

George Gonçalves dos Santos



Microesferas e grânulos compósitos de hidroxiapatita nanoestruturada associada ao alginato para a regeneração óssea

Salvador
2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**PROCESSOS INTERATIVOS
DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS**
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO • ICS • UFBA



GEORGE GONÇALVES DOS SANTOS

**MICROESFERAS E GRÂNULOS COMPÓSITOS DE HIDROXIAPATITA
NANOESTRUTURADA ASSOCIADA AO ALGINATO PARA A
REGENERAÇÃO ÓSSEA**

Salvador
2015

GEORGE GONÇALVES DOS SANTOS

**MICROESFERAS E GRÂNULOS COMPÓSITOS DE HIDROXIAPATITA
NANOESTRUTURADA ASSOCIADA AO ALGINATO PARA A
REGENERAÇÃO ÓSSEA**

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
2015

GEORGE GONÇALVES DOS SANTOS

**MICROESFERAS E GRÂNULOS COMPÓSITOS DE HIDROXIAPATITA
NANOESTRUTURADA ASSOCIADA AO ALGINATO PARA A
REGENERAÇÃO ÓSSEA**

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.

Carlos Maurício Cardeal Mendes _____

Doutor em Saúde Coletiva, pela Universidade Federal da Bahia.
Universidade Federal da Bahia.

Marcus Vinícius Lia Fook _____

Doutor em Química, pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
Universidade Federal de Campina Grande.

Dedico este trabalho aos meus pais, Marinalva e Miguel,
por terem feito tudo que estivera ao alcance
para a realização deste projeto de vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me sustentado, dado forças para alcançar este objetivo, e sempre me fazer sentir Sua presença nas vitórias e nas horas difíceis.

À minha mãe, Marinalva Ramos Gonçalves dos Santos, meu forte, meu alicerce, pelo amor incondicional, orações incessantes e apoio emocional nos momentos difíceis de cansaço.

Ao meu pai, Miguel da Lapa Bispo dos Santos, pelo incentivo à dedicação nos estudos, desde sempre, e apoio material possível ao seu alcance.

Ao meu irmão, Miguel Gonçalves dos Santos, pela amizade e disposição em ajudar sempre que pudera.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Fabiana Paim Rosa, pela disposição, paciência e orientações peculiares e minuciosas. Além disso, agradeço pelos conselhos dados pela “pessoa” Fabiana Paim.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Fúlvio Borges Miguel, pela amizade sincera, ensinamentos e todo apoio dado, tanto nas etapas de construção deste trabalho, quanto na minha vida.

À Luisa Queiroz Vasconcelos, “Lulu”, um anjo que Deus enviou para me ajudar nesta etapa da vida; pela amizade, sorrisos, otimismo e apoio nos momentos de dificuldade.

À Suelen Cristina da Silva, “Su”, pela amizade e presença constante, disponível em ajudar no que fosse preciso.

Aos colegas do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais (LBTB), em especial à Iorrana Ribeiro e ao Anderson Cunha, pelos ensinamentos, e por terem sido alicerce fundamental para a viabilização deste trabalho.

Ao amigo Júnior Brandão, funcionário do biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), pelo profissionalismo, paciência e dedicação.

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

Ao Dr. Aryon de Almeida Barbosa Júnior, pela paciência, educação, gentileza e ensinamentos durante as análises histomorfológicas.

Ao Prof. Dr. Roberto Paulo Araújo, coordenador do programa de Pós-graduação, por todo o apoio.

À secretaria do programa de pós-graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

Aos meus colegas do programa de pós-graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

Ao Dr. Alexandre Malta Rossi e Sílvia Albuquerque Santos, do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, pela síntese e concessão dos biomateriais.

Aos amigos da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), em especial Aloísio Júnior e Nadson Duarte, pela troca de conhecimentos e incentivo.

Aos amigos Vera Mattos, Márcio Tucano, Joelha, Mary, dona "Neném", seu Joel, Pedro Mattos, "Pêu", e Mariana Mattos, por terem me acolhido de braços abertos no início desta empreitada.

Aos amigos Kleber Amaral, Anderson Rocha e Anderson Fonseca, pelo apoio e companhia nos momentos de adaptação no início desta jornada.

Ao Prof. Dr. Jorge Sadao Nihei, pelos conselhos e apoio durante a realização do Tirocínio Docente Orientado.

Aos amigos Kalliandra Rebouças, pelas correções de português, sinceridade e conselhos; e Lucas Rebouças, "Japonês", pelas doces horas de descontração, durante este trajeto.

À Thailany Magalhães, pelo carinho ímpar e ajuda em minúcias nas etapas finais deste trabalho.

A todos os meus familiares, pelo carinho e incentivo.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

*“Tudo o que sou tudo o que tenho
estão diante de Ti, Senhor
minhas tristezas e alegrias
a Ti entrego agora, Senhor”*

Claire Cloninger e Don Moen

SANTOS, George Gonçalves dos. **Microesferas e grânulos compósitos de hidroxiapatita nanoestruturada associada ao alginato para a regeneração óssea**. Salvador, 2015. 83 f. il. Dissertação (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2015.

RESUMO

As pesquisas na área da bioengenharia tecidual óssea (BTO) têm objetivado desenvolver condições ideais para o reparo e/ou a substituição do tecido lesado ou perdido, por meio da utilização de elementos celulares, fatores de crescimento e biomateriais. Estes últimos podem ser sintetizados em diferentes formas de apresentação, tais microesferas, grânulos. As microesferas promovem formação de interstício entre si, migração de células deposição de fatores de crescimento, difusão de nutrientes, síntese de nova matriz extracelular (MEC), e neovascularização. Os grânulos, além dessas propriedades, podem ser utilizados para preencher defeitos e lesões de formas irregulares. Dentre as biocerâmicas mais utilizadas, a hidroxiapatita (HA) ganhou destaque devido, principalmente, à sua biocompatibilidade, osteocondução e capacidade de se ligar quimicamente ao tecido ósseo (TO) do sítio receptor. Quando projetados em nanoescala, com área superficial entre 20-100nm, os cristais da HA podem se dissolver mais rapidamente devido à maior área de superfície exposta ao ambiente biológico e acelerar a velocidade de formação e crescimento da camada de apatita biologicamente ativa. Outra forma de otimizar as características físico-químicas desta HA é associá-la a polímeros naturais, como o alginato, para formar compósitos. Estes apresentam como principal vantagem a junção das propriedades físico-químicas da biocerâmica e do polímero, o que torna a utilização de compósitos alternativa promissora. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do formato e da composição de novos biomateriais compósitos de HA nanoestruturada associada ao alginato, para o reparo ósseo. Para isso, utilizou-se amostra composta por 15 ratos, distribuídos em 3 grupos experimentais, com 5 animais cada, avaliados no ponto biológico de 15 dias de pós-operatório: GHAMi – defeito ósseo preenchido com microesferas de hidroxiapatita associada ao alginato; GHAGr – defeito ósseo preenchido com grânulos de hidroxiapatita associada ao alginato; DC – defeito ósseo preenchido com coágulo sanguíneo. No GHAMi, observou-se neoformação óssea no interior de algumas microesferas às margens do defeito, e discreta inflamação crônica granulomatosa em volta das demais. No grupo GHAGr, a maioria das partículas se manteve íntegra e a inflamação crônica granulomatosa de permeio aos grânulos foi acentuada. No DC, houve neoformação óssea restrita às bordas ósseas e preenchimento de tecido conjuntivo em toda extensão do defeito, com espessura reduzida em relação às bordas. Diante do exposto, conclui-se que o formato dos compósitos foi determinante na resposta tecidual aos biomateriais e, nesta fase inicial do reparo ósseo, as microesferas foram mais atraentes para a neoformação óssea.

Palavras-chave: Compósitos, hidroxiapatita, polímeros, microesferas, grânulos.

SANTOS, George Gonçalves dos. **Microspheres and granules composites nanostructured hydroxyapatite associated with alginate for bone regeneration.** Salvador, 2015. 83 f. il. Theses (Master's degree in Interactive processes of systems and organs) – Health Science Institute, Federal University of Bahia, Salvador. 2015.

ABSTRACT

The researches in bone tissue engineering (BTE) have the objective to develop ideal conditions for the repair and/or replacement of injured or lost tissue, with the application of cellular elements, growth factors and biomaterials. These last examples can be synthesized in different forms of presentation, such as microspheres, granules. The microspheres promote formation of interstices with each other, migration of cells deposition of growth factors, diffusion of nutrients, new extracellular matrix synthesis (ECM), and neovascularization. The granules in addition to these properties, they can be used to fill defects and injuries of irregular shapes. Among the most used bioceramics, hydroxyapatite (HA) has gotten distinction mainly due to its biocompatibility, osteoconduction and ability to link chemically to bone tissue (BT) of the receptor site. When they have been designed nanoscale, with a surface area between 20-100nm, crystals of HA may dissolve faster due to the biggest surface area exposed to the biological environment and accelerate the speed of formation and growth of biologically active apatite layer. Another way to optimize the physicochemical characteristics of the HA is to associate it with natural polymers like the alginate to form composites. These show the main advantage of joining the physicochemical properties of bioceramics and polymer, which becomes the use of composite promising alternative. In this context, the aim of this study was to evaluate the influence of the shape and composition of new composite biomaterial nanostructured HA associated with the alginate, to bone repair. For this study, we have used a sample of 15 mouse were divided into three experimental groups of 5 animals each, evaluated the biological point of 15 days post-surgery: GHAMi - bone defect filled with hydroxyapatite microspheres associated with alginate; GHAGr - bone defect filled with hydroxyapatite granules associated with the alginate; DC - bone defect filled with blood clot. In GHAMi, bone neoformation was observed inside some microspheres to defect margins, and mild chronic granulomatous inflammation around the others. In GHAGr group, the most of the particles kept intact and chronic granulomatous inflammation in between the granules was evidenced. In DC, there was restricted bone formation to bone tissue edges and filling of the connective tissue in all the defective site with the thickness reduced relative to the edges. Based on the above considerations, it is concluded that the composite shape was determinant in tissue response to biomaterials and at this early stage of bone healing, the microspheres were more attractive to new bone formation.

Keywords: Composites, hydroxyapatite, polymers, microspheres, granules.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Célula unitária da hidroxiapatita.	27
Figura 2	Estrutura da hidroxiapatita ao longo do eixo C.	27
Figura 3	Esfera de coordenação do $\text{Ca}_I\text{-O}$.	28
Figura 4	Esfera de coordenação do $\text{Ca}_{II}\text{-O}$.	28
Figura 5	Esfera de coordenação do P-O.	29
Figura 6	Representação da dimensão dos biomateriais nanoestruturados e sua associação com os sistemas biológicos.	30
Figura 7	Representação da interação entre a célula (espraiada e achatada) com a estrutura do arcabouço microporoso.	32
Figura 8	Estrutura representativa do alginato.	33
Figura 9	Estrutura representativa da sequência estrutural do alginato.	33
Figura 10	Estrutura representativa do alginato de sódio.	34
Figura 11	Representação da interação dos blocos G na presença de íons Ca II , de acordo com o modelo <i>egg-box</i> .	36
Figura 12	Distribuição das células no TO.	37
Figura 13	Representação da associação entre os cristais de HA e as fibras de colágeno no TO.	40
Figura 14	Representação do mecanismo de remodelação óssea.	41
Figura 15	Microesferas em tubos <i>eppendorf</i> .	47
Figura 16	Grânulos em tubos <i>eppendorf</i> .	48
Figura 17	Espectros vibracionais de infravermelho da amostra preparada a 90°C .	49
Figura 18	Picos correspondentes ao tamanho de HA padrão.	50
Figura 19	Principais etapas do procedimento cirúrgico: a. Exposição	52

do TO. b. Confeção do defeito ósseo. c. Demarcação do defeito ósseo. d. Defeito ósseo crítico confeccionado. e. Biomaterial implantado. f. Sutura do retalho.

Figura 20	Representação do defeito crítico em calvária de rato. a. Vista superior. b. Vista pósterio-anterior.	53
Figura 21	GHAGr. Análise da região das bordas ósseas.	56
Figura 22	GHAMi. Análise da região das bordas ósseas.	56
Figura 23	DC. Análise da espessura do defeito e das bordas.	57
Figura 24	GHAMi. Análise da região central do defeito ósseo.	57
Figura 25	GHAGr. Análise da região central do defeito ósseo.	58
Figura 26	DC. Análise da borda e região central do defeito ósseo.	58
Figura 27	DC. Análise da região central do defeito ósseo.	
Figura 28	GHAMi. Análise da espessura do defeito e das bordas.	59
Figura 29	GHAMi. Análise da espessura do defeito e das bordas.	59
Figura 30	GHAGr. Análise da espessura do defeito e das bordas.	60
Figura 31	GHAMi. Análise do interstício entre as partículas.	60
Figura 32	GHAMi. Análise da reação inflamatória e da biodegradação das partículas em menor aumento.	61
Figura 33	GHAMi. Análise da reação inflamatória e da biodegradação das partículas em menor aumento.	61
Figura 34	GHAMi. Análise neoformação tecidual.	62
Figura 35	GHAMi. Análise qualidade da neoformação tecidual.	62
Figura 36	GHAGr. Análise do interstício entre as partículas.	63
Figura 37	GHAGr. Análise da neoformação tecidual.	63
Figura 38	GHAGr. Análise da qualidade da neoformação tecidual.	64
Figura 39	GHAGr. Análise da reação inflamatória e da biodegradação das partículas em menor aumento.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais CaP, suas formulações químicas, ocorrência nos sistemas biológicos e razão Ca/P.	25
Tabela 2	Resultados da análise química das amostras.	48
Tabela 3	Número de animais de acordo com o grupo experimental e ponto biológico.	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Tridimensional
<i>ad libitum</i>	Expressão latina que significa “à vontade”
Ba ²⁺	Íons de Bário
BMP	Proteína óssea morfogênica
BO	Borda óssea
BTO	Bioengenharia Tecidual Óssea
Ca	Cálcio
Ca I	Íons de cálcio localizados no sítio I
Ca II	Íons de cálcio localizados no sítio II
Ca ²⁺	Cálcio ionizado
CaP	Fosfato de cálcio
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CPPD	Pirofosfato de cálcio dihidratado
Cu	Cobre
DC	Grupo de defeito ósseo preenchido com coágulo sanguíneo
DCPD	Monohidrogeno fosfato de cálcio dihidratado
DM	Região da dura-máter
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
F	Flúor
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
G	Unidade de Ácido α -L-gulurônico
GHAGr	Grupo de defeito ósseo preenchido com grânulos de hidroxiapatita associada ao alginato
GHAMi	Grupo de defeito ósseo preenchido com microesferas de hidroxiapatita associada ao alginato
GOLD	Tricrômico de Masson-Goldner
Gr	Grânulos
H	Hidrogênio
HA	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina-Eosina
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
ICDD	Internacional Centre for Diffraction Data

IGF	Fator de crescimento de insulina
IGF-1	Fator de crescimento “insuline like”
IPAC	Instituto de Patologia Geral e Cutânea
K	Potássio
LTDA	Limitada
M	Unidade de Ácido β -D-manurônico
MEC	Matriz Extracelular
Mg	Magnésio
Mi	Microesferas
Na	Sódio
NO	Neoformação óssea
O ²	Oxigênio
O ²⁻	Íons óxidos
OCP	Fosfato de octacálcio
OH	Hidroxila
P	Fósforo
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIFG	Picrossirius-Red
PLA	Ácido polilático
PLGA	L-ácido láctico-co-ácido glicólico
PO ₄	Fosfato
PTH	Hormônio da paratireoide
RER	Retículo endoplasmático rugoso
S/C	Sociedade Civil
Sr	Estrôncio
Sr ²⁺	Íons de estrôncio
TBA	Tetrabutilamônio
TBAF	Fluoreto de tetrabutilamônio
TC	Tecido conjuntivo
TCF	Tecido conjuntivo fibroso
TCf	Tecido conjuntivo frouxo
TCP	Fosfato de cálcio
TO	Tecido ósseo
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana

UFBA	Universidade Federal da Bahia
VC	Veia central
Zn	Zinco

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
Å	Ångström
nm	Nanômetros
β	Beta
α	Alfa
mm	Milímetros
μm	Micrômetros
nm	Nanômetros
cm	Centímetros
min	Minutos
s	Segundos
mL	Mililitros
%	Por cento
g	Gramas
M	Molar
®	Registrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1	BIOENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA E BIOMATERIAIS.....	21
2.1.1	A hidroxiapatita.....	25
2.1.2	Arcabouços nanoestruturados.....	29
2.1.3	Compósitos.....	31
2.1.4	O alginato.....	33
2.2	FISIOLOGIA DO REPARO ÓSSEO.....	37
2.3	PRINCIPAIS PROPRIEDADES DAS MICROESFERAS E DOS GRÂNULOS.....	42
3	OBJETIVO.....	45
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1	BIOMATERIAIS.....	47
4.1.1	Síntese e caracterização físico-química.....	47
4.2	AMOSTRA.....	50
4.3	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	51
4.4	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS.....	51
4.5	ETAPA LABORATORIAL.....	52
4.5.1	Processamento histológico.....	52
4.5.2	Análise histomorfológica.....	53
5	RESULTADOS.....	55
5.1	PONTO BIOLÓGICO DE 15 DIAS.....	55
6	DISCUSSÃO.....	67
7	CONCLUSÕES.....	73
	REFERÊNCIAS.....	75
	ANEXO	83

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Os pesquisadores da bioengenharia tecidual óssea (BTO), área emergente, interdisciplinar e multiprofissional, têm buscado desenvolver condições ideais para o reparo e/ou a substituição do tecido lesado ou perdido, por meio da utilização de elementos celulares, fatores de crescimento e biomateriais, os quais podem fornecer estruturas tridimensionais (3D) essenciais durante a neoformação tecidual.

Esses biomateriais podem ser sintetizados em diferentes formas de apresentação, tais como fibras, membranas, géis, microesferas, grânulos, dentre outras. As microesferas têm como principal potencialidade a capacidade de promover formação de interstício entre si, que possibilita migração de células, especialmente mesenquimais e osteoprogenitoras, deposição de fatores de crescimento, difusão de nutrientes, síntese de nova matriz extracelular (MEC), e neovascularização. Os grânulos, além de possuírem essas propriedades, podem ser utilizados para preencher defeitos e lesões de formas irregulares, por meio de sistemas injetáveis, em procedimentos cirúrgicos minimamente invasivos, por exemplo.

Dentre os arcabouços projetados como substitutos ósseos, sintetizados à base de fosfato de cálcio (CaP), no formato de microesferas e/ou de grânulos, destaca-se a hidroxiapatita (HA), amplamente utilizada, principalmente, devido à sua biocompatibilidade, osteocondução e capacidade de se ligar quimicamente ao TO do sítio receptor. Pesquisadores têm projetado a HA em nanoescala, tendo em vista que os cristais de HA nanoestruturados podem se dissolver mais rapidamente devido à maior área de superfície exposta ao ambiente biológico e acelerar a velocidade de formação e crescimento da camada de apatita biologicamente ativa.

Outra forma de otimizar as características físico-químicas desta HA, durante a síntese, é associá-la a polímeros de origem sintética e/ou de origem natural. Dentre esses, o alginato, para compor os denominados biomateriais compósitos. Estes, trazem, como principal vantagem, a junção das propriedades físico-químicas do CaP e do polímero, no mesmo arcabouço, que mimetiza as fases mineral e orgânica do tecido ósseo (TO) natural.

O alginato, extraído de algas pardas, ao ser associado à HA, pode modificar a estrutura e a morfologia dos cristais de HA, alterar a cristalinidade, a solubilidade, os parâmetros de rede, a estabilidade térmica, a reatividade superficial, a bioatividade,

a biocompatibilidade e as propriedades de adsorção da estrutura da HA, o que torna a utilização de compósitos alternativa promissora.

Sendo assim, apesar do TO apresentar excelente capacidade reparativa em condições fisiológicas, consolidada por regeneração, algumas lesões e/ou traumas atingem dimensões que impossibilitam esta restauração e dificultam o restabelecimento funcional ou estético da área afetada. Deste modo, na busca de superar estas limitações, devido às suas principais propriedades aqui apresentadas, as microesferas e os grânulos compósitos de HA e alginato tornam-se alternativa promissora para substituição óssea, em diferentes situações.

Diante do exposto, paralelo à necessidade, a nível mundial, de se desenvolver novos biomateriais, com tecnologia nacional e custo acessível, mais versáteis e com propriedades biológicas promitentes para o uso, em especial, nos casos de perdas ósseas extensas, o presente estudo tem como objetivo avaliar a influência do formato na biocompatibilidade e no potencial osteogênico de novos biomateriais, para o reparo ósseo.

Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BIOENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA

A bioengenharia tecidual é um campo multidisciplinar que incorpora as áreas da Ciência dos Materiais, Engenharias Biomédica, Química, Física e Mecânica, Biologia Celular e Molecular, Medicina e Odontologia, e Ciência Avançada das Células Tronco, dentre outras. Com base nesses conhecimentos, os pesquisadores buscam alternativas para restaurar as funções dos tecidos e/ou órgãos danificados ou perdidos. Assim, para alcançar a regeneração tecidual bem-sucedida, tem-se buscado a concepção de novos biomateriais “inteligentes” e complexos, com propriedades que mimetizem as MEC, e possam servir de arcabouço temporário, capaz de induzir as células hospedeiras a assumir suas funções especializadas. (CHAE et al., 2013).

Biomateriais são definidos como aqueles materiais projetados para interagir com os diferentes órgãos e sistemas e influenciar nos processos biológicos, de modo a tratar, substituir e/ou aumentar qualquer tecido, órgão ou função no organismo. (O'BRIEN, 2011) Quando qualquer material é implantado em determinado sítio orgânico, induz uma resposta inflamatória denominada reação corpo estranho. (RATNER et al., 2004) O ideal é que esta não culmine em reação inflamatória exacerbada no tecido do hospedeiro, ou seja, o material deve ser não tóxico, não carcinogênico, não antigênico e não mutagênico (ALMEIDA, 2010); ser biocompatível, quimicamente semelhante ao tecido natural, (MARTIN; 2000; CAMPOS et al., 2005) de modo a evitar a rejeição pelo organismo.

Quanto à sua natureza, os biomateriais podem ser classificados em metais, cerâmicos, polímeros e compósitos. Cada categoria pode ser apresentada em diversos formatos e formas de apresentação, tais como sólidos, membranas, fibras ou revestimentos, e servir para substituição estrutural de tecidos e/ou órgãos com diferentes graus de comprometimento; compor dispositivos eletrônicos que realizam trocas químicas com o organismo; atuar na reparação de danos e/ou defeitos teciduais; e em sistemas de distribuição controlada de drogas, (MARTIN, 2000) dentre outros.

Os metais são os principais materiais utilizados na confecção de implantes para resistir a grandes forças mecânicas, por exemplo, haste femoral, bandeja tibial

(GOMES, 2010) e implantes dentários.

Os cerâmicos são empregados, de forma mais frequente, nas aplicações para promover a regeneração óssea, em geral, por conterem minerais constituintes naturais do TO em sua composição química, tais como CaP. Dentre estes, pode-se citar a HA, natural ou sintética, como Bio-Oss® e o Bioglass®, a HA e o Fosfato de tricálcio (TCP).

Os polímeros, devido à ampla variedade de arranjos estruturais em 3D e composições químicas que diferenciam cada polímero, podem ser usados nos diferentes tecidos ou sistemas, nas mais diversas aplicações. (TOCCE et al., 2012) Podem ser de origem natural, como o alginato, o colágeno e a quitosana, ou sintética, como o policaprolactona e o polietileno. (SANTOS; MARINHO; MIGUEL, 2013) Estes materiais apresentam biocompatibilidade; flexibilidade; biodegradação que gera produtos atóxicos eliminados por vias metabólicas; boa processabilidade; e baixo custo de fabricação, em relação aos demais tipos. (ALMEIDA, 2010; SANTOS; MARINHO; MIGUEL, 2013)

Os biomateriais podem ser classificados, também, de acordo com o comportamento biológico e interação com o organismo, em biotoleráveis, bioinertes e bioativos. (ALMEIDA, 2010; GOMES, 2010)

Biotoleráveis são materiais que, após implantação, induzem uma reação orgânica que resulta em encapsulamento por tecido conjuntivo (TC), com a presença de numerosos macrófagos e outras células fagocitárias, predominantes no achado histológico. (GOMES, 2010) A formação dessa camada fibrosa é induzida pela liberação de compostos químicos, íons, produtos de corrosão e outros, por parte do material. Grande parte dos polímeros sintéticos, bem como a maioria dos metais fazem parte desta classe. (ALMEIDA, 2010)

Os bioinertes exercem mínima interação biológica com os tecidos circunjacentes, e induzem encapsulamento fibroso bastante reduzido. (GOMES, 2010) Estes materiais não liberam nenhum tipo de componente químico e a quantidade de células fagocitárias em sua interface com o tecido do hospedeiro, após implantação, é mínima, o que torna a atividade fagocítica temporária. A alumina, a zircônia, o titânio e o carbono são alguns exemplos. (ALMEIDA, 2010)

Os bioativos são materiais capazes de interagir ativamente com o organismo do hospedeiro, incorporando-se aos tecidos aderidos ao implante sem a formação

de encapsulamento fibroso, por meio de interações químicas. Dentre estes, pode-se citar os biovidros e vitro-cerâmicas à base de CaP. (ALMEIDA, 2010)

Sabendo-se disso, os pesquisadores da BTO têm buscado desenvolver condições ideais para o reparo e/ou a substituição do TO, pela utilização de elementos celulares, fatores de crescimento e biomateriais, nem sempre utilizados simultaneamente, os quais fornecem estruturas 3D essenciais durante a neoformação tecidual, (IKADA, 2006; O'BRIEN, 2011) para atuarem como substitutos ósseos em cirurgias reconstrutivas. (O'BRIEN et al., 2004)

Neste cenário, vê-se, nos últimos anos, a necessidade da utilização de substitutos e/ou enxertos ósseos em diferentes procedimentos cirúrgicos. (STRIETZEL; REICHART; GRAF, 2007) Entretanto, para que a utilização destes biomateriais se estabeleça, é ideal que apresentem algumas propriedades fundamentais, selecionadas de acordo com o objetivo de cada aplicação, tais como osteoindução, capacidade de induzir células-tronco, indiferenciadas e pluripotentes, a desenvolver linhagem de células formadoras de osso; osteocondução, capacidade de permitir migração celular e neoformação óssea na superfície ou dentro os poros, canais ou tubos do arcabouço; osteointegração, servir como ancoragem direta para neoformação óssea ao redor do implante, sem deposição de TC na interface osso-implante (ALBREKTSSON; JOHANSSON, 2001); biocompatibilidade, capacidade de atuar em aplicações específicas na presença de resposta imune tolerável (MOHARAMZADEH; BROOK; VAN NOORT, 2009); biorreabsorção, propriedade do material ser eliminado totalmente e dos subprodutos de degradação (compostos de baixa massa molar), sem efeitos colaterais residuais (GARCÍA, 2010); e biodegradação, sofrer dispersão *in vivo*, sem a eliminação dos produtos e subprodutos pelo organismo, (GARCÍA, 2010) cuja velocidade ideal deve ser compatível com a neoformação tecidual. (LIU; MA, 2004)

Os substitutos ósseos podem ser obtidos a partir do tecido próprio do indivíduo, denominados autógenos; de outros doadores da mesma espécie, homogêneos; de espécies diferentes, xenógenos; ou de materiais de origem sintética, denominados aloplásticos.

O autógeno é considerado padrão ouro, principalmente, por ser osteogênico, tendo em vista que promove viabilidade das células ósseas. Além disso, esse tipo de enxerto induz a liberação de fatores de crescimento, tais como proteínas ósseas morfogênicas (BMP), de forma que modula a neoformação óssea local, sendo

osteoadutor. (YIP et al., 2014) Apesar disto, a sua disponibilidade é limitada, devido à morbidade do sítio doador. (STRIETZEL; REICHART; GRAF, 2007; YIP et al., 2014). Diante disto, os xenógenos, de origem animal, tornaram-se alternativa mais viável, todavia há risco de transmissão de doenças, e alta imunogenicidade, do doador para o hospedeiro, devido a seu componente proteico. Fato este que induziu os pesquisadores a utilizar, por exemplo, o osso bovino desproteínizado que passou a ser amplamente pesquisado e tornou-se popular, devido aos resultados clínicos promissores, quando utilizado como adjuvante em terapias com implantes. Em contrapartida, a principal desvantagem da utilização destes materiais é a reabsorção lenta e incompleta, que resulta em um volume considerável de material que não pode ser biodegradado e substituído por novo TO, e limita sua osteocondução. (YIP et al., 2014)

Neste contexto, os biomateriais aloplásticos, bioengenheirados, surgem de modo a restringir a necessidade de remoção de tecido do doador, e tornaram-se pilar importante no campo da medicina regenerativa. Incorporados a estes biomateriais poder-se-á, também, utilizar moléculas sinalizadoras, tais como fatores de crescimento, de modo a induzir a diferenciação, crescimento e proliferação celular. (POLDERVAART et al., 2013; CARDOSO et al., 2014) Além disso, podem ser sintetizados em formatos e formas de apresentação variáveis, tais como adesivos, géis, cilindros, discos, microesferas, grânulos, filmes, membranas, pós, plásticos, blendas, borrachas, fibras, espumas, (MARTIN, 2000; KOUTSOS, 2009) dentre outros. Essas características oferecem vantagens significativas em comparação aos enxertos ósseos convencionais, uma vez que as microesferas e os géis, por exemplo, podem ser injetadas diretamente em defeitos ósseos e lesões de formato irregular, em que o preenchimento se dê numa conformação que ofereça melhor contato entre biomaterial e tecido hospedeiro. (PARK et al., 2014; CARDOSO et al., 2014)

Assim sendo, os biomateriais à base de CaP têm sido amplamente pesquisados e utilizados como substitutos ósseos (ARAUJO, 2006; KALITA; BHATT, 2007; MARQUES, 2010) devido, principalmente, à sua natureza química composta, basicamente, por íons Ca e P, os quais participam ativamente do equilíbrio entre os fluídos biológicos e as cerâmicas, (LACERDA, 2005) e entre estes e o TO. Desta forma, a utilização de biomateriais no formato de microesferas e/ou grânulos, como arcabouços, vem sendo cada vez mais estudada, haja vista que o interstício formado

entre as partículas possibilita migração de células, especialmente mesenquimais e osteoprogenitoras; deposição de fatores de crescimento; difusão de nutrientes; neovascularização; e síntese de nova MEC.

Os CaP podem ser formados em calcificações normais e em patológicas, o que despertou interesse significativo dos pesquisadores em entender estes mecanismos e, conseqüentemente, na utilização destes compostos como biomateriais. Em geral, são classificados pela sua razão molar Ca/P. Deste modo, os CaP que possuem razão molar que varia de 0,5 a 2,0 podem ser sintetizados pela precipitação a partir de soluções, contendo íons cálcio (Ca) e fósforo (P), sob condições alcalinas ou ácidas. Conseqüentemente, foi criada uma relação dos principais CaP, suas ocorrências nos sistemas biológicos e sua razão Ca/P (Tabela 1). (ARAÚJO, 2006)

Tabela 1 – Principais CaP, suas formulações químicas, ocorrência nos sistemas biológicos e razão Ca/P.

Nome	Fórmula Química	Ocorrência	Ca/P
Monohidrogeno fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cálculo dentário, ossos decompostos.	1,0
Pirofosfato de cálcio dihidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Depósitos de pseudo-gotas de fluidos.	1,0
Fosfato de octacálcio (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Cálculo dentário e urinário.	1,33
Fosfato de tricálcio (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Cálculo dentário e urinário, pedras salivares, cáries dentárias, calcificação tecidos moles.	1,5
Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Esmalte, dentina, osso, cálculo dentário, pedras, cálculo urinário, calcificação de tecido mole.	1,67

Fonte: Adaptado de Araújo (2006).

2.1.1 A hidroxiapatita

A HA é um CaP hidratado, que consiste no principal componente da fase inorgânica do TO e dos dentes humanos. Sua fórmula molecular é representada por $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. A palavra hidroxiapatita é formada pela junção das palavras *hidróxi* que se refere ao grupo hidroxila (OH^{1-}), presente no material, e *apatita* que designa o mineral. Apatita, do grego “*decepção*”, refere-se ao fato de ser confundida com

turmalina e berilo. (FERREIRA, 2009)

Dentre outras peculiaridades, esse biomaterial destaca-se, principalmente, por apresentar biocompatibilidade; excelente osteocondutividade; capacidade de se ligar ao TO; composição química semelhante à fase inorgânica do osso; não apresentar risco de transmissão de doenças (VALLET-REGÍ; GONZÁLEZ-CALBET, 2004; YUASA et al., 2004, PARK et al., 2012) e toxicidade local ou sistêmica. (KAWACHI et al., 2000; VALLET-REGÍ; GONZÁLEZ-CALBET, 2004) Para além das exigências relacionadas à composição química, a HA pode servir de arcabouço para eventos celulares ocorridos durante a regeneração tecidual, em uma estrutura confeccionada por poros interligados, que permitem a adesão, proliferação e diferenciação das células; e a difusão dos fluidos biológicos, fundamentais à neoformação óssea. (PARK et al., 2012)

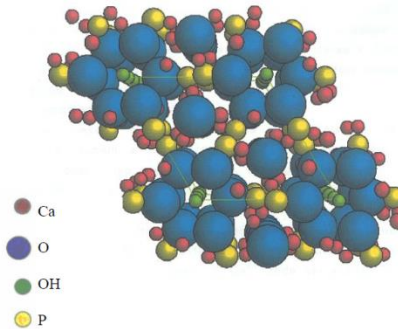
Durante sua síntese, quando tratados com temperatura superior a 800°C, esse material torna-se cerâmico e não absorvível ao longo do tempo, e permanece no organismo durante anos, (CONZ; GRANJEIRO; SOARES, 2011) o que pode limitar seu uso na prática clínica, pois em grande parte das aplicações como substituto ósseo a biodegradação e substituição do material por novo tecido é altamente desejável. Outro fator que pode restringir a utilização da HA cerâmica é a sua baixa resistência mecânica, especialmente, se o local a ser reparado estiver em regiões anatômicas que estão sob constante tensão.

A HA pode ser de origem natural, obtida, por exemplo, a partir de TO homogêneo, heterogêneo ou corais marinhos, dentre outros; ou sintética, produzida tanto por precipitação em meio aquoso, em geral a mais utilizada por sua simplicidade e baixo custo; quanto por tratamentos térmicos em temperaturas elevadas. (FERREIRA, 2009; MOREIRA, 2009; MARQUES, 2010) Essas técnicas produzem HA com estrutura cristalina semelhante, embora apresentem propriedades físico-químicas diferentes. (MARQUES, 2010) Os CaP sintetizados às temperaturas elevadas exibem reabsorção relativamente lenta, o que é desvantajoso para o mecanismo de remodelação óssea no local do implante. Por este motivo, o desenvolvimento de biomateriais à base de CaP nanocristalino, preparada sem o tratamento à alta temperatura, tem sido o foco de interesse dos pesquisadores. (BERNHARDT et al., 2013)

Na HA, o P, junto ao oxigênio, forma o grupo fosfato (PO_4), sendo denominado grupo hidroxila (OH) a ligação entre o oxigênio (O_2) e o hidrogênio (H).

Esses grupos, juntamente com o Ca, se disseminam, espacialmente, segundo arranjo de forma hexagonal, pertencente ao grupo espacial P63/m e dimensões de célula unitária $a=b=9,42 \text{ \AA}$ e $c= 6,88 \text{ \AA}$. (Figura 1). (ARAÚJO, 2006; CORTES, 2010)

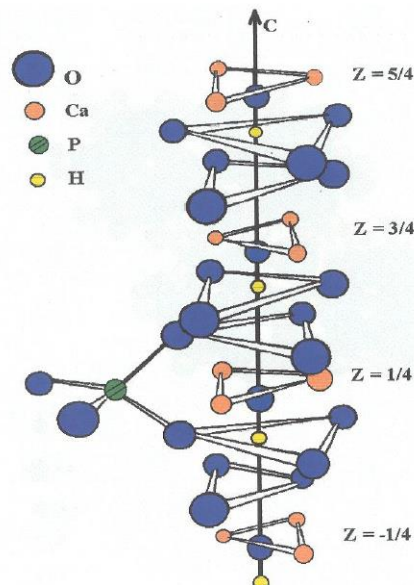
Figura 1 – Célula unitária da hidroxiapatita.



Fonte: Adaptado de Araújo (2006).

A estrutura atômica da HA consiste em uma célula hexagonal que contém dez íons Ca localizados em dois sítios não equivalentes, quatro no sítio I (Ca I) e seis no sítio II (Ca II). Os íons Ca no sítio I estão alinhados em colunas, já os do sítio II estão em triângulos equiláteros, perpendiculares à direção “C” da estrutura (Figura 2). (LACERDA, 2005; ARAÚJO, 2006; CORTES, 2010)

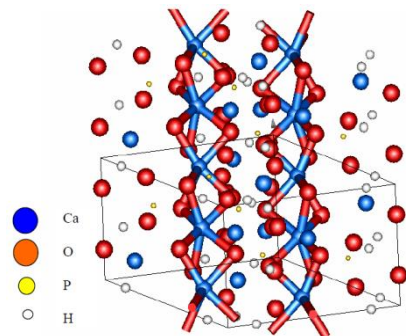
Figura 2 – Estrutura da hidroxiapatita ao longo do eixo C.



Fonte: Adaptado de Araújo (2006).

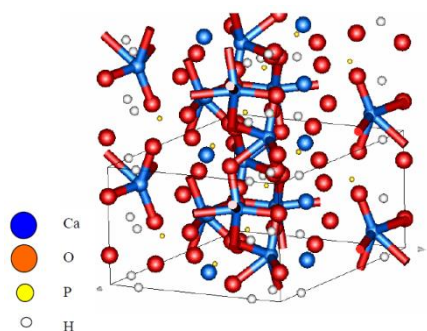
Os cátions do sítio I estão coordenados a seis átomos de oxigênio pertencentes a diferentes tetraedros de PO_4 e, também, a três outros átomos de O, relativamente distantes. Os íons de Ca I possuem seis oxigênios à distância de 2,4 Å, enquanto que o sítio do Ca II é mais distorcido, e possui três O à distância de 2,3 Å, dois O com distância de 2,5 Å e um O a 2,2 Å (Figura 3 e 4). A existência destes dois sítios de Ca traz consequências importantes à HA com impurezas catiônicas, pois suas propriedades estruturais podem ser modificadas a depender do sítio ocupado pelo cátion da impureza. (LACERDA, 2005; ARAÚJO, 2006; CORTES, 2010) Uma das características mais importantes desta estrutura é a possibilidade da realização de inúmeras substituições isomórfica, (DOURADO, 2006) incluindo-se íons metálicos no sítio de ligação do Ca, como zinco (Zn), estrôncio (Sr), flúor (F), (DOURADO, 2006) potássio (K), sódio (Na), cobre (Cu) e magnésio (Mg). (KALITA; BHATT, 2007; CORTES, 2010)

Figura 3 – Esfera de coordenação do Ca_I -O.



Fonte: Adaptado de Araújo (2006).

Figura 4 – Esfera de coordenação do Ca_{II} -O.



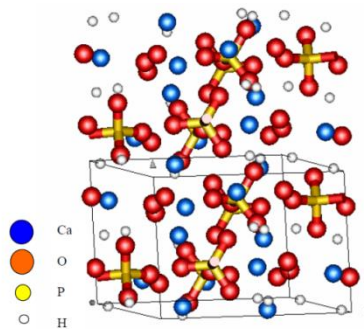
Fonte: Adaptado de Araújo (2006).

Os átomos de Ca e P formam uma estrutura hexagonal no plano

perpendicular ao eixo cristalino de maior simetria. Colunas constituídas pelo empilhamento de triângulos equiláteros de íons óxidos (O^{2-}) e de íons Ca (Ca^{2+}) estão ligados entre si por íons fosfato. Os átomos de O dos íons OH estão situados à distância de 0,9 Å, abaixo do plano formado pelos triângulos de Ca e a ligação O-H forma um ângulo de aproximadamente 30 graus em direção a “C”. Dos quatro átomos de O constituintes dos grupos fosfatos, dois estão situados em planos perpendiculares à direção c e os outros dois são paralelos a esta direção. (ARAÚJO, 2006; CORTES, 2010)

Os tetraedros dos grupos PO_4 se arranjam de forma que possibilitam a formação de dois tipos de canais perpendiculares ao plano basal. O primeiro canal tem diâmetro de 2 Å, paralelo aos eixos ternários, ocupados por átomos de Ca I. Em cada célula unitária, encontram-se dois canais ocupados por íons Ca I localizados em $z=0$ e $z=1/2$ do parâmetro cristalino. O segundo canal tem diâmetro de 3,0 a 3,5 Å, constituído por íons Ca II localizados em $z=1/4$ e $z=3/4$. No interior desses canais dá-se a distinção entre as formas hexagonal e a monoclinica (Figura 5). (ARAÚJO, 2006; CORTES, 2010)

Figura 5 – Esfera de coordenação do P-O.



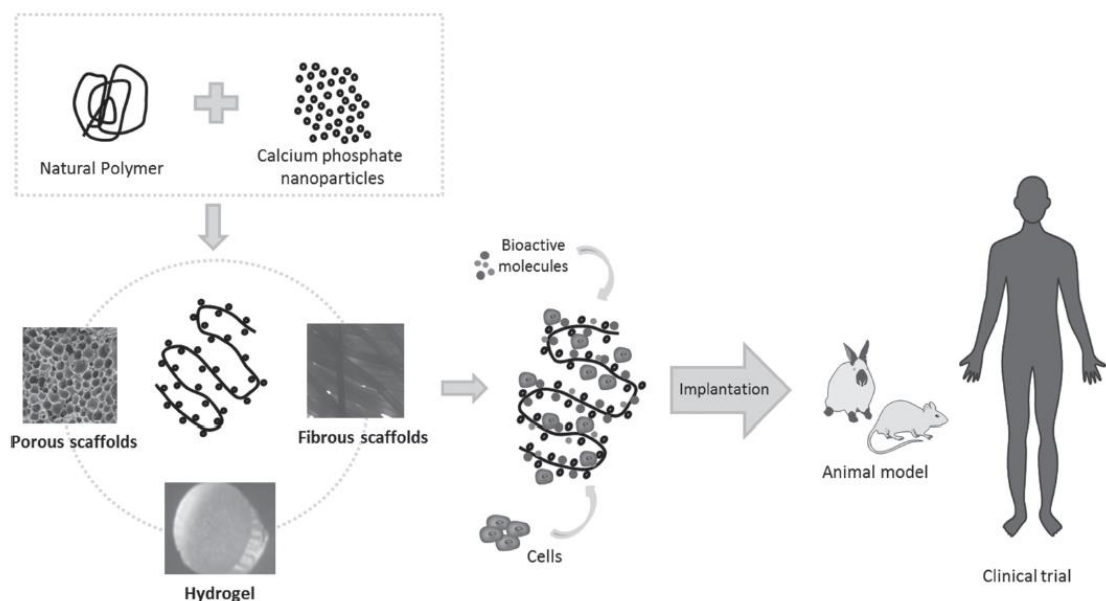
Fonte: Adaptado de Araújo (2006).

2.1.2 Arcabouços nanoestruturados

Na última década, estudos têm evidenciado que partículas com área de superfície inferior a centenas de micrômetros podem oferecer boas condições de substrato para células aderirem e, conseqüentemente, regenerar lesões. (PARK et al., 2014) Neste sentido, os biomateriais projetados em escala nanométrica, denominados nanobiomateriais, tornaram-se amplamente testados em

experimentações *in vitro*, *in vivo* e ensaios clínicos. (VASCONCELOS et al., 2014) Estes materiais caracterizam-se por sua estrutura composta de partículas que se configuram em arcabouço 3D, com área superficial que varia entre 20-100nm, sintetizados a partir de diferentes substratos, desde cerâmicos aos poliméricos. (Figura 6) (STRIETZEL; REICHART; GRAF, 2007; TELLEMAN et al., 2010; WALMSLEY et al., 2015)

Figura 6 – Representação da dimensão dos biomateriais nanoestruturados e sua associação com os sistemas biológicos.



Fonte: Adaptado de Pina, Oliveira e Reis (2015).

Os biomateriais nanoestruturados exibem propriedades fundamentais para aplicações na regeneração tecidual, tais como boa adesão aos tecidos circunjacentes, reabsorção ajustável e capacidade de adsorver grande número de moléculas em sua superfície. (KASAJ et al., 2008) No TO, o mecanismo de biomineralização induzida por estes materiais estimula o CaP amorfo e os nanocristais de HA a iniciar a nucleação nos espaços situados entre as fibras de colágeno, (CHAE et al., 2013) que os torna promissores para a BTO.

Tendo em vista essas características ultraestruturais e suas propriedades físico-químicas, a utilização da HA, projetada em nanoescala, torna-se promissora, pois os cristais nanoestruturados em menor dimensão se dissolvem mais rapidamente do que os cristais maiores, de mesma composição, devido à área de superfície exposta ao ambiente biológico. Assim, a HA nanoestruturada pode

acelerar a velocidade de formação e crescimento da camada de apatita biologicamente ativa, permitir a ligação química entre os biomateriais e o osso neoformado, bem como a fixação e, posterior, diferenciação das células tronco locais. (VALENZUELA et al., 2012)

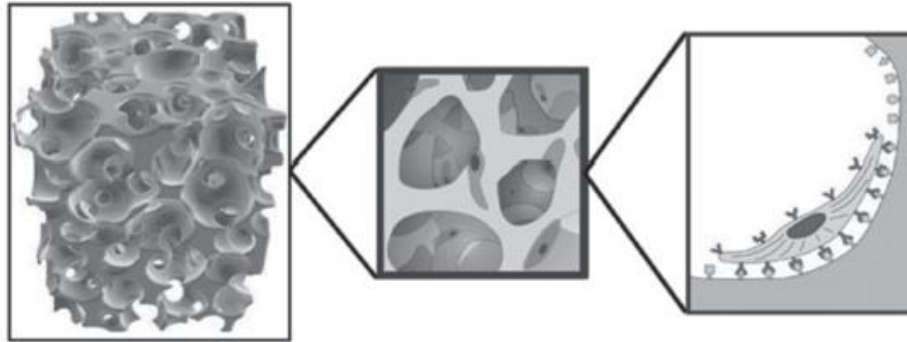
2.1.3 Compósitos

Uma alternativa promissora para a utilização da HA nanoestruturada é associá-la a outros materiais para a produção de compósitos, aqueles com estrutura composta por mais de um tipo de substrato, os quais mimetizam o TO natural e favorecem a osteogênese acompanhada de uma degradação gradativa, compatível com a regeneração óssea. Além disso, esses materiais oferecem maior área de superfície, alta reatividade da superfície, ligação interfacial relativamente forte, *design* flexível, e propriedades mecânicas melhoradas, em comparação com compósitos de massa convencionais. (VALENZUELA et al., 2012) Vale ressaltar, também, que os compósitos devem ser sintetizados a partir da escolha de uma matriz polimérica adequada. Para isto, alguns requisitos, em relação aos materiais de arcabouço, devem ser rigorosamente considerados, tais como biocompatibilidade, estrutura 3D porosa, química de superfície adequada para a adesão celular e mineralização, resistência mecânica suficiente para suportar o *stress in vivo*, e taxa de biodegradação adequada, que gere derivados não tóxicos. (VALENZUELA et al., 2012)

Concomitante, fator crucial a se levar em consideração é o grau de porosidade e interligação entre os poros do arcabouço. Para promover efetivamente a neoformação óssea, *in vivo*, é necessário que esta estrutura possibilite a neovascularização, migração e proliferação dos osteoblastos, e deposição de matriz óssea nos espaços vazios. Todavia, há um dilema crítico concernente à concepção do tamanho, a distribuição, a geometria espacial dos poros e suas interligações, de modo que mantenham de maneira adequada as propriedades mecânicas e garanta melhor eficácia da utilização dos arcabouços. Neste sentido, a avaliação dessas propriedades estruturais tem sido tarefa desafiadora. Se por um lado parece óbvio que o arcabouço deva ter poros e canais intercomunicantes para permitir que as células cresçam dentro da sua estrutura, e fornecimento adequado de nutrientes; por

outro lado não é tão óbvio determinar, com exatidão, os parâmetros, *a priori*, das dimensões, da forma, e das interligações (Figura 7). (BRUN et al., 2011)

Figura 7 – Representação da interação entre a célula (espraiada e achatada) com a estrutura do arcabouço microporoso.



Fonte: Adaptado de Pina, Oliveira e Reis (2015).

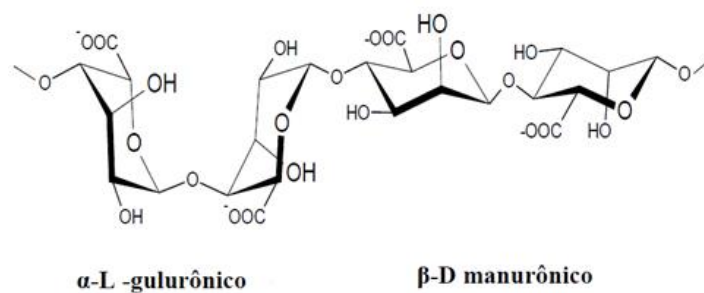
Outra alternativa que os pesquisadores têm buscado otimizar as propriedades físico-químicas da HA é mediante a utilização de polímeros sintéticos, como os poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) e ácido poliláctico (PLA), (BERTINETTI et al., 2006; WAHL; CZERNUSZKA, 2006) ou biopolímeros naturais, a partir de proteínas tais como colágeno, elastina, seda; e polissacarídeos tais como quitosana, ácido hialurônico e alginato. Este último atraiu grande atenção dos pesquisadores, nos últimos anos, devido, principalmente, à sua não toxicidade, biocompatibilidade, hidrofiliabilidade, e custo relativamente baixo para produção em larga escala. (TENG et al., 2006; CHAE et al., 2013)

Durante a síntese desses compósitos, pôde-se notar que a utilização do alginato de sódio modifica a estrutura e a morfologia do cristal de HA, (TENG et al., 2006) altera a cristalinidade, a solubilidade, os parâmetros de rede, estabilidade térmica e reatividade superficial, (LeGEROS, 2002; DOURADO, 2006) a bioatividade, a biocompatibilidade (GOUVEIA, 2008) e as propriedades de adsorção da estrutura da HA. (MAVROPOULOS et al., 2004) Consequentemente, os arcabouços compósitos à base de HA e alginato podem apresentar estrutura com poros altamente interligados que assegura um ambiente biológico favorável para a adesão e proliferação celular, bem como o crescimento tecidual, além de proporcionar a passagem e fluxo de nutrientes. (VENKATESAN et al., 2015) Por isto, esses biomateriais tornam-se promissores para a regeneração óssea.

2.1.4 O alginato

O alginato, biopolímero marinho mais abundante e, ao lado de celulose, o mais disponível no mundo, é um polissacarídeo, não ramificado, constituído por cadeias de repetição das unidades 1→4 ácido β-D-manurônico e o seu epímero C-5 do ácido α-L-gulurônico, ