doadores da mesma espécie, como exemplo, banco de ossos humanos. (DALAPICULA et al., 2006) São biocompatíveis, porém podem estar associados a reações imunológicas e transmissão de infecções, além de terem alto custo. (AMINI; LAURENCIN; NUKAVARAPU, 2012) Para serem utilizados, os aloenxertos são submetidos a alguns tratamentos: congelamento e desidratação (FDBA – *Freezer Dried Bone Allograft*) ou desmineralização, congelamento e desidratação (DFDBA – *Demineralized Freezer Dried Bone Allograft*), a fim de diminuir seu potencial imunogênico, porém, como consequência, diminui seu potencial osteoindutor. (DALAPICULA et al., 2006) Devido a todos estes, fatores sua utilização é limitada.

(3) *Xenoenxerto* ou *enxertos heterogêneos*. São obtidos de doadores de outras espécies, tipicamente de origem bovina. Assim como os aloenxertos, têm potencial imunogênico e podem transmitir doenças virais e por isso devem passar por tratamentos (FDBA e DFDBA). Além disso, tem sua oferta limitada pela falta de volume suficiente para a implantação. (HSIONG; MOONEY, 2006)

(4) *Aloplásticos* ou *Sintéticos*. Tem origem sintética e surgiu para superar as limitações dos enxertos citados acima. De início, o objetivo era a produção de biomateriais bioinertes, ou seja, que fornecessem apenas o suporte mecânico para o local de implante. Com o passar do tempo, identificou-se que a utilização desses biomateriais tinha limitações, uma vez que não se integravam ao tecido adjacente e necessitavam de substituições futuras. (HSIONG; MOONEY, 2006)

Os biomateriais que podem ser utilizados na BTO são definidos como qualquer material, natural ou sintético, que possa ser usado como arcabouço, de forma temporária ou definitiva, como parte de um sistema que objetiva restaurar ou substituir qualquer tecido, órgão e função do corpo. (LAVIK; LANGER, 2004) Eles podem ser subdivididos quanto a sua composição: metálicos; cerâmicos; poliméricos, naturais ou sintéticos; e compósitos – associação de dois ou mais tipos diferentes de biomaterial. (LAVIK; LANGER, 2004)

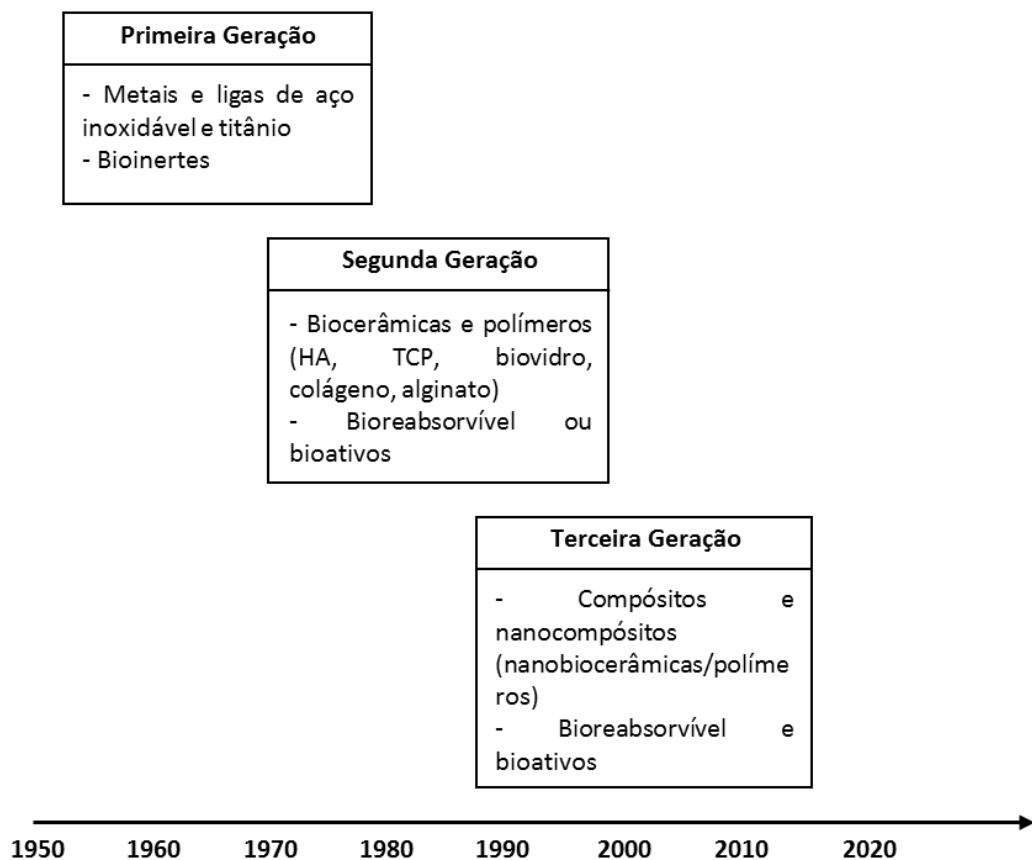
Algumas propriedades são essenciais aos biomateriais, conforme se detalha a seguir: (a) osteocondutividade: o biomaterial serve como arcabouço para a deposição de novo osso, bem como para a invasão e proliferação de vasos sanguíneos e células progenitoras de tecidos adjacentes (DALAPICULA et al., 2006; BHATT; ROZENTAL, 2012); (b) osteoindutividade: neste caso, o biomaterial consegue estimular a osteogênese por meio da diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, em regiões ectópicas (DALAPICULA et al., 2006; BHATT; ROZENTAL, 2012); e (c) osteogenicidade: o biomaterial osteogênico carrega consigo células ósseas viáveis, as quais reforçarão a formação e o desenvolvimento ósseo. (DALAPICULA et al., 2006; BHATT; ROZENTAL, 2012)

Os biomateriais evoluíram ao longo do tempo e de acordo com as modificações em suas propriedades foram definidos como de primeira, segunda ou terceira geração (Figura 1). Esta divisão caracteriza a sua evolução mas não necessariamente de forma cronológica e sim conceitual. A primeira geração consistiu em materiais bioinertes, uma vez que se acreditava que os biomateriais deveriam ter reação mínima com o tecido ao qual foi implantado; a segunda geração consiste em biomateriais bioativos ou biodegradáveis; e a terceira, em biomateriais produzidos com o intuito de estimular respostas celulares específicas. (NAVARRO et al., 2008)

Os biomateriais considerados bioinertes são estáveis e ao serem implantados *in vivo* causam mínima reação tecidual. Ocorre a formação de uma fina camada de tecido fibroso que reveste o biomaterial e impede sua interação direta com o tecido circundante. (DALAPICULA et al., 2006; BEST et al., 2008; LONG et al., 2008; BHATT; ROZENTAL, 2012)

Para ser considerado bioreabsorvível, o biomaterial deve ser degradado após a implantação. Esta degradação é paralela à formação de novo osso. Por isso, a taxa de reabsorção deve coincidir com a taxa de formação, de forma a garantir força e desempenho mecânico adequado à área reparada. (DALAPICULA et al., 2006; LONG et al., 2008; DOROZHKIN, 2009) Já os biomateriais bioativos estabelecem uma ligação direta com o tecido adjacente, além de estimular a proliferação de células, a síntese de fatores específicos e a adesão celular. (DALAPICULA et al., 2006; LONG et al., 2008)

Figura 1 - Esquema da evolução dos biomateriais na substituição óssea



Fonte: Adaptado de Murugan e Ramakrishna (2005)

Nos últimos anos, tem-se a quarta geração de biomateriais. Esta seria composta por nanocompósitos, produzidos com o intuito de mimetizar o tecido ao qual será implantado. Isto ocorreria por meio da associação de nanocompósitos (biocerâmicas/polímeros) com células e fatores estimuladores da regeneração. (MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005)

Por volta da década de 1960, as biocerâmicas começaram a ser utilizadas em aplicações ortopédicas. As principais utilizadas são alumina, zircônia, fosfatos de cálcio, como por exemplo, HA, α e β -fosfato tricálcico e biovidros. Estes materiais apresentam alta resistência à compressão, propriedades anticorrosivas, biocompatibilidade e interações com o tecido vivo. Alguns têm baixa resistência mecânica à fratura e ao impacto, o que limita sua aplicação clínica. (AZA; AZA; AZA, 2005)

De acordo com as características físico-químicas, as biocerâmicas podem ser classificadas em três tipos: (1) cerâmicas bioinertes; (2) cerâmicas reabsorvíveis bioativas; e (3) cerâmicas de superfície bioativa. (OONISH et al., 1999) Estas últimas têm se destacado na área da BTO devido à sua bioatividade, com destaque para a HA.

Os biomateriais poliméricos são biocompatíveis e biodegradáveis, com propriedades físicas e mecânicas adequadas à utilização na bioengenharia tecidual e amplitude de aplicações médicas (GARG et al., 2012), como a encapsulação de células, liberação controlada de fármacos, indústria alimentícia, cosméticos e bioengenharia tecidual. Podem ser classificados em sintéticos e naturais. Os principais sintéticos são o poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), polianidrido, policaprolactona (PCL), poli(álcool vinílico) (PVA) e poli(hidroxiethylmetacrilato). (GARG et al., 2012; SOHRABI; HESARAKI; KAZEMZADEH, 2013) E os principais naturais são o alginato, o colágeno, a gelatina, pectina, quitosana, fibrina, entre outros. (GARG et al., 2012) Os polímeros sintéticos, quando comparados aos naturais, têm custo mais alto e maior potencial antigênico. (SINGH, 2010)

Alguns polímeros, quando expostos a fatores definidos, têm a propriedade de formar hidrogéis. (RINAUDO, 2008) Estes hidrogéis são semelhantes à rede da MEC *in vivo* e esta similaridade favorece sua utilização nas aplicações biomédicas. (HUNT; GROVER, 2010; YANG; XIE; HE, 2011; LEE; MOONEY, 2012) Outro fator é

que estes hidrogeis, ao formar compósitos, podem facilitar a aplicação de outros biomateriais, como as biocerâmicas.

2.2.1 Propriedades físico-químicas dos biomaterias

A BTO requer que o osso recém formado possa, além de integrar-se e restaurar a estrutura óssea, devolver a funcionalidade necessária ao tecido ósseo lesionado. Para tanto, os biomateriais utilizados precisam ser, biocompatíveis, osteoindutores, osteocondutores e osteogênicos. (AMINI; LAURENCIN; NUKAVARAPU, 2012; BHATT; ROZENTAL, 2012; CATAURO et al., 2013)

A biocompatibilidade está relacionada com o comportamento celular após contato do biomaterial com o tecido ao qual foi implantado. (CATAURO et al., 2013) Para ser biocompatível, o biomaterial pode desencadear uma reação inflamatória aceitável e também interagir e integrar-se ao tecido circundante. Entretanto, se o biomaterial promover uma reação imunológica ou inflamatória prejudicial ao tecido adjacente, não será biocompatível. (GARG et al., 2012) Por este motivo estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* se tornam indispensáveis para garantir a biocompatibilidade do biomaterial e sua posterior utilização clínica.

Identificar a composição, porosidade, densidade, nível de entrelaçamento dos cristais, formato e tamanho das partículas dos biomateriais é de extrema importância, uma vez que estas características afetam a capacidade de dissolução desses biomateriais e sua atividade nos tecidos. (COSTA et al., 2003; ROSENGREN et al., 2003; HABIBOVIC et al., 2008; AMINI; LAURENCIN; NUKAVARAPU, 2012)

Os biomateriais podem ser produzidos em diversos formatos e isto irá direcionar a sua aplicação *in vivo*. Este fator influi sobre a resposta tecidual ao biomaterial e, quando relacionado ao tamanho da partícula, torna-se crucial para o seu potencial osteogênico. O formato e o tamanho da partícula têm relação direta com a área de superfície disponível para reagir com células e fluido biológico. (OONISH et al., 1999)

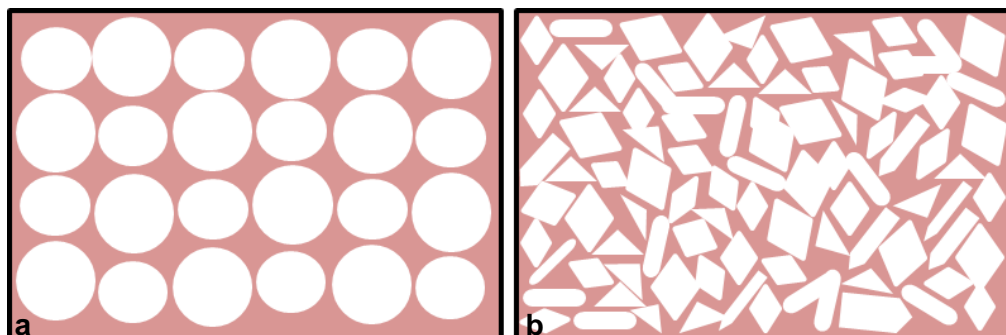
O formato de microesferas apresenta grande vantagem de aplicação, já que podem ser implantadas por meio de técnicas cirúrgicas minimamente invasivas.

(BARRIAS et al., 2005) Além do que, ao serem implantadas *in vivo*, as microesferas favorecem a formação de um interstício que possibilita a difusão de micronutrientes e fatores de crescimento, migração, proliferação e diferenciação celular, além de angiogênese (Figura 2a). Entretanto, isto pode ocorrer em menor ou maior grau quando relacionado à distribuição de tamanho da partícula, ou seja, defeitos ósseos preenchidos com microesferas, com grande variação na distribuição de tamanho, terão menor área intersticial, já que as partículas menores ocuparão os intervalos entre as partículas maiores. (VOGEL et al., 2001)

Quando os biomateriais possuem formato de grânulos, a organização das partículas no local de implante é bem diferente, uma vez que elas irão se agrupar em um arranjo espacial semelhante a um mosaico e, assim, diminuir quase que por completo o interstício entre elas (Figura 2b). A redução quase completa do interstício é fator determinante na resposta ao biomaterial, pois interfere na migração celular observada durante o reparo. Contudo, o arranjo dos grânulos aumenta a área de superfície do interstício, o que garante maior superfície para atividades celulares.

Em relação ao tamanho da partícula, as considerações são semelhantes às aquelas descritas para as microesferas. A grande variação de tamanho entre as partículas faz com que os grânulos menores ocupem os espaços entre as partículas maiores. Isto reduz o interstício e o potencial regenerativo, devido à obstrução do espaço necessário para a migração celular e formação vascular. (VOGEL et al., 2001)

Figura 2 - Esquema da organização espacial de biomateriais com formato de (a) microesferas e (b) grânulos



Fonte: Elaborada pela autora

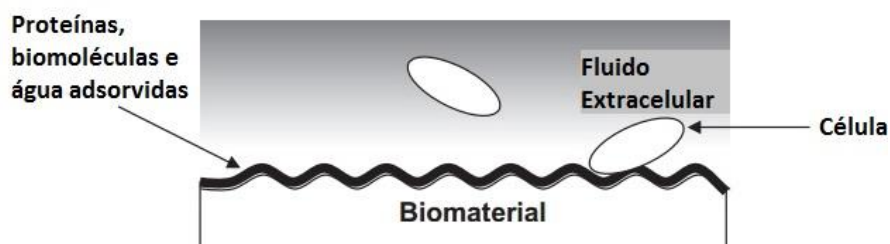
Outros fatores, como superfície e porosidade do biomaterial, influenciam, principalmente para a migração, adesão, espraiamento de células e angiogênese.

Uma superfície rugosa facilita a migração e aderência da célula sobre o biomaterial, bem como a presença de poros permite a angiogênese e a difusão de nutrientes dentro do biomaterial. (DOROZHKIN, 2009; BHATT; ROZENTAL, 2012) Entretanto, é válido destacar que este comportamento dependerá do tamanho dos poros e da quantidade de rugosidades.

O tamanho ideal dos poros ainda é muito discutido. Segundo Karageorgiu e Kaplan (2005), poros menores que 200 μm possibilitam a migração de osteoblastos e formação óssea limitada às bordas da lesão, pelo fato de a difusão de nutrientes e oxigênio não atingirem o centro do defeito. Todavia, Volkmer e colaboradores. (2008) afirmaram que biomateriais com poros maiores de 300 μm estimulam a migração e proliferação de osteoblastos e vasos sanguíneos.

A interação entre tecido hospedeiro e a superfície do biomaterial é dinâmica e direcionada pelas propriedades físico-químicas do biomaterial. Após a implantação, à superfície do biomaterial serão adsorvidas proteínas, biomoléculas e água, que favorecerão a formação de uma camada denominada matriz provisória (Figura 3). (ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008) Isto ocorre porque a maioria dos biomateriais é hidrofóbica e tem uma alta afinidade com uma ampla variedade de proteínas. (THEVENOT; HU; TANG, 2008) O modo pelo qual estas células irão interagir com a matriz provisória direcionará a resposta celular ao biomaterial. (KURELLA; DAHOTRE, 2005)

Figura 3 - Interface tecido circundante-biomaterial

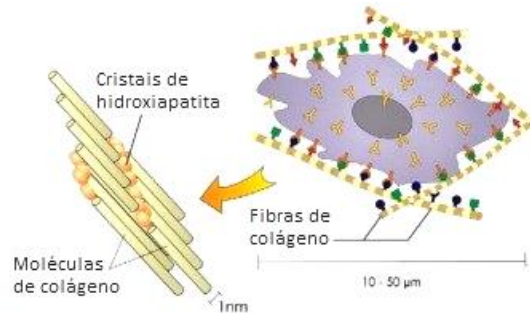


Fonte: Adaptado de Kurella e Dahotre (2005)

A terceira geração desses biomateriais já começa a dar destaque a materiais com componentes nanométricos, uma vez que os principais constituintes do tecido ósseo têm nanômetros de diâmetro (Figura 4), bem como a maioria dos constituintes moleculares do corpo. Assim, fica evidente que as interações de células, proteínas,

entre outros, serão melhores em biomateriais com constituintes nanométricos, além de que estes podem ser fator crítico para a osteoindutividade. (HARVEY; HENDERSON; VENGALLATORE, 2010)

Figura 4 - Organização nanoestrutural do tecido ósseo



Em (a) nota-se um osteoblasto e sua interação com as fibras de colágeno; em (b), observa-se os cristais de HA depositados na região de GAP/overlap da molécula de colágeno. **Fonte:** Adaptado de Stevens (2008)

Utilizar biomateriais nanoestruturados aumenta a área de superfície e a sua rugosidade. (THORWARTH et al., 2005; AMINI; LAURENCIN; NUKAVARAPU, 2012) Estas propriedades podem estimular a formação óssea e também aumentar a integração osso-biomaterial, o que favorece a regeneração óssea. (AMINI; LAURENCIN; NUKAVARAPU, 2012)

2.2.2 Hidroxiapatita

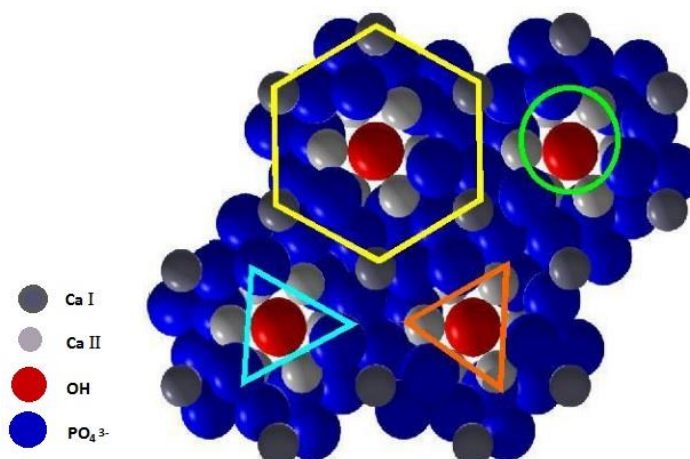
A utilização de biocerâmicas como biomaterial data do ano 1894, quando o gesso foi descrito como possível substituto ósseo. Desde então, aumentou-se a quantidade de biomateriais biocerâmicos, tal como sua utilização na prática clínica. As biocerâmicas a base de fosfato de cálcio são classificadas de acordo com sua razão molar Ca/P (Quadro 1). (ARAÚJO, 2006)

Quadro 1 - Classificação dos fosfatos de cálcio quanto a sua relação Ca/P

Nome do composto	Fórmula química	Ca/P
Hidrogeno fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Pirofosfato de cálcio dihidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Fosfato de octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Fosfato de cálcio (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67

Fonte: Adaptado de Araujo (2006)

Em 1926, De Jong relatou a semelhança entre os padrões de difração de raios-X da fase mineral do osso e da HA. A HA tem fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Figura 5) e é composta, em média, de 39,68% em peso de Ca e 18,45% em peso de P, com uma relação molar Ca/P de 1,667. (BEST et al., 2008) Isto garante composição química semelhante à do componente mineral ósseo. (WOODARD et al., 2007)

Figura 5 - Representação da estrutura cristalina da hidroxiapatita no modelo de esferas rígidas

O hexágono amarelo consiste nos íons hidroxilas (esferas vermelhas) localizados nos cantos da célula, rodeados por dois grupos de cálcio (Ca I - esferas cinza escuro, Ca II – esferas cinza claro) e por dois grupos de PO_4^{3-} tetraédricos (esferas azuis). Os átomos de cálcio II e os grupos PO_4^{3-} estão arranados em posições triangulares, triângulo laranja e vermelho, respectivamente. Fonte: Adaptado de Lacerda (2005)

Devido à sua biocompatibilidade, osteocondutividade e bioatividade, a HA tem obtido bastante destaque no âmbito científico e clínico, como um importante recurso para a substituição óssea. (MOREIRA et al., 2003; WOODARD et al., 2007) Além disso, promove a adesão dos osteoblastos, migração, diferenciação e proliferação celular e não é tóxica ao tecido. (MOREIRA et al., 2003)

Esta biocerâmica é termodinamicamente estável em pH fisiológico e sua superfície tem a capacidade de trocar íons com o meio, o que permite o equilíbrio entre o biomaterial e o osso. Além disso, as interações químicas com ligações do tipo dipolo fazem com que as moléculas de água, proteínas e colágeno sejam adsorvidas nessa superfície e induzam a regeneração óssea tecidual. (VOLKMER; SANTOS, 2007) Estas características garantem a HA pouca reação tecidual tóxica e uma ligação química íntima com o osso adjacente. (MOREIRA et al., 2003)

A reatividade superficial da HA influi sobre a capacidade de ligação do biomaterial com o tecido ósseo e também sobre a formação óssea no local de implante. (DOROZHKIN, 2009) Na interface biomaterial-osso há uma série de reações químicas que levam à formação de uma camada, biologicamente ativa, de hidroxiapatita carbonatada. Esta camada equivale tanto na composição química, quanto na estrutura, à fase mineral do tecido ósseo e é responsável pela forte ligação da HA com o tecido adjacente. (AZA; AZA; AZA, 2005; AZA et al., 2007)

Quando sintetizada, a HA permite substituições iônicas nos sítios de Ca^{+2} , PO_4^{-3} e OH^- . Estas substituições modificam a rede cristalina, a solubilidade e a estabilidade térmica dessa biocerâmica, além de influir sobre o comportamento do biomaterial quando em contato com o meio fisiológico. (BEST et al., 2008) As possíveis substituições estão listadas no Quadro 2.

Quadro 2 - Possíveis substituições iônicas nos sítios de Ca^{+2} , PO_4^{-3} e OH^-

Sítio Ca^{+2}	Sítio PO_4^{-3}	Sítio OH^-
Mg^{+2}	CO_3^{-2}	F^-
Zn^{+2}	SiO_4^{-4}	Cl^-
Sr^{+2}	HPO_4^{-2}	CO_3^{-2}
Ag^+		

Fonte: Elaborado pela autora

As aplicações da HA são diversas, entre elas preenchimento de cavidades e recobrimento de implantes metálicos. Entretanto, apesar do potencial da HA como substituto ósseo, aplicações clínicas são limitadas devido ao seu comportamento frágil e reabsorção lenta. (BENAQQA et al., 2005) Assim, no desenvolvimento da HA deve-se levar em consideração as características físico-químicas que irão influenciar no seu mecanismo de degradação. (GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005)

Existem duas formas para obtenção de pós cerâmicos: a via seca e a via úmida. O processo de via úmida tem relativa simplicidade, permite maior controle das condições de síntese e a obtenção de um biomaterial homogêneo, reativo e de composição estequiométrica mais bem definida. (RHEE, 2002; VARMA; BABU, 2005) Somado a isto, a HA pode ser sintetizada em altas temperaturas e em baixas temperaturas. As primeiras apresentam alta cristalinidade e as segundas baixa cristalinidade. Quando sintetizada por via úmida e em baixas temperaturas, a HA se apresenta mais similar à fase óssea, quando comparada com a HA sinterizada. (ARAUJO, 2006)

A HA pode ser produzida densa ou porosa, em formato de *scaffolds*, pós, microesferas, grânulos, pastas, para preenchimento ou recobrimento de superfícies. (BEST et al., 2008)

A biodegradação desse tipo de biomaterial depende diretamente da sua densidade ou sua porosidade. HA densa possui resistência à compressão suficiente para proporcionar a estabilidade inicial à nova formação óssea. (REZWAN et al., 2006) Já a HA porosa permite o aumento da área de superfície e do potencial angiogênico desse biomaterial. Por conseguinte, pode favorecer a melhor integração do biomaterial ao tecido adjacente. (KARAGEORGIU; KAPLAN, 2006; HABIBOVIC et al., 2008) Em ambas as formas, densa ou porosa, a taxa de biodegradação deve ser compatível com a taxa de formação óssea. (HABIBOVIC et al., 2008)

Nos últimos anos, a produção de nanobiomateriais para a regeneração de tecido ósseo, como os nanocompósitos (nanohidroxiapatita associada a polímeros), e as nanocerâmicas (hidroxiapatita e a alumina), tem demonstrado boas propriedades mecânicas e aumento da adesão celular. (KLENKE et al., 2008) Esses fatores são indispensáveis para a neoformação tecidual. Uma nano HA pode influenciar positivamente sobre a resposta tecidual após seu implante, uma vez que há aumento da sua área superficial e isto influencia diretamente sua solubilidade.

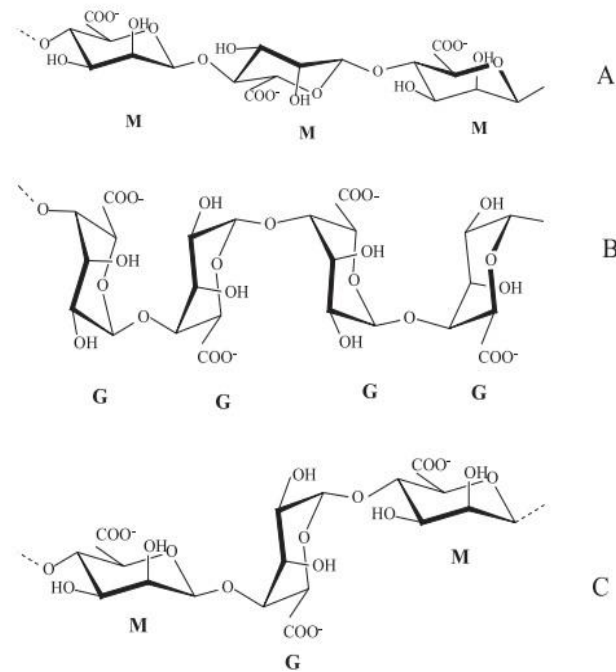
Sem menos importância, estas partículas nanométricas interagem melhor com o meio fisiológico e reforçam a adsorção de proteínas e adesão de células. (KIM et al., 2006)

2.2.3 Alginato

O alginato é um biopolímero obtido a partir de algas marrons (*Phaeophyceae*), dentre estas *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera*. (RINAUDO, 2008; YANG; XIE; HE, 2011; LEE; MOONEY, 2012) Pode ser sintetizado também por bactérias, como *Azotobacter* e *Pseudomonas*, porém difere do alginato presente nas algas por ser mais acetilado. (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; SILVA, 2008)

O termo “alginato” refere-se a um grupo de polissacarídeos encontrados na parede celular e nos espaços intracelulares de algas marinhas marrons e sua função é conferir rigidez e flexibilidade à parede celular. Existe naturalmente como um sal misto de cálcio-sódio-potássio do ácido algínico. (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; SILVA, 2008) É constituído por unidades de ácido β -D-manurônico (blocos M) e α -L-gulurônico (blocos G), dispostas num padrão irregular e interligadas por ligações 1,4-glicosídicas (Figura 6). (YANG; XIE; HE, 2011)

A razão entre ácido manurônico e gulurônico é em média 1,5, entretanto, esta proporção, bem como o comprimento de cada um dos blocos (M e G), variam a depender da fonte de obtenção do alginato. (LEE; MOONEY, 2012; PAWAR; EDGAR, 2012; SANTANA et al., 2013) Essa variação na composição, sequência, no comprimento e peso molecular do alginato irão interferir diretamente nas propriedades físicas do polímero e nos seus hidrogéis. (LEE; MOONEY, 2012)

Figura 6 - Estrutura dos blocos da molécula de alginato

Nota-se em (A) blocos homopoliméricos M-M-M; (B) blocos homopoliméricos G-G-G; (C) blocos heteropoliméricos M-G-M-G. **Fonte:** Adaptado de Garcia-Cruz, Foggetti e Silva (2008)

Como um biomaterial, o alginato possui muitas vantagens: é biocompatível, não tóxico, não imunogênico, biodegradável e hidrofílico. (AUGST; KONG; MOONEY, 2006) Ademais, na presença de cátions divalentes, como o cálcio (Ca^{+2}), o alginato forma hidrogéis biocompatíveis que podem ser implantados no corpo de forma minimamente invasiva. (LEE; MOONEY, 2012)

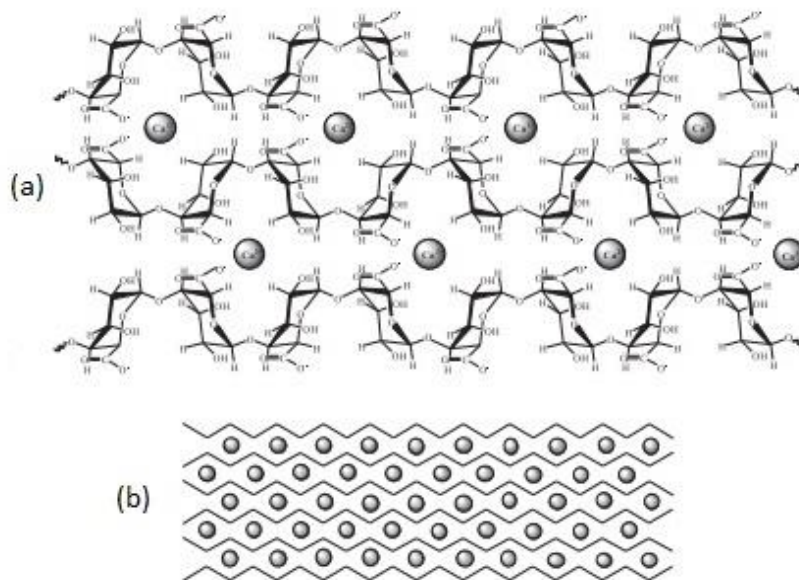
Devido às suas propriedades, o alginato tem sido amplamente utilizado, com destaque para sua utilização como meio de cultura bacteriano, espessante para indústria alimentícia, matéria-prima para produção de microcápsulas carreadoras de fármacos e como arcabouços artificiais para engenharia de tecidos. (ANDRADE, 2006; YANG; XIE; HE, 2011; SANTANA et al., 2013) O alginato de sódio é o composto mais usado. Ele se torna insolúvel na presença de cátions divalentes e forma hidrogéis rígidos. Entretanto, a força desse gel dependerá do cátion divalente utilizado. (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; SILVA, 2008)

Os polímeros naturais que formam hidrogéis têm destaque sobre os outros, uma vez que têm propriedades macromoleculares similares a MEC. (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; SILVA, 2008) Os hidrogéis são redes reticuladas tridimensionais compostas de polímeros hidrófilos com elevado teor de água. (YANG; XIE; HE, 2011;

LEE; MOONEY, 2012) Acredita-se que, para o alginato, apenas os blocos G participam da ligação com os cátions. (LEE; MOONEY, 2012)

A formação do hidrogel ocorrerá quando o alginato for submetido à solução com concentração do cátion divalente, como exemplo o Ca^{+2} . Neste momento, ocorrerá ligação do Ca^{+2} com o grupo carboxila funcional dos blocos G da cadeia polimérica (Figura 7a). Esses grupos se empilham e formam uma estrutura similar a uma caixa de ovo (Figura 7b). (LIN; YEH, 2004) Essa sua capacidade de responder a cátions de cálcio o qualifica como um material muito promissor para utilização na bioengenharia tecidual óssea.

Figura 7 - Formação do hidrogel de alginato de cálcio



Em (a) os cátions Ca^{+2} se ligam com o grupo carboxila funcional dos blocos G da cadeia homopolimérica; em (b) formação da rede de gel com cadeias homopoliméricas unidas através dos íons cálcio. **Fonte:** Adaptado de Kawaguti e Sato (2008)

Os hidrogéis, formados a partir do alginato, têm uma degradação mais rápida que seu composto. Por consequência, *in vivo*, estes biomateriais dão espaço para formação de um novo tecido de forma mais rápida, devido a sua degradação. Entretanto, muitas estratégias – métodos físicos e/ou químicos – podem ser utilizadas pra modificar a degradabilidade do alginato. (AUGST; KONG; MOONEY, 2006) Esta é uma grande vantagem desse polímero, já que um dos requisitos para os biomateriais utilizados na BTO é a possibilidade de moldar propriedades específicas. (AUGST; KONG; MOONEY, 2006)

2.2.4 Compósitos de fosfato de cálcio e polímero

O tecido ósseo, como dito anteriormente, é um compósito formado em sua maioria por colágeno e cristais de HA, fase orgânica e inorgânica, respectivamente. (BEST et al., 2008) Os avanços da BTO têm possibilitado o desenvolvimento de biomateriais compósitos que mimetizam essa estrutura, ao associar biomateriais orgânicos e inorgânicos, e, desta forma, aprimorar as suas características físico-químicas. (PAULA, 2008; TANNER, 2010)

Dentre os diversos biomateriais, os polímeros são muito utilizados para possíveis associações com fosfatos de cálcio. (PAULA, 2008) Estes compósitos são materiais promissores a BTO, uma vez que sua composição pode mimetizar a composição óssea, além de associar a bioatividade do fosfato de cálcio à resistência do polímero. (KIM et al., 2006; TANNER, 2010)

Atualmente, uma alternativa para reduzir a fragilidade da HA e melhorar suas propriedades mecânicas é associá-la com polímeros. (TORRES et al., 2013) Este compósito mimetiza a superfície e/ou as propriedades químicas do osso, bem como garante maior adesão celular e crescimento de células; em consequência, pode estimular a formação de tecido ósseo. (LEE; MOONEY, 2012; HAN et al., 2013)

O alginato de sódio, polímero natural, quando associado à HA, estabelece interações iônicas com íons Ca^{+2} (ROLIM, 2010; LEE; MOONEY, 2012), aumenta a resistência do biomaterial a agentes químicos e ao estresse mecânico. Este compósito é biocompatível, biodegradável e apresenta boa adesão celular, o que o destaca como um biomaterial de grande relevância clínica. (MAZUMDER et al., 2009; ROLIM, 2010)

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o potencial osteogênico de biomateriais compósitos de fosfato de cálcio e alginato para o reparo ósseo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar histomorfologicamente a resposta tecidual após implantação em defeito ósseo crítico de biomateriais compósitos de hidroxiapatita e alginato;
- Avaliar o efeito da composição dos biomateriais compósitos de hidroxiapatita e alginato, para o reparo ósseo;
- Avaliar a influência do formato dos biomateriais, microesferas ou grânulos, para o reparo ósseo.

Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este experimento foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas no Uso de Animais (CEUA), do Instituto de Ciência da Saúde (ICS), da Universidade Federal da Bahia (UFBA) (PROTOCOLO N°038/2012 – Anexo A) e seguiu as Normas Éticas de Pesquisas em Animais (Lei n°. 11.794 de 2008), as Normas Nacionais de Biossegurança e as diretrizes do Instituto Nacional de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (NIH Publicação n ° 85-23, Rev. 1985), bem como, as normas de Biossegurança do Biotério Central da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), no qual foram realizados os procedimentos cirúrgicos deste estudo.

4.1 AMOSTRA

Foram utilizados 15 ratos da linhagem *Wistar*, machos adultos, com massa corpórea entre 350 e 400g e idade aproximada de 4 a 5 meses, fornecidos, criados e mantidos pelo biotério da UEFS. Os animais foram mantidos em caixas de propileno, forradas com maravalha autoclavada e identificadas conforme grupo, ponto biológico, data da cirurgia e do sacrifício, peso do animal e nome do pesquisador. Também receberam ração sólida¹ e água *ad libitum*, durante todo o experimento.

Os animais foram distribuídos para a composição de 3 grupos experimentais, avaliados no ponto biológico de 15 dias de pós-operatório (Quadro 3):

- **Controle** – defeito ósseo vazio, sem implantação de biomaterial;
- **Grupo GHAalg** – grupo com defeito preenchido com grânulos de hidroxiapatita associado ao alginato;
- **Grupo EHAalg** – grupo com defeito preenchido com microesferas de hidroxiapatita e alginato.

¹ Nuvital®

Quadro 3 - Número de animais de acordo com o grupo experimental e ponto biológico

Ponto Biológico Grupo experimental	15 dias
Controle	5
GHAalg	5
EHAalg	5
TOTAL	15

Fonte: Elaborado pela autora

4.2 BIOMATERIAIS

Nesta seção, será apresentado o método de síntese dois biomateriais utilizados neste estudo, grânulos de hidroxiapatita associados ao alginato e microesferas de hidroxiapatita associadas ao alginato.

4.2.1 Grânulos de HA associado ao alginato (GHAalg)

Os grânulos de HA associado ao alginato (Figura 8), utilizados neste estudo, foram preparados e cedidos pelos pesquisadores do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF – RJ), sob supervisão do Prof. Dr. Alexandre Malta Rossi.

Figura 8 - Grânulos de HAalg acondicionados em tubos plásticos do tipo *ependorfs*

Fonte: Foto da autora

A síntese da HA foi realizada por meio da mistura de uma solução de fosfato de amônio dibásico $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$, mantida em pH superior a 12, a uma solução que continha nitrato de cálcio $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2]$. Este composto foi mantido sob agitação

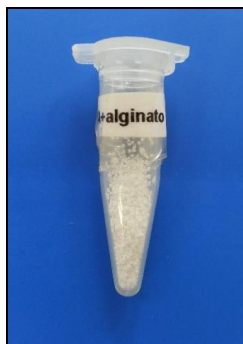
constante. O precipitado formado foi filtrado e lavado. Este foi adicionado à solução de alginato de sódio 1%, numa proporção de 15:1, e misturado em aquecimento para incorporação completa da biocerâmica na solução.

O sólido obtido foi secado em estufa a 80°C por 24h, macerado para formação dos grânulos e peneirado para seleção de grânulos com diâmetro entre 425 e 600 µm. Estes grânulos foram fracionados em partes iguais, acondicionados em tubos plásticos tipo *ependorf* e esterilizados por raios gama. Cada alíquota foi utilizada para preencher o defeito em 4 animais.

4.2.2 Microesferas de HA associada ao alginato (EHAalg)

As microesferas de HA associadas ao alginato (Figura 9) foram preparadas e cedidas pelos pesquisadores do Instituto Militar de Engenharia (IME – RJ), sob supervisão do Prof. Dr. Marcelo Henrique Prado da Silva.

Figura 9 - Microesferas de HAalg acondicionados em tubos plásticos do tipo *ependorfs*



Fonte: Foto da autora

A técnica da solução transparente foi utilizada para a síntese da HA. De início, foi realizada uma mistura por meio de agitação magnética, de solução de 0,5M de hidróxido de cálcio $[Ca(OH)_2]$, 1M de ácido láctico $[C_3H_6O_3]$ e 0,3M de ácido ortofosfórico $[H_3PO_4]$. Este último foi adicionado de forma lenta à mistura, por gotejamento. Para ajustar o pH até 12, adicionou-se uma solução de 1M de hidróxido de potássio (KOH) e esta foi mantida por 24h.

Posteriormente, a solução foi filtrada com papel próprio acoplado a uma peneira. O produto obtido foi lavado várias vezes por meio da adição de água

bidestilada, a fim de remover o KOH e neutralizar o pH da solução.

Para a formação das microesferas, foi utilizada uma solução de alginato de sódio a 1%. A HA foi adicionada a esta solução numa proporção de 15:1 e este composto foi misturado durante cinco minutos em aquecimento para incorporação completa das biocerâmicas na solução.

Foi utilizada uma seringa para recolher esta solução e gotejá-la em uma solução de 1,5M de cloreto de cálcio [CaCl₂], o que propiciou a formação de esferas devido às trocas iônicas. As esferas foram mantidas por 24h na solução. Por fim, as esferas foram removidas desta solução, lavadas em água ultrapura e submetidas ao processo de secagem por 24h.

As microesferas foram acondicionadas em tubos plásticos do tipo *ependorf* e encaminhados à esterilização por raio gama. Cada alíquota proporcionou o preenchimento do defeito crítico em 3 animais.

4.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Previamente à confecção do defeito ósseo, os animais foram submetidos à analgesia e sedação com injeção intramuscular de cloridrato de xilazina² na proporção de 0,04mL/100g de peso corporal e anestesia geral com cloridrato de cetamina³, na proporção de 0,1mL/100g de peso corporal (Figura 10). Em seguida, foram posicionados em decúbito ventral, tricotomizados na região da calvária e com posterior antisepsia do campo operatório com álcool iodado (Figura 11).

Após esta etapa, foi feita uma incisão cutânea semilunar, com lâmina de bisturi nº 15, que expos o perióstio, e por sua vez foi incisado e removido para exposição do tecido ósseo (Figura 12). Para confecção do defeito ósseo crítico circular transfixado com 8,5 mm de diâmetro e aproximadamente 0,8 mm de espessura na porção mediana da calvária, utilizou-se uma fresa trefina⁴ com 8 mm de diâmetro interno, montada em contra-ângulo, com redução de 16:1, acoplado em motor para implante⁵, a 1500 rpm (Figuras 13, 14, 15). Por fim, os biomateriais foram

² Anasedan® – CEVA

³ Dopalen® – CEVA

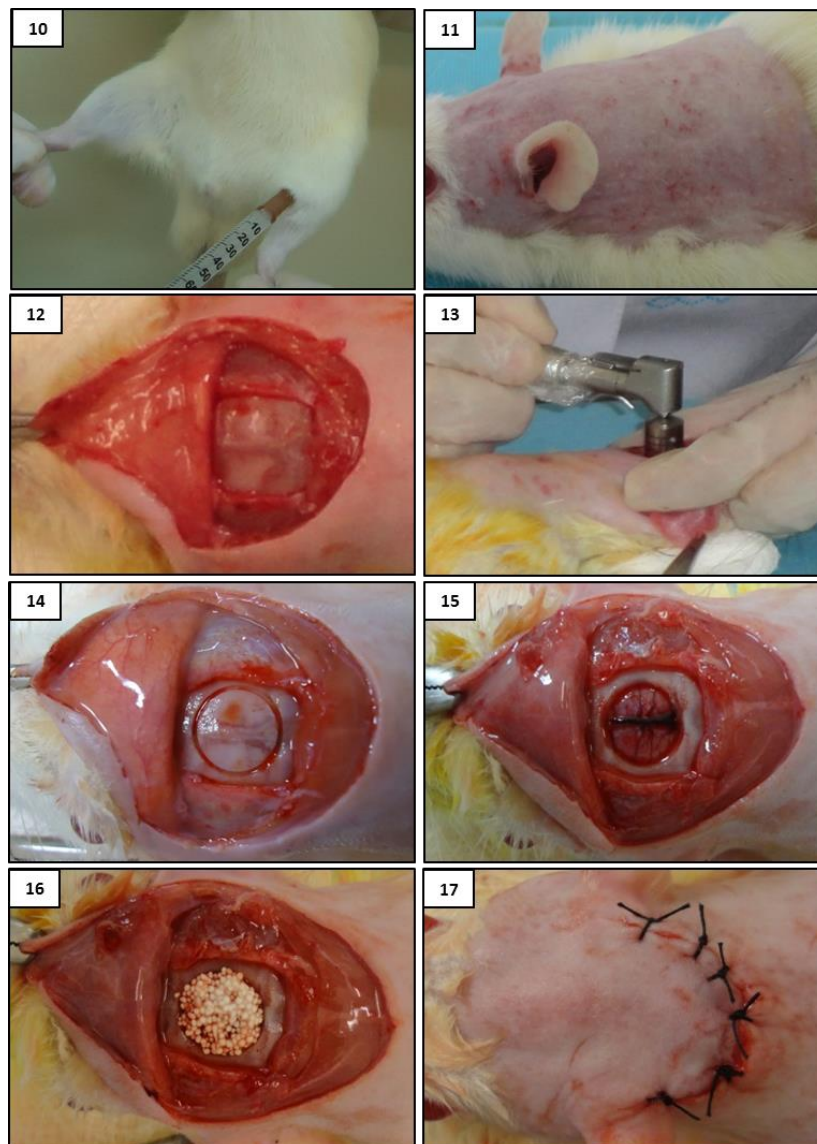
⁴ Dentoflex®

⁵ Driller® BLM 350

implantados de acordo com cada grupo pré-estabelecido (Figura 16), o retalho reposicionado e suturado com pontos interrompidos de fio de seda 4.0⁶ (Figura 17).

Posterior ao procedimento cirúrgico e de acordo com o ponto biológico de 15 dias de pós-operatório, os animais foram sacrificados pelo aprofundamento da anestesia e a porção superior da calvária foi removida, descartando-se todo tecido mole. Em seguida, os espécimes foram fixados em formaldeído a 4%, por 72 horas e enviados para o processamento histológico.

Figura 10 - Analgesia e sedação por meio de injeção intramuscular. **Figura 11**. Tricotomia da região da calvária. **Figura 12**. Tecido ósseo exposto. **Figura 13**. Confecção do defeito ósseo com fresa trefina. **Figura 14**. Demarcação do defeito ósseo na porção mediana da calvária. **Figura 15**. Defeito ósseo crítico confeccionado. **Figura 16**. Implantação do biomaterial. **Figura 17**. Sutura do retalho com pontos interrompidos.



Fonte: Fotos da autora

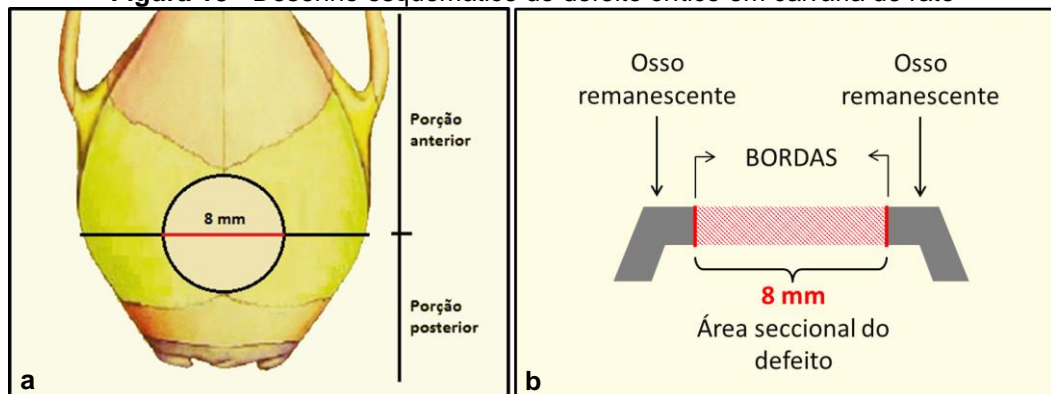
⁶ Ethicon – Johnson & Johnson®

4.4 ETAPA LABORATORIAL

Após a fixação, a calvária foi reduzida com discos de *carbúndum* nº. 409, acoplados em motor elétrico rotativo⁷, e dividida no maior diâmetro, aproximadamente 8 mm (Figura 18a). Esta divisão possibilita a visualização do defeito de borda a borda (Figura 18b).

A porção posterior foi descalcificada em ácido nítrico a 7%, processada com auxílio de um processador automático⁸ e incluídos em parafina. Os cortes obtidos foram corados em hematoxilina-eosina (HE) e picrossírius *red* (PIFG).

Figura 18 - Desenho esquemático do defeito crítico em calvária de rato



Em (a) linha de referência para o corte transversal da calvária no maior diâmetro, 8 mm; em (b) área seccional do defeito, após corte transversal. **Fonte:** (a) Adaptado de MENEIL et al., (2005); (b) Elaborada pela autora

Os cortes obtidos foram examinados por microscopia de luz comum para observação da resposta tecidual. Estes procedimentos foram realizados no Instituto de Patologia Geral e Cutânea (Ipac), Salvador, Bahia.

⁷ Dremel®

⁸ Leica®

Resultados

5 RESULTADOS

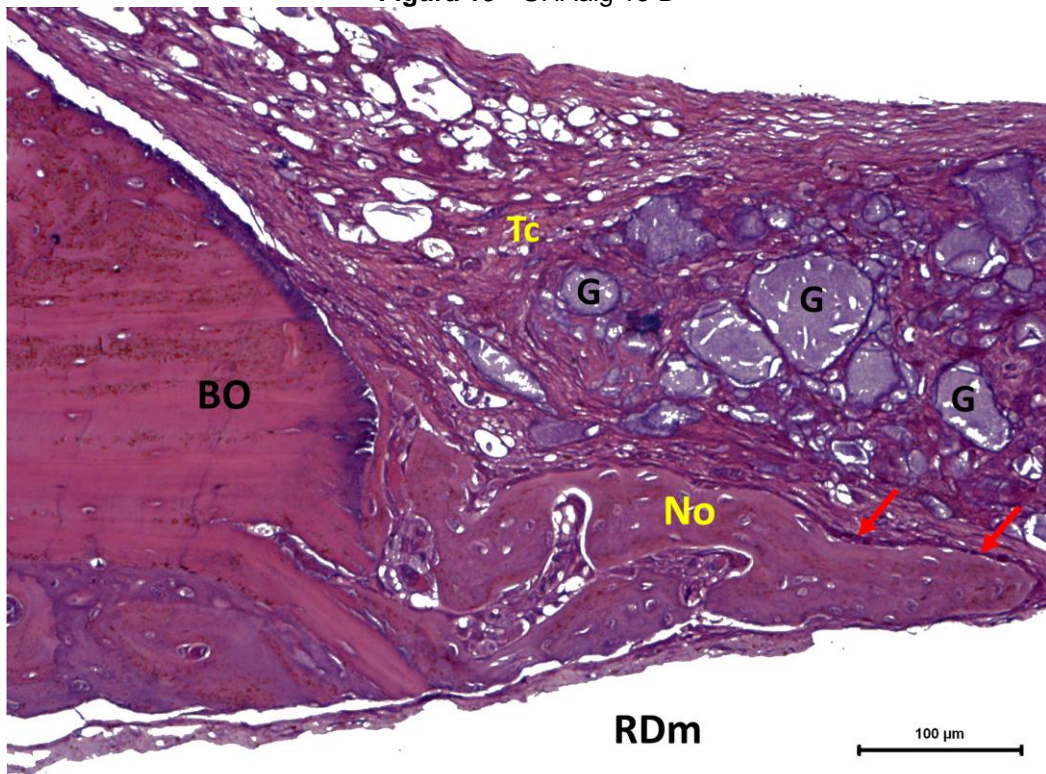
Na avaliação histomorfológica aos 15 dias, observou-se que houve neoformação óssea reacional nas bordas do defeito, em todos os grupos experimentais (Figuras 19, 20 e 21). Notou-se, também, a presença de vasos sanguíneos e osteoblastos ativos, mais predominante no grupo GHAalg. A neoformação óssea no grupo controle e EHAalg foi restrita às bordas do defeito.

Os grupos experimentais GHAalg e EHAalg tiveram toda sua extensão e, em torno de 2/3 de sua espessura, preenchida pelo biomaterial (Figuras 22 e 23). As microesferas do grupo EHAalg apresentaram-se com aspecto desforme pela desagregação de suas partículas. O grupo controle, no qual não houve implantação de biomaterial, teve seu defeito preenchido por tecido conjuntivo frouxo delgado, bem vascularizado e com proliferação de células fusiformes na região voltada à dura-máter (Figuras 24 e 25).

Na região central do defeito do grupo GHAalg, observou-se a presença de matriz osteoide. Esta não tinha contiguidade com a borda do defeito e apresentou-se em permeio e em interface direta com as partículas do biomaterial, mais próxima da dura-máter (Figuras 26, 27 e 28). Notou-se também a presença de um tecido conjuntivo mais adensado com grande quantidade de células fusiformes na região voltada ao perióstio, na qual houve menor deposição de matriz osteoide. O interstício formado pela intersecção das microesferas do grupo EHAalg caracterizou-se por delgados septos de tecido conjuntivo que circundaram estas microesferas (Figura 29).

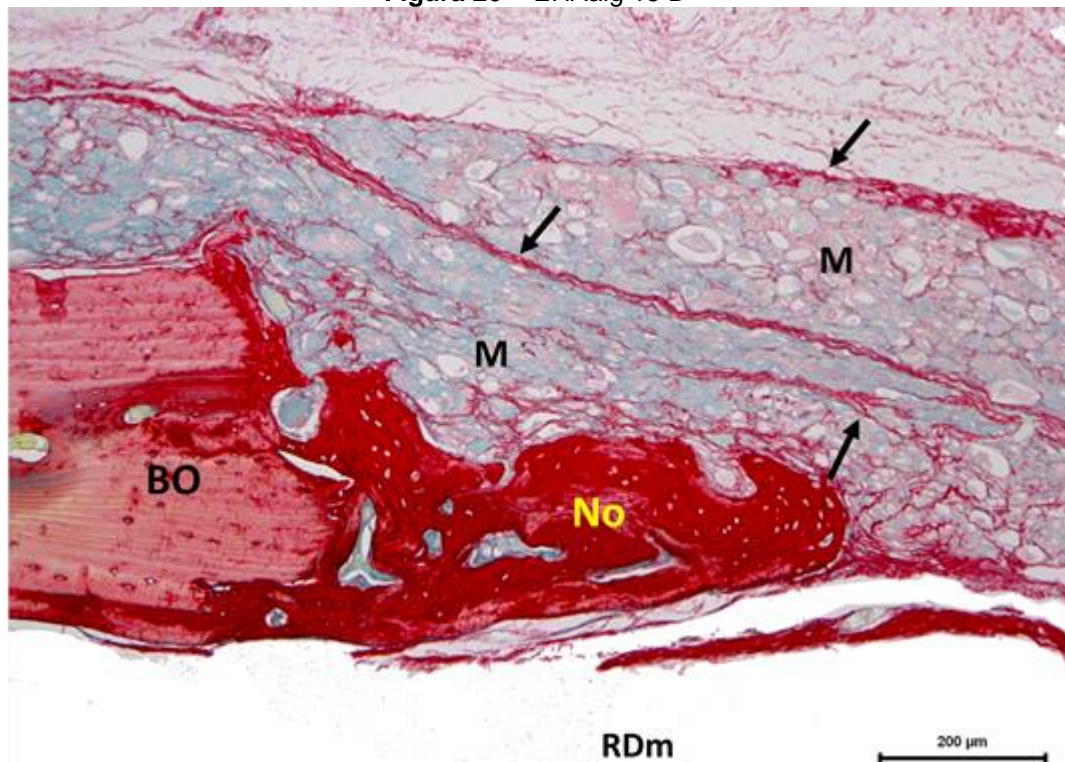
Nos grupos experimentais, observou-se inflamação crônica granulomatosa. Esta se caracterizou pela presença de células gigantes multinucleadas e um discreto infiltrado inflamatório linfocitário (Figuras 30 e 31). No grupo EHAalg, esta foi observada em permeio às partículas do biomaterial. O grupo controle apresentou uma inflamação crônica, caracterizada pela presença de um infiltrado inflamatório linfocitário difuso (Figura 25).

Figura 19 - GHAalg 15 D



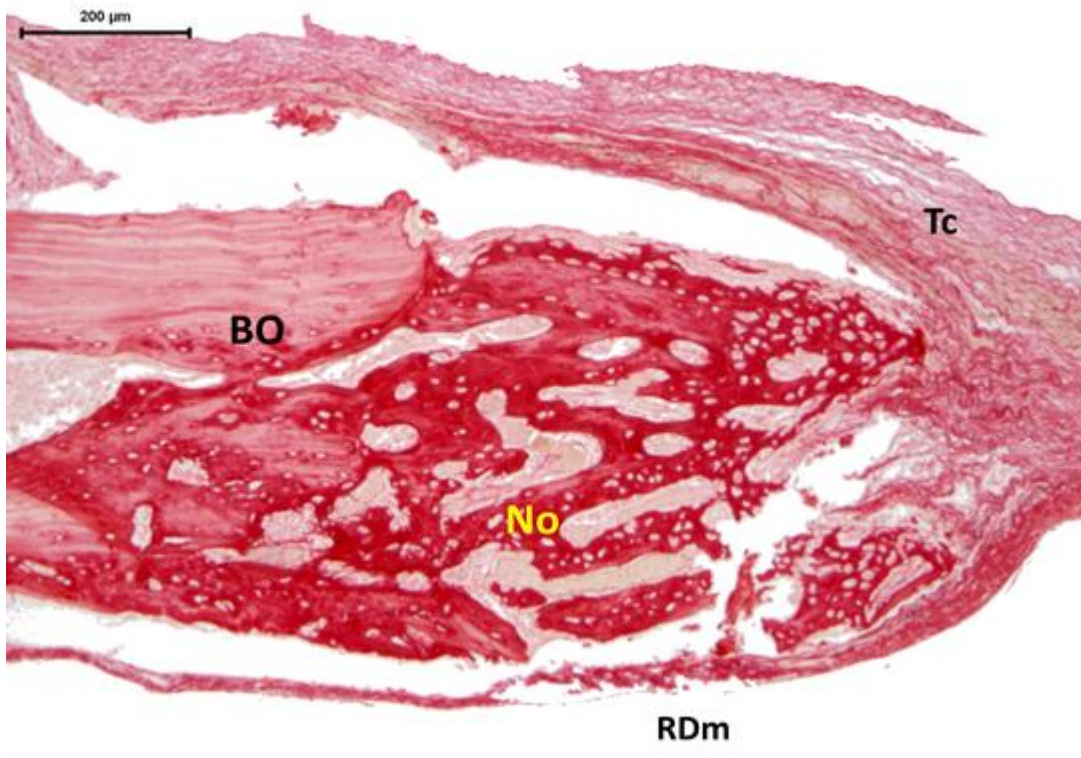
Região da borda óssea (BO) com neoformação óssea reacional (No). Tecido conjuntivo (Tc) em permeio aos grânulos (G) de HAalg. Osteoblastos ativos (→). Região da dura-máter (RDm). HE. Barra 100 µm. **Fonte:** Foto da autora

Figura 20 - EHAalg 15 D



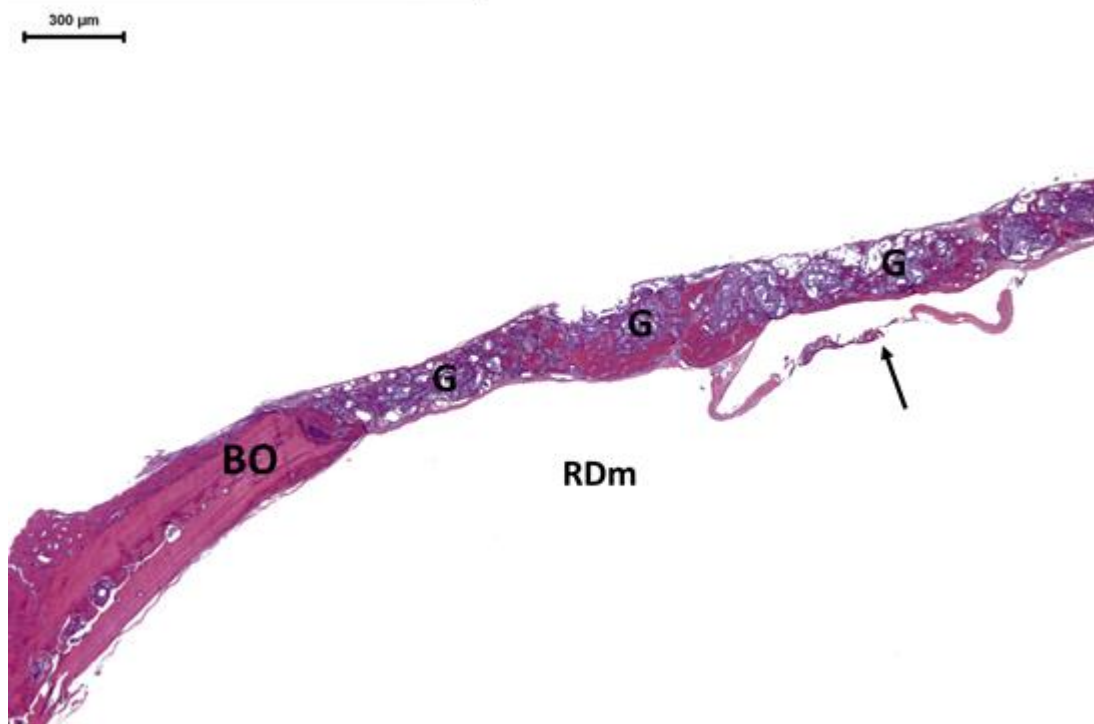
Região da borda óssea (BO) com neoformação óssea reacional (No). Septos de tecido conjuntivo (→) em permeio as microesferas (M) de HAalg. Região da dura-máter (RDm). PIFG. Barra 200 µm. **Fonte:** Foto da autora

Figura 21 - Controle 15 D



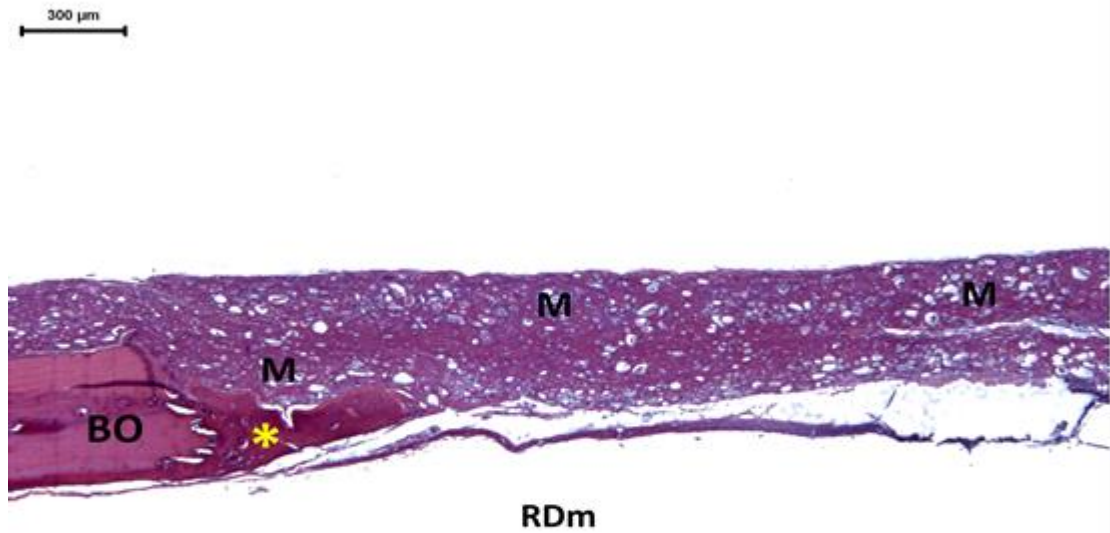
Neoforção óssea (No) reacional restrita a borda óssea (BO). Tecido conjuntivo (Tc). Região da dura-máter (RDm). PIFG. Barra 200 μm. **Fonte:** Foto da autora

Figura 22 - GHAalg 15 D



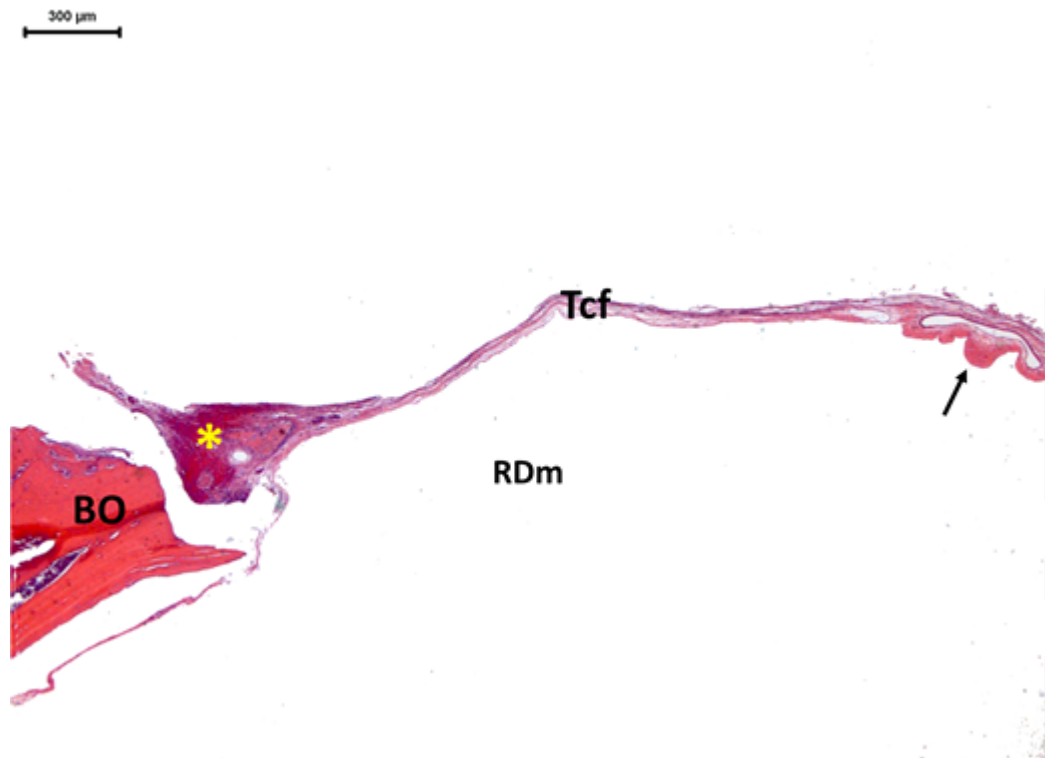
Observar o preenchimento do defeito com os grânulos (G), borda óssea (BO), veia central (→). Região da dura-máter (RDm). HE. Barra 300 μm. **Fonte:** Foto da autora

Figura 23 - EHAalg 15 D



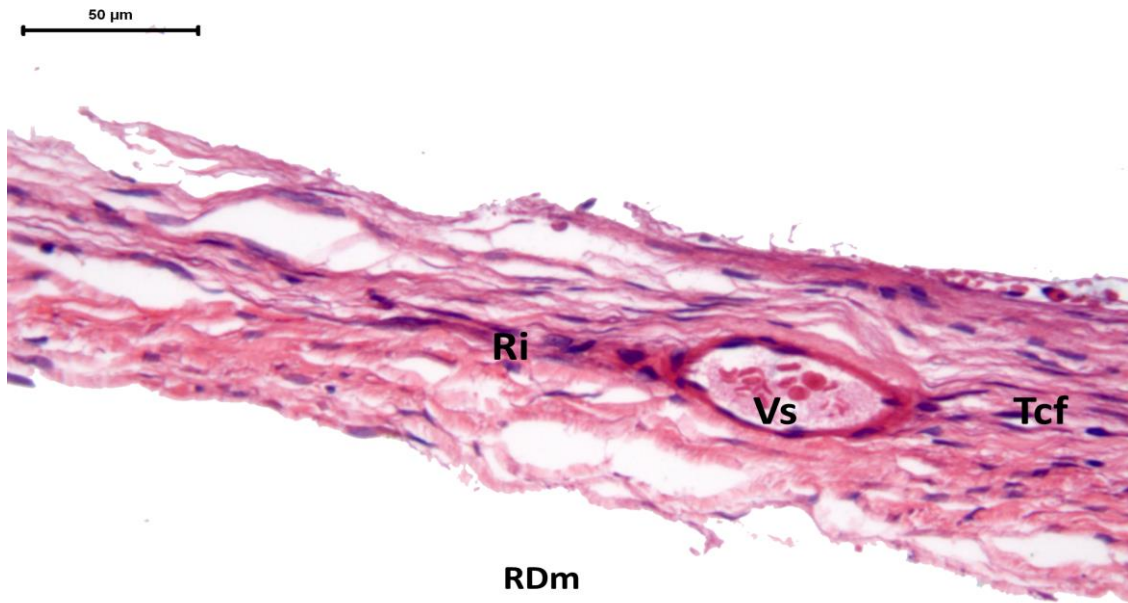
Defeito preenchido com as microesferas (M) com grande diferença de tamanho entre suas partículas. Notar neoformação óssea (*) restrita a borda (BO) do defeito. Região da dura-máter (RDm). HE. Barra 300 µm **Fonte:** Foto da autora

Figura 24 - Controle 15 D



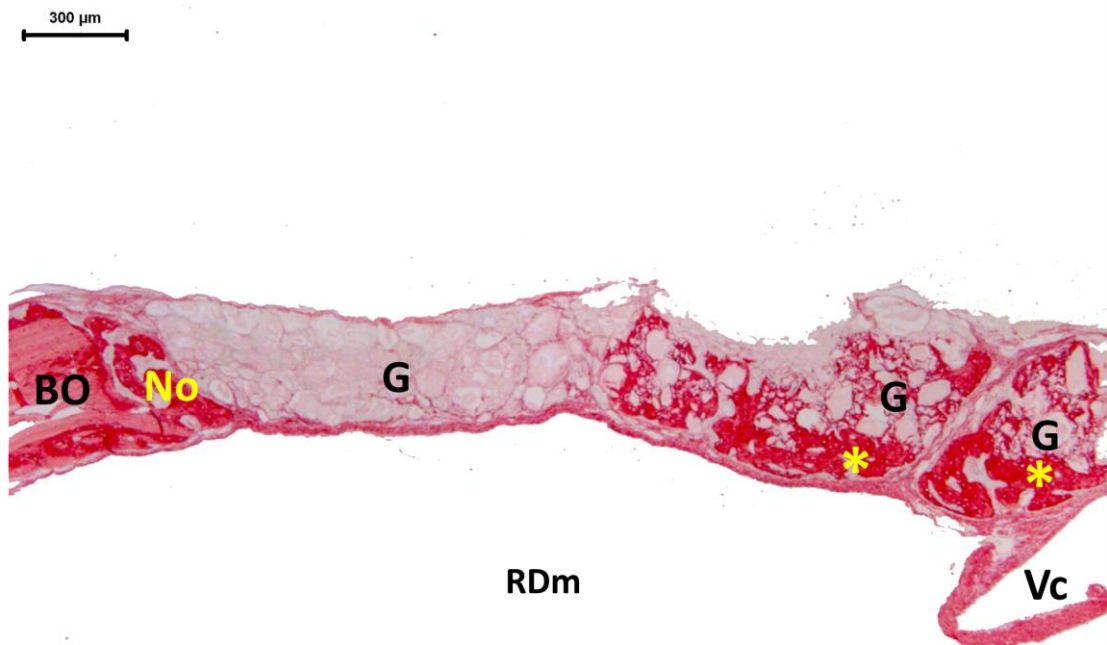
Notar a extensão do defeito preenchido com tecido conjuntivo frouxo (Tcf). Neoformação óssea reacional (*) associada à borda (BO). Veia central (→). Região da dura-máter (RDm). HE. Barra 300 µm. **Fonte:** Foto da autora

Figura 25 – Controle 15 D



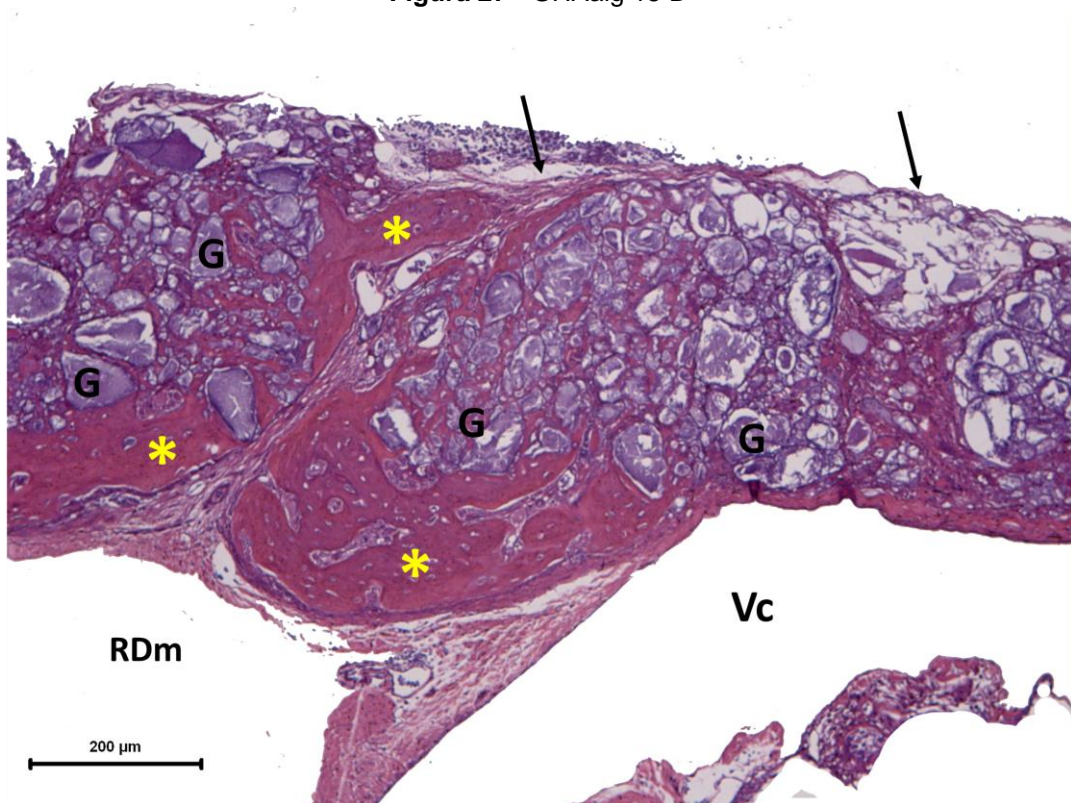
Região central do defeito preenchido por tecido conjuntivo fibroso (Tc), neovascularizado (Vs) e com discreta reação inflamatória crônica (Ri). HE. Barra 50 μ m. **Fonte:** Foto da autora

Figura 26 - GHAalg 15 D



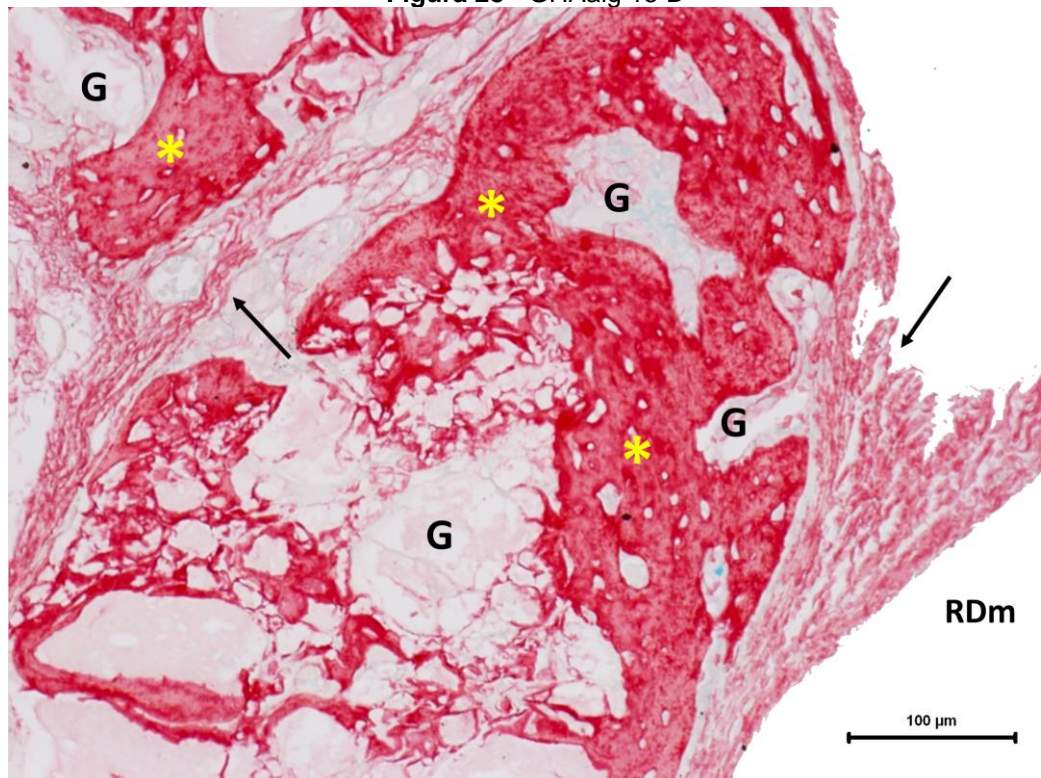
Observar a deposição de matriz osteóide (*) na região central do defeito, próxima a veia central (Vc), sem contiguidade com a neoformação óssea (No) associada borda (BO). Grânulos (G) de Haalg. Região da dura-máter (RDm). PIFG. Barra 300 μ m. **Fonte:** Foto da autora

Figura 27 - GHAalg 15 D



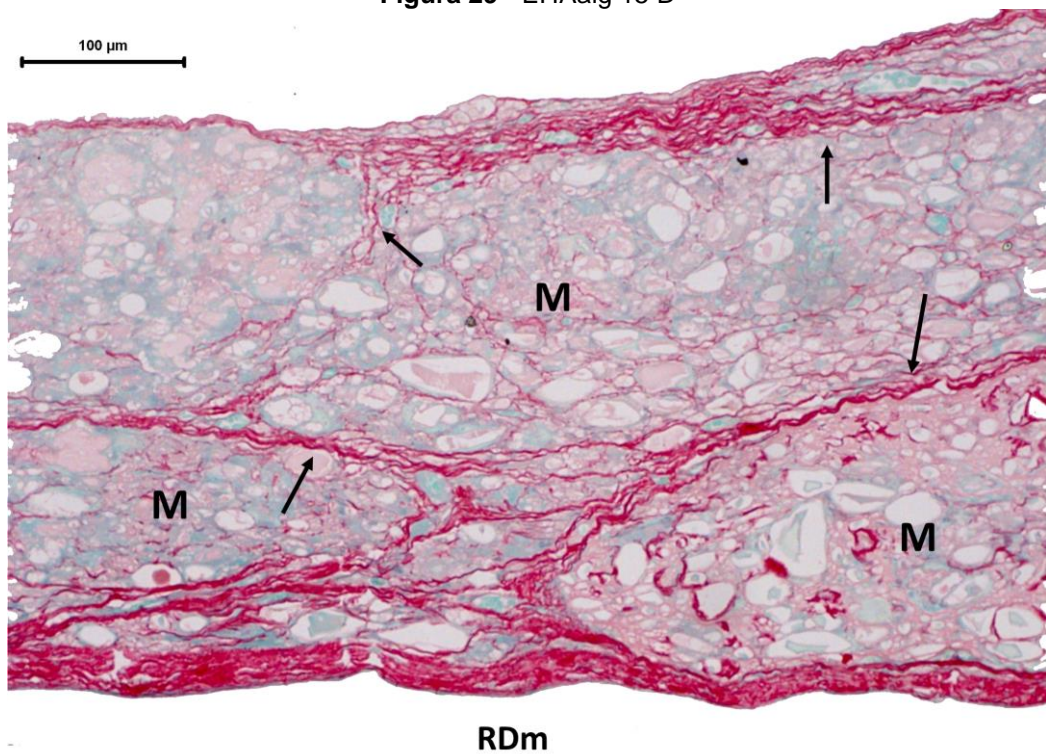
Deposição de matriz osteóide (*) em permeio aos grânulos (G), na região central do defeito próximo a veia central (Vc), mais evidente na região da dura-máter (RDm). Tecido conjuntivo (→). HE. Barra 200 μm. **Fonte:** Foto da autora

Figura 28 - GHAalg 15 D



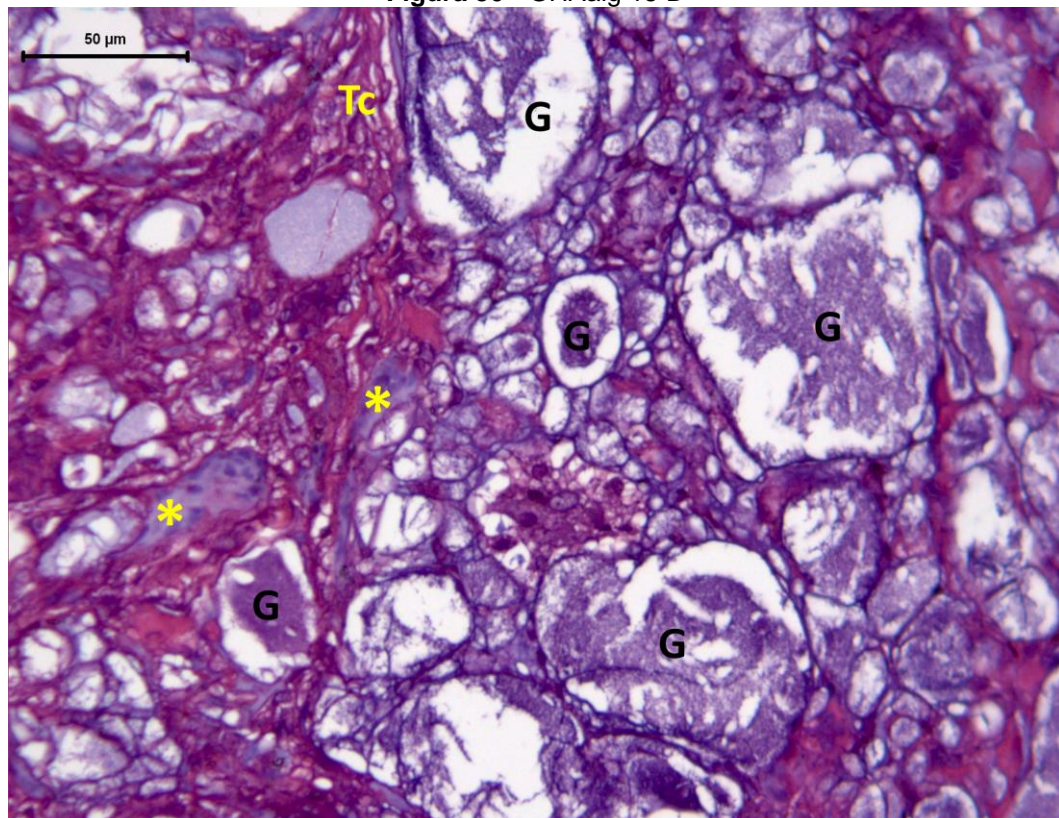
Notar a presença da matriz osteóide (*) em contato direto com os grânulos (G) de HAalg. Tecido conjuntivo (→). Região da dura-máter (RDm). PIFG. Barra 100 μm. **Fonte:** Foto da autora

Figura 29 - EHAalg 15 D



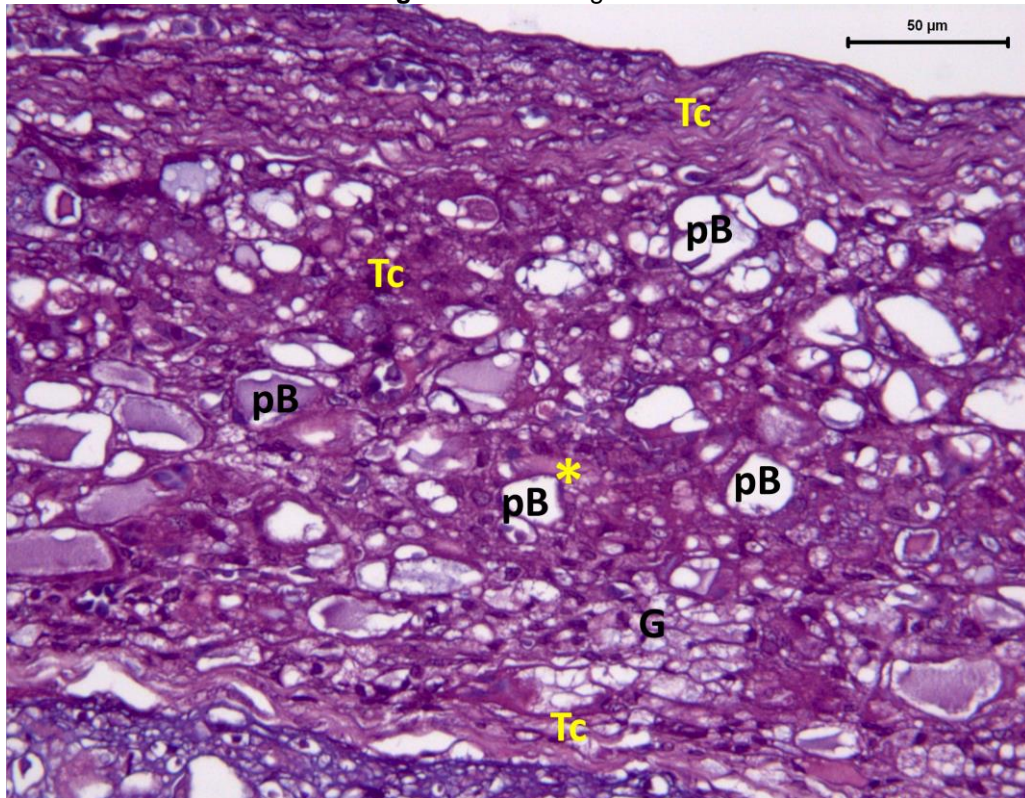
Delgados septos de tecido conjuntivo (→) que circundaram as microesferas (M) de HAalg. Região da dura-máter (RDm). PIFG. Barra 100 μm. **Fonte:** Foto da autora

Figura 30 - GHAalg 15 D



Grânulos (G) circundados por tecido conjuntivo (Tc) mais adensado, associado a uma discreta inflamação crônica granulomatosa com célula gigante multinucleada (CGM) e macrófagos (m). HE. Barra 50 μm. **Fonte:** Foto da autora

Figura 31 - EHAalg 15 D



Partículas do biomaterial (pB) permeadas por tecido conjuntivo (Tc) e por uma discreta inflamação crônica granulomatosa com célula gigante multinucleada (CGm). HE. Barra 50 μ m. **Fonte:** Foto da autora

Discussão

6 DISCUSSÃO

Com o intuito de superar as limitações regenerativas apresentadas no defeito ósseo crítico, biomateriais têm sido aperfeiçoados e desenvolvidos, a fim de reestabelecer a estrutura e a funcionalidade do tecido ósseo. As biocerâmicas a base de fosfato de cálcio, principalmente as de superfície bioativa – HA, biovidro – têm se destacado nas aplicações biomédicas. Apresentam composição similar ao tecido ósseo e, assim, não proporcionam uma resposta tóxica no organismo, como também podem, dentro de certos limites, estimular a formação óssea. A HA apresenta alta biocompatibilidade, propriedade osteocondutora e quando implantada *in vivo* promove reações que findam com a formação de uma camada de carboidroxiapatita, responsável pela ligação íntima estabelecida com o tecido neoformado. (AZA; AZA; AZA, 2005; AZA et al., 2007)

Neste estudo, quando implantados no defeito ósseo, os grânulos e as microesferas de HAalg devolveram o volume à área lesionada, devido ao preenchimento de toda a extensão e, em média, 2/3 da espessura do defeito. A distribuição adequada desses biomateriais permitiu a formação de um arcabouço para a adesão e proliferação celular e para a deposição de novo tecido. Em alguns casos, houve deslocamento tanto dos grânulos, quanto das microesferas, o que pode ser explicado pela convexidade da calvária onde foram implantados os biomateriais; pelo defeito crítico ser transfixado e com reduzida espessura; pelos hábitos peculiares da espécie estudada; e pelo prurido característico da fase cicatricial (FLACH et al., 2008).

Os biomateriais utilizados neste estudo são compósitos, constituídos por uma biocerâmica e um biopolímero natural, HA e alginato, respectivamente. Essa associação agrega a bioatividade da HA com a degradabilidade do alginato, além de aumentar a similaridade do biomaterial com a fase óssea, uma vez que esta é formada por uma parte orgânica e outra inorgânica, assim como neste compósito. Ao ser utilizado na produção das microesferas, o alginato, garante a formação de um gel, quando em contato com o cátion divalente Ca^{2+} , deste modo, funciona como um aglutinante das partículas de HA. (ANDERSEN et al., 2012) Ao serem implantados no defeito ósseo, notou-se a degradação do alginato tanto nos grânulos, quanto nas

microesferas, com mais predominância nas microesferas de HAalg, evidenciada pela apresentação desforme das partículas de HA. Ou seja, as microesferas foram encapsuladas por um tecido conjuntivo e mantiveram seu formato esferoide, contudo a degradação do alginato separou as partículas da HA, até então reticuladas nas microesferas. O contato do alginato com o fluido biológico *in vivo* é seguido pela troca gradual dos íons de cálcio do hidrogel pelo sódio do fluido biológico (ANDERSEN et al., 2012). Conseqüentemente, o hidrogel se desfaz, é reabsorvido e cede espaço para a deposição de novo tecido. Estudo realizado por Paula (2008), ao utilizar biomaterial semelhante a este estudo, microesferas de HA associadas ao alginato, porém com um tamanho menor, em defeito crítico de calvária de rato, observou, aos 15 dias, uma discreta neoformação óssea tanto na periferia do defeito, quanto na área central próxima à dura-máter. No presente estudo, o espaço entre as partículas de HA das microesferas foi preenchido por tecido conjuntivo. Esta distinção pode ser justificada pelas possíveis diferenças nas propriedades físico-químicas entre os biomateriais, como superfície, porosidade, entre outras.

O potencial osteocondutor apresentado pelos grânulos de HAalg foi comprovado pela neoformação óssea na área central do defeito, e, também, por uma neoformação óssea mais acentuada na sua periferia, quando comparado às microesferas de HAalg. A osteocondução é uma característica essencial para os biomateriais que irão atuar como arcabouço e possibilitar o crescimento de vasos sanguíneos, a deposição de tecido ósseo, a adesão e proliferação de células mesenquimais. (CARVALHO et al., 2004) Barreto (2006), com intuito de avaliar o potencial osteogênico de um biomaterial a base hidroxiapatita, porém em formato microesférico e sinterizado, utilizou-se do mesmo modelo experimental deste estudo. Os resultados encontrados também evidenciaram a osteocondutividade do biomaterial utilizado, contudo a neoformação óssea entre estas microesferas localizou-se na região periférica do defeito. Vale salientar que a resposta tecidual à implantação *in vivo* dos biomateriais depende das propriedades físico-químicas que eles apresentam: composição, porosidade, superfície e área superficial, tamanho, formato, entre outros. Assim, a resposta particular apresentada pelos grânulos de HAalg pode ser atribuída a um conjunto de relações entre suas propriedades físico-químicas. O formato de grânulos, no local de implantação, associado a sua distribuição espacial, com preenchimento de toda a extensão e formação de um

interstício apropriado e área superficial adequada para a deposição de novo tecido, além de suas propriedades físico-químicas, pode ter propiciado um ambiente favorável para a neoformação óssea na região central. Essas características do biomaterial, associadas à presença da veia central nesse local, podem ter promovido a migração de células mesenquimais indiferenciadas à região central da lesão, as quais, posteriormente, podem ter se diferenciado em osteoblastos e favorecido a neoformação óssea. (SOLTAN; SMILER; CHOI, 2009)

É válido destacar que os estudos supracitados trabalharam com biomateriais sinterizados, que não foram utilizados em nenhum dos grupos experimentais deste estudo. A submissão dos grânulos e microesferas de HAalg à este processo promoveria a remoção do alginato, o que não era objetivo do estudo. (SUNNY; RAMESH; VARMA, 2002; RIBEIRO; BARRIAS; BARBOSA, 2004) Os biomateriais do presente estudo, como não foram sinterizados, provavelmente possuem baixa cristalinidade (HANIFI; FATHI, 2008), fator que pode ter interferido na resposta celular apresentada. (FONSECA, 2007) Ademais, a HA utilizada para a produção dos grânulos e microesferas de HAalg foram sintetizadas com substratos e por rotas de síntese diferentes, o que pode justificar a resposta distinta entre eles. Somado a isto, características como composição, sequência, comprimento e peso molecular do alginato se modificam a depender da sua fonte de obtenção Isto interfere diretamente nas propriedades do alginato e de seu hidrogel e, conseqüentemente, na resposta tecidual a este biomaterial. (LEE; MOONEY, 2012; PAWAR; EDGAR, 2012; SANTANA et al., 2013)

Outra propriedade que pode interferir diretamente na resposta celular ao biomaterial é o tamanho e a área intersticial formada entre suas partículas. Para ambas ainda não há consenso na literatura quanto à faixa ideal para melhor resposta tecidual. Os biomateriais deste estudo apresentavam tamanho variável, entre 425 e 600 μm , e formatos diferentes, característica que pode influenciar na área intersticial entre os biomateriais. A maioria dos estudos que buscaram avaliar a influência do tamanho da partícula e da porosidade na regeneração óssea (MANGANO; BARTOLUCCI; MAZZOCCO, 2003; KURELLA; DAHOTRE, 2005; RIBEIRO; BARRIAS; BARBOSA, 2006; MARCACCI et al., 2007; KLENKE et al., 2008; TIAN et al., 2009) concluiu que o tamanho ideal de partículas é considerado entre 200 a 500 μm . Ademais, acredita-se que partículas com tamanho regular

propiciam a formação de um interstício adequado para os eventos celulares. Schepers e colaboradores (1993), ao levar em consideração que na preparação de partículas há sempre um número maior de partículas menores do que maiores, com uma grande variação de distribuição de tamanho, discorrem que um intervalo estreito de tamanho (300-350 μm) é importante para alcançar este fenômeno único de promoção da diferenciação de células ao longo do defeito, bem como uma adequada neoformação vascular. No entanto, estudos realizados com partículas com grande variação de tamanho contradizem a afirmativa de Schepers e colaboradores (1993), uma vez que Oonish e colaboradores (1999) concluíram que o processo de formação óssea foi mais adequado em partículas com grande variação de tamanho (90-710 μm). A diferença nos resultados das pesquisas supracitadas destaca a importância da continuidade no desenvolvimento de novos estudos direcionados para a compreensão da interferência tanto do formato, quanto do tamanho da partícula, com vistas a esclarecer as divergências ainda presentes.

No presente experimento, a confecção do defeito promove a ruptura vascular e, conseqüentemente, a liberação de citocinas, plaquetas, que iniciam a resposta inflamatória. (CARANO; FILVAROFF, 2003; HING, 2004; ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008; ROSA; BELOTI; NOORT, 2003; AI-AQL et al., 2008) A liberação desses fatores, principalmente as citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α , é fator crucial para a regeneração do tecido ósseo (GERSTENFELD et al. 2003; MARSELL; EINHORN, 2011), já que promovem a quimiotaxia de outras células inflamatórias, atuam sobre o recrutamento de células mesenquimais e promovem a angiogênese. (AI-AQL et al., 2008) Esta reação, quando associada à implantação do biomaterial, culmina com uma série de eventos. A depender da composição, tamanho, formato e demais propriedades físico-químicas do biomaterial, estes ocorrerão com maior ou menor intensidade. (BRYERS; GIACHELLI; RATNER, 2012) Entretanto, em ambos os grupos experimentais, notou-se uma discreta inflamação crônica granulomatosa. A extensão ou grau dessa resposta indicará a biocompatibilidade do biomaterial utilizado. (ANDERSON; RODRIGUES; CHANG, 2007)

Associado ao tecido conjuntivo, que preencheu a extensão do defeito no grupo controle, observou-se discreta inflamação crônica. É válido ressaltar que defeitos ósseos que apresentam dimensões maiores, definidos como defeitos críticos, caracterizam-se por limitada neoformação óssea, restrita à região periférica, e

preenchimento de sua extensão com tecido fibroso. Estas características foram observadas no grupo controle deste estudo, o qual teve toda sua extensão preenchida por tecido conjuntivo frouxo, com espessura reduzida, quando comparada à borda, e uma discreta neoformação óssea reacional associada a esta. Resultados semelhantes foram encontrados por Cardoso e colaboradores (2006), Miguel e colaboradores (2006), Barreto (2008), Miguel (2008), Paula (2008), Rolim (2010), Accorsi-Mendonça e colaboradores (2011), Barreto (2011) e Conz, Granjeiro e Soares (2011), nos quais os defeitos ósseos críticos não preenchidos com biomateriais resultaram na deposição de tecido fibroso na região central do defeito e neoformação óssea reacional restrita às bordas. Isto pode ser justificado pelo comprometimento do suprimento vascular e, também, pela ausência de um suporte para a migração de células osteogênicas até o centro do defeito, o que impossibilita a formação de novo tecido ósseo na região.

A presença do biomaterial na região do defeito suscitou, paralelamente, na migração de macrófagos e posterior fusão em células gigantes multinucleadas, e na deposição de tecido conjuntivo entre as microesferas e os grânulos. Os macrófagos são responsáveis pela secreção de uma ampla variedade de mediadores químicos no sítio de implantação. Estes fatores direcionam a inflamação e o reparo tecidual em resposta ao biomaterial, uma vez que estimulam a proliferação, migração e diferenciação de diferentes tipos celulares e o reparo por meio de regeneração ou cicatrização. (ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008; MIGUEL, 2008) As microesferas de HAalg foram circundadas por delgados septos de um tecido conjuntivo fibroso e, em permeio às partículas de HA, observou-se a presença de tecido conjuntivo, associado à presença de células gigantes multinucleadas. É importante salientar que, apesar dessa encapsulação das microesferas de HAalg, esse biomaterial não é considerado não biocompatível, visto que estes septos possuem em sua composição tanto fibras colágenas, como muitas células que, posteriormente, poderão se diferenciar em células osteoprogenitoras. No mais, esta cápsula fibrosa pode ter dificultado a penetração de células no interior das microesferas e limitado a neoformação óssea nesse grupo. A formação de tecido conjuntivo ocorreu em menor proporção nos grânulos de HAalg, nos quais notou-se a deposição de um tecido mais adensado nas áreas em que não houve formação de matriz osteoide.

Os resultados apresentados neste estudo referem-se à fase inicial de reparo, momento de grande importância na regeneração tecidual. Nessa fase, podem-se observar reações teciduais, como reação inflamatória, que garantirão o seguimento do estudo com o biomaterial.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

- Os biomateriais compósitos foram biocompatíveis, osteocondutores e atuaram como arcabouços de preenchimento;
- As microesferas de HAalg funcionaram de melhor forma como arcabouço de preenchimento e garantiram a devolução de maior espessura do defeito;
- Os grânulos de HAalg apresentaram um potencial osteocondutor superior às microesferas de HAalg.

Referências

REFERÊNCIAS

ACCORSI-MENDONÇA, T.; ZAMBUZZI, W. F.; BRAMANTE, C. M.; CESTARI, T. M.; TAGA, R.; SADER, M.; DE ALMEIDA SOARES, G. D.; GRANJEIRO, J. M. Biological monitoring of a xenomaterial for grafting: an evaluation in critical-size calvarial defects. **J Mater Sci Mater Med**, [London], v. 22, n. 4, p. 997-1004, abr. 2011.

AI-AQL, Z. S.; ALAGL, A. S.; GRAVES, D. T.; GERSTENFELD, L. C.; EINHORN, T. A. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. **J Dent Res**, [Washington], v. 87, n. 2, p. 107-118, fev. 2008.

AMINI, A. R.; LAURENCIN, C. T.; NUKAVARAPU, S. P. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. **Crit Rev Biomed Eng**, [Boca Raton], v. 40, n. 5, p. 363-408, 2012.

ANDERSEN, T.; STRAND, B. L.; FORMO, K.; ALSBERG, E.; CHRISTENSEN, B. E. Alginates as biomaterials in tissue engineering. **Carbohydr Chem**, [S. I.], v.37, p.227-258, 2012.

ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. **Semin in Immunol**, [Philadelphia], v. 20, n. 2, p. 86-100, abr. 2008.

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

ARAÚJO, T. S. **Produção de hidroxiapatita pura e dopada para aplicação em biosensores**. 2006. 99 f. Dissertação (Mestrado em Física – Área Física da Matéria Condensada) – Departamento de Física, Universidade Federal de Sergipe, 2006.

ARMENTANO, I.; DOTTORI, M.; FORTUNATI, E.; MATTIOLI, S.; KENNY, J. M.; Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review. **Polym Degrad Stabil**, [S. I.], v. 95, p. 2126-2146, 2010.

AUGST, A. D.; KONG, H. J.; MOONEY, D. J. Alginate hydrogels as biomaterials. **Macromol. Biosci**, [Weinheim], v. 6, n. 8, p. 623-633, 2006.

AZA, P. N.; AZA, A. H.; AZA, S. Crystalline bioceramic materials. **Bol. Soc. Esp. Ceram**, [S. I.], v. 44, n. 3, p. 135-145, 2005.

AZA, P. N.; AZA, A. H.; PENA, P.; AZA, S. Bioactive glasses and glass-ceramics. **Bol.**

Soc. Esp. Ceram, [S. l.], v. 46, n. 2, p. 45-55, 2007.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; COSTA, A. C. F. M. Materiais cerâmicos utilizados para implantes. **Rev Eletr Mat Proc**, [Campina Grande, PB], v. 3, n. 1, p.3 5-42, 2007.

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

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

BARRETO, I. C. **Utilização de ranelato de estrôncio associado a biometrias para regeneração óssea**. 2011. 176f. Tese (Doutorado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

BARRIAS, C. C.; RIBEIRO, C. C.; RODRIGUES, D.; MIRANDA, M. C. S. Effect of calcium phosphate addition to alginate microspheres: modulation of enzyme release kinetics and improvement of cell adhesion. **Key Eng Mat**, [S. l.],n. 284/286, p. 689-692, abr. 2005.

BENAQQA, C.; CHEVALIER, J.; SAËDAOUI, M.; FANTOZZI, G. Slow crack growth behaviour of hydroxyapatite ceramics. **Biomaterials**, [Guildford], v. 26, n. 31, p. 6106-6112, 2005

BEST, S. M. PORTER, A. E.; THIAN, E. S.; HUANGC, J. Bioceramics: past, present and for the future. **J Eur Ceramic Society**, [S. l.], v. 28, p. 1319-1327, 2008.

BHATT, R. A.; ROZENTAL, T. D. Bone Graft Substitutes. **Hand Clin**, [Philadelphia], v. 28, p. 457-468, 2012.

BIANCON FILHO, L. A.; PRIMO, B. T.; GASSEN, H. T.; FONTANELLA, V. R. T.; SILVA JR, A. N. Evaluation of optical density of bone defects filled with calcium phosphate cement and bioactive glass in rats. **Acta cir. bras.**, [Salvador], v. 26, n. 1, 2011.

BOROJEVIC, R. Terapias Celulares e Bioengenharia. **Gaz. Med. Bahia**, [Salvador], v. 78, supl.1, p. 42-46, 2008.

BRYERS, J. D.; GIACHELLI, C. M.; RATNER, B. D. Engineering biomaterials to integrate and heal: the biocompatibility paradigm shifts. **Biotechnol Bioeng**, [New York], v. 109, n. 8, p. 1898-1911, ago. 2012.

CANCEDDA, R., DOZIN, B.; GIANNONI, P.; QUARTO, R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. **Matrix Biol**, [Stuttgart], v. 22, n. 1, p. 81-91, 2003.

CARANO, A. D.; FILVAROFF, E. H. Angiogenesis and bone repair. **Drug Discov Today**, [Oxford], v. 8, n.21, p. 980-984, 2003.

CARDOSO, A. K. M. V.; BARBOSA JUNIOR, A. A.; MIGUEL, F. B.; MARCANTONIO JUNIOR, E.; FARINA, M.; SOARES, G. D. A.; ROSA, F. P. Histomorphometric analysis of tissue responses to bioactive glass implants in critical defects in rat calvaria. **Cells Tissues Organs**, [Basel], v. 184, n. 3-4, p. 128-137, 2006.

CARVALHO, P. S. P.; BASSI, A. P. F.; VIOLIN, L. A. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais. **ImplantNews**, [São Paulo], v. 1, n. 3, p. 255-259, 2004.

CATAURO, M.; PAPALE, F.; ROVIELLO, G.; FERONE, C.; BOLLINO, F.; TRIFUOGGI, M.; AURILIO, C. Synthesis of SiO₂ and CaO rich calcium silicate systems via sol-gel process: Bioactivity, biocompatibility, and drug delivery tests. **J Biomed Mater Res Part A**, [Hoboken], v. 101, p. 1-6, 2013.

CONZ, M. B.; GRANJEIRO, J. M.; SOARES, G. A. Hydroxyapatite crystallinity does not affect the repair of critical size bone defects. **J. Appl. Oral Sci**, [Bauru], v. 19, n. 4, p. 337-342, 2011.

COSTA, E.; NOVAKI, L.; TSAI, H. I.; VIEIRA, L. T. P.; ANDRADE, A. V. C.; PAIVA-SANTOS, C. O.; BORGES, C. P. F.; MARQUES, M. B.; SANTOS, A. C. C.; ZURITA DA SILVA, J. C. Sinterização de biovidros na forma de partículas e do tipo espuma. **Biociencia C Desenvolv**, [Brasília], n. 30, p. 51-54, jan/jun 2003.

DALAPÍCULA, S. S.; VIDIGAL JÚNIOR, G. M.; CONZ, M. B.; CARDOSO, E. S. Características físico-químicas dos biomateriais utilizados em enxertias ósseas. Uma revisão crítica. **Implantnews**, [São Paulo], v. 3, n. 5, p. 487-491, 2006.

DE JONG, W. F. La Substance Minérale Dans les Os. **Rec Trav Chim**, [S. l.], v. 45, p. 445, 1926.

DIMITRIOU, R.; TSIRIDIS, E.; GIANNOUDIS, P. V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. **Injury**, [Bristol], v.36, p.1392-1404, 2005.

DOROZHUKIN, S.V. Bioceramics of calcium orthophosphates. **Biomaterials**, [Guildford], v. 31, n.7, p. 1465-1485, mar. 2009.

FONSECA, F. M. **Biocerâmicas Porosas Bifásicas e Trifásicas à Base de Hidroxiapatita Produzidas por Gelcasting**. 2007. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia dos Materiais) – Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2007.

GARCIA-CRUZ, C. H.; FOGGETTI, U.; SILVA, A. N. Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. **Quim. Nova**, [São Paulo], v. 31, n. 7, p. 1800-1806, 2008.

GARG, T.; SINGH, O.; ARORA, S.; Murthy, R. S. R. Scaffold: A Novel Carrier for Cell and Drug Delivery. **Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.**, [Boca Raton], v. 29, n.1, p.1-63, 2012.

GERSTENFELD, L. C.; CULLINANE, D. M.; BARNES, G. L.; GRAVES, D. T.; EINHORN, T. A. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. **J Cell Biochem**, [New York], v. 88, p. 873-884, 2003.

GIANNOUDIS, P. V.; DINOPOULUS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: An update. **Injury**, [Bristol], v. 36, n. 3, p.S20-S27, nov. 2005

GONDIM, A. L. M. **Efeito da laserterapia na biomodulação da osteogênese em defeitos críticos confeccionados em calota craniana de ratos**. 2007. 117 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

HABIBOVIC, P.; GBURECK, U.; DOILLON, C. J.; BASSETT, D. C.; VAN BLITTERSWIJK, C. A.; BARRALET, J. E. Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants. **Biomaterials**, [Guildford], v. 29, n. 7, p. 944-953, 2008.

HAN, Y.; ZENG, Q.; LI, H.; CHANG, J. The calcium silicate/alginate composite: preparation and evaluation of its behavior as bioactive injectable hydrogels. **Acta Biomaterialia**, [Oxford], v. 9, p. 9107-9117, 2013.

HANIFI, A.; FATHI, M. H. Bioresorbability evaluation of hydroxyapatite nanopowders in a stimulated body fluid medium. **Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. I.], v. 4, n. 2, p. 141-148, 2008.

HARVEY, E. J.; HENDERSON, J. E.; VENGALLATORE, S. T. Nanotechnology and bone healing. **J Orthop Trauma**, [New York], v.24, suppl.1, p.S25-30, 2010.

HING, K. A. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? **Phil. Trans. R. Soc. Lond. A**, [S. l.], v. 362, p. 2821-2850, 2004.

HSIONG, S. X.; MOONEY, D. J. Regeneration of vascularized bone. **Periodontol** **2000**, [Copenhagen], v. 41, p. 109-122, 2006.

HUNT, N. C.; GROVER, L. M. Cell encapsulation using biopolymer gels for regenerative medicine. **Biotechnol Lett**, [Dordrecht], v. 32, p. 733-742, 2010.

JIANG, Q.; LIU, D.; SUN, S.; HU, J.; TAN, L.; WANG, Y.; GUI, Y.; YU, M.; SONG, H. Critical role of connexin43 in zebrafish late primitive and definitive hematopoiesis. **Fish Physiology and Biochemistry**, [Amsterdam], v. 36, n. 4, p. 945-951, dez. 2010.

KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, [Guildford], v. 26, n. 27, p. 5474-5491, set. 2005.

KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; REIS, R. R.; ALVES, O. L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Quim Nova**, [São Paulo], v. 23, n. 1, p. 518-522, 2000.

KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H. H. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. **Quim. Nova**, [São Paulo], v. 31, n. 1, p. 134-143, 2008

KIM, S.-S.; PARK, M. S.; JEON, O.; CHOI, C. Y.; KIM, B.-S. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, [Guildford], v. 27, p. 1399-1409, 2006.

KLENKE, F. M.; LIU, Y.; YUAN, H.; HUNZIKER, E. B.; SIEBENROCK, K. A.; HOFSTETTER, W. Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo. **J Biomed Mater Res Part A**, [Hoboken], v. 85, n. 3, p. 777-786, 2008.

KURELLA, A.; DAHOTRE, N.B. Review paper: Surface Modification for Bioimplants: The Role of Laser Surface Engineering. **J Biomater Appl**, [Lancaster PA], v. 20, p. 5-50, 2005.

LACERDA, K. A. **Obtenção de matrizes bioabsorvíveis à Base de hidroxiapatita para aplicação em braquiterapia**. 2005. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e

Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais) – Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Comissão Nacional de Energia Nuclear, Belo Horizonte, 2005.

LACERDA, K. A.; LAMEIRAS, F. S.; SILVA, V. V. Síntese e caracterização de matrizes porosas de hidroxiapatita para aplicação como fontes radioativas em braquiterapia. **Revista Escola de Minas**, [Ouro Preto], v. 59, n. 2, p. 217-223, 2006.

LAVIK, E.; LANGER, R. Tissue engineering: current state and perspectives. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, [Berlin], v. 65, p. 1-8, 2004.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, [S. I.] v. 37, p. 106-126, 2012.

LIN, H. R.; YEH, Y. Porous alginate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering: preparation, characterization, and in vitro studies. **J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater**, [Hoboken], v. 71B, p. 52-65, 2004

LEONEL, E. C. F.; MANGILLI, P. D.; RAMALHO, L. T. O.; ANDRADE SOBRINHO, J. A importância da porosidade interna do polímero de mamona durante a neoformação óssea: estudo em ratos. **Cienc Odontol Bras**, [São José dos Campos], v. 6, p. 19-25, 2003.

LONG, P. H. Medical Devices in Orthopedic Applications. **Toxicol Pathol**, [Lawrence], v. 36, n. 1, p. 85-91, 2008.

MANGANO, C.; BARTOLUCCI, E. G.; MAZZOCCO, C. A new porous hydroxyapatite for promotion of bone regeneration in maxillary sinus augmentation: clinical and histologic study in humans. **Int J Oral Maxillofac Implants**, [Lombard], v. 18, n. 1, p. 23-30, jan-fev. 2003.

MARCACCI, M.; KON, E.; MOUKHACHEV, V.; LAVROUKOV, A.; KUTEPOV, S.; QUARTO, R.; MASTROGIACOMO, M.; CANCEDDA, R. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. **Tissue Eng**, [S. I.], v. 13, n. 5, p. 947-955, 2007.

MARSELL, R.; EINHORN, T. A. The biology of fracture healing. **Injury**, [Bristol], v. 42, n. 6, p. 551-555, jun. 2011.

MARTINS, A. M.; ALVES, C. M.; KASPER, F. K.; MIKOS, A. G.; REIS, R. L. Responsive and *in situ*-forming chitosan scaffolds for bone tissue engineering applications: An overview of the last decade. **J. Mater. Chem.**, [Washington], v. 20, p. 1638-1645, 2010.

MAZUMDER, M. A.; BURKE, N. A. D.; SHEN, F.; POTTER, M. A.; STÖVER, H. D. H. Core cross linked alginate microcapsules for cell encapsulation. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 6, p. 1365-1373, 2009.

MIGUEL, F.B.; CARDOSO, A. K.; BARBOSA, A. A. Jr; MARCANTONIO, E. Jr; GOISSIS, G., ROSA, F. P. Morphological assessment of the behavior of three-dimensional anionic collagen matrices in bone regeneration in rats. **J Biomed Mater Res**, [Hoboken], v. 78, n. 2, p. 334-339, aug. 2006.

MIGUEL, F. B. **Avaliação do potencial osteogênico de matrizes tridimensionais colagênicas aniônicas, reticuladas ou não em glutaraldeído, na regeneração de defeitos críticos, em calvária de rato**. 2008. 158 f. Tese (Doutorado em Patologia Humana) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia/Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2008.

MOREIRA, A. S. B.; PASTORELI, M. T.; DAMASCENO, L. H. F. Estudo experimental da influência das dimensões dos grânulos de hidroxiapatita na integração óssea. **Acta Ortop Bras**, [São Paulo], v. 11, n. 4, p. 240-250, 2003.

MURUGAN, R., RAMAKRISHNA, S. Development of Nanocomposites for Bone Grafting. **Compos Sci Technol**, [S. I.], v. 65, p. 2385-2406, 2005.

NAVARRO, M.; MICHIARDI, A.; CASTAÑO, O.; PLANELL, J. A. Biomaterials in orthopaedics. **J. R. Soc. Interface**, [S. I.], v 5, p. 1137-1158, 2008.

OONISHI, H.; HENCH, L. L.; WILSON, J.; SUGIHARA, F.; KUSHITANI, S.; IWAKI, H. Comparative bone ingrowth behavior in granules of bioceramic material of various sizes. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, [Hoboken], v. 44, p. 31-43, 1999.

PAULA, F. L. **Avaliação in vivo de um composto de hidroxiapatita e alginato no reparo ósseo**. 2008. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

PAULA, F. L.; BARRETO, I. C.; ROCHA-LEÃO, M. H.; BOROJEVIC, R.; ROSSI, A. M.; ROSA, F. P.; FARINA, M. Hydroxyapatite-alginate biocomposite promotes bone mineralization in different length scales *in vivo*. **Front. Mater. Sci. China**, [China], v. 3, n. 2, p. 145-153, 2009.

PAWAR, S. N.; EDGAR, K. J. Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. **Biomaterials**, [Guildford], v. 33, p. 3279-3305, 2012.

REZWAN, K.; CHEN, Q. Z.; BLAKER, J. J.; BOCCACCINI, A. R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering.

Biomaterials, [Guildford], v. 27, p. 3413-3431, 2006.

RHEE, S. H. Synthesis of hydroxyapatite via mechanochemical treatment. **Biomaterials**, [Guildford], v. 23, p. 1147-1152, 2002.

RIBEIRO, C. C.; BARRIAS, C. C.; BARBOSA, M. A. Calcium phosphate-alginate microspheres as enzyme delivery matrices. **Biomaterials**, [Guildford], v. 25, n. 18, p. 4363-4373, 2004.

RIMINUCCI, M.; BIANCO, P. Building bone tissue: matrices and scaffolds in physiology and biotechnology. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, [Ribeirão Preto], v. 36, n. 8, p. 1027-1036, 2003.

RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. **Polym Int**, [London], v.57, p.397-430, 2008.

ROGINA, A.; IVANKOVIĆ, M.; IVANKOVIĆ, H. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite within chitosan matrix. **Mater. Sci. Eng., C, Biomim. Mater., Sens. Syst.**, [Lausanne], v. 33, p. 4539-4544, 2013.

ROLIM, A. E. H. **Avaliação de microesferas de hidroxiapatita, dopadas ou não com estrôncio, no reparo de defeito ósseo crítico, em calvária de rato**. 2010. 91 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) – Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

ROSA, A. L.; SHAREEF, M. H.; NOORT, R. V. Efeito das condições de preparação e sinterização sobre a porosidade da hidroxiapatita. **Pesqui Odontol Bras**, [São Paulo], v. 14, n. 3, p. 273-277, jul./set. 2000.

ROSA, L. A.; BELOTI, M. M.; NOORT, R. V. Osteoblastic differentiation of cultured rat bone marrow cells on hydroxyapatite with different surface topography. **Dent Mater**, [Washington], v. 19, p. 768-772, 2003.

ROSENGREN, A.; OSCARSSON, S.; MAZZOCCHI, M.; KRAJEWSKI, A.; RAVAGLIOLI, A. Protein adsorption onto two bioactive glass-ceramics. **Biomaterials**, [Guildford], v. 24, n. 1, p. 147-155, jan. 2003.

SALGADO, A. J.; COUTINHO, O. P.; REIS, R. L. Bone tissue engineering: State of the art and future trends. **Macromol. Biosci.**, [Weinheim], v. 4, p. 743-765, 2004.

SANTANA, B. P.; NEDEL, F.; PIVA, E.; CARVALHO, R. V.; DEMARCO, F. F.; CARREÑO, N. L. V. Preparation, modification, and characterization of alginate

hydrogel with nano-/microfibers: A new perspective for tissue engineering. **Biomed Res Int**, [New York], v. 2013, p. 1-6, 2013.

SCHEPERS, E. J.; DUCHEYNE, P.; BARBIER, L.; SCHEPERS, S. Bioactive glass particles of narrow size range: a new material for the repair of bone defects. **Implant Dent**, [Baltimore], v. 2, n. 3, p. 151-156, 1993.

SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; MALMONGE, S. M.; SOUTO, E. B. Polímeros Usados como Sistemas de Transporte de Princípios Ativos. **Polímeros**, [S. I.], v. 21, n. 5, p. 361-368, 2011.

SINGH, S. Nanomedicine–Nanoscale Drugs and Delivery Systems. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, [Stevenson Ranch], v. 10, n. 12, p. 7906-7918, 2010.

SOHRABI, M.; HESARAKI, S.; KAZEMZADEH, A. The influence of polymeric component of bioactive glass-based nanocomposite paste on its rheological behaviors and *in vitro* responses: Hyaluronic acid versus sodium alginate. **J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.**, [Hoboken], v.0, n.0, 2013.

SOUZA, D. O.; ALMEIDA JR, E.; BARRETO, I. C.; OLIVEIRA, T. F. L.; ARAÚJO, R. P. C. Aplicações de enxertos de bancos de ossos em Odontologia. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.**, [Salvador], v. 9, supl.1, p. 45-48, 2010.

STEVENS, M. M. Biomaterials for bone tissue engineering. **Mater Today**, [Kidlington], v.11, n.5, p18-25, mai. 2008.

SUNNY, M. C.; RAMESH, P.; VARMA, H. K. Microstructured microspheres of hydroxyapatite bioceramic. **J. mater. Sci. Mater. Med.**, [London], v. 13, n. 7, p. 623-632, 2002.

TADIC, D.; BECKMANN, F.; SCHWARZ, K.; EPPLE, M. A novel method to produce hydroxyapatite objects with interconnecting porosity that avoids sintering. **Biomaterials**, [Guildford], v. 25, n. 16, p. 3335-3340, 2004.

TANNER, K. E. Bioactive composites for bone tissue engineering. **Proc Inst Mech Eng H**. v. 224, p. 1359-1372.

TIAN, M.; CHEN, F.; SONG, W.; SONG, Y.; CHEN, Y.; WAN, C.; YU, X.; ZHANG, X. *In vivo* study of porous strontium-doped calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute applications. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, [London], v. 20, n. 7, p.1505-1512, jul. 2009.

THEVENOT, P.; HU, W.; TANG, L. Surface chemistry influence implant Biocompatibility. **Curr. Top. Med. Chem.**, [Hilversum], v. 8, n. 4, p. 270-280, 2008.

THORWARTH, M.; SCHULTZE-MOSGAU, S.; KESSLER, P.; WILTFANG, J.; SCHLEGEL, K. A. Bone regeneration in osseous defects using a resorbable nanoparticulate hydroxyapatite. **J Oral Maxillofac Surg**, [Philadelphia], v. 63, p.1626-1633, 2005.

TORRES, A. L.; GASPAR, V. M.; SERRA, I. R.; DIOGO, G. S.; FRADIQUE, R.; SILVA, A. P.; CORREIA, I. J. Bioactive polymeric–ceramic hybrid 3D scaffold for application in bone tissue regeneration. **Mater. sci. eng., C, Biomim. Mater., Sens. Syst.**, [Lausanne], v. 33, p. 4460-4469, 2013.

VARMA, H. K.; BABU, S. S. Synthesis of calcium phosphate bioceramics by citrate gel pyrolysis method. **Ceram Int**, [S. l.], v. 31, p. 109-114, 2005.

VOGEL, M.; VOIGT, C.; GROSS, U. M.; MÜLLER-MAI, C. M. *In vivo* comparison of bioactive glass particle in rabbits. **Biomaterials**, [Guildford], v. 22, n. 4, p. 357-362, fev. 2001.

VOLKMER, E.; DROSSE, I.; OTTO, S.; STANGELMAYER, A.; STENGELE, M.; KALLUKALAM, B. C.; MUTSCHLER, W.; SCHIEKER M. Hypoxia in static and dynamic 3D culture systems for tissue engineering of bone, **Tissue Eng. Part A**, [New Rochelle], v. 14, p. 1331-1340, 2008.

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

WOODARD, J. R.; HILLDORE, A. J.; LAN, S. K.; PARK, C.J.; MORGAN, A. W.; EURELL, J. A. C.; CLARK, S. G.; WHEELER, M. B.; JAMISON, R. D.; JOHNSON, A. J. W. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. **Biomaterials**, [Guildford], v. 28, p. 45-54, 2007.

YANG, J.; XIE, Y.; HE, W. Research progress on chemical modification of alginate: A review. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 84, p. 33-39, 2011.

YANG, Y.; DENNISON, D.; ONG, J. L. Protein Adsorption and Osteoblast Precursor cell attachment to hydroxyapatite of different crystallinities. **Int J Oral Maxillofac Implants.**, [Lombard], v. 20, n. 2, p.187-192, 2005.

ANEXO A



Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde (ICS)
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICS)



CERTIFICADO

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

Salvador, 22 de julho de 2013.

Profª Dra. Songeli Menezes Freire
Coordenadora da CEUA-ICS

CEUA-ICS

Av. Reitor Miguel Calmon S/N . Instituto de Ciências da Saúde . Vale da Canela CEP 40110-100 – Salvador – Bahia – Brasil .
Telefone: 55-(71) 3283-8958 ou (71) 3245-0917 . E-mail: ceuaiscs@ufba.br.
<http://www.moodle.ufba.br/view.php?id=10332>

Telefone: (71) 3283-8958

Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós Graduação
Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas
Avenida Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela CEP: 40110-100
Salvador, Bahia, Brasil



<http://www.ppgorgsistem.ics.ufba.br>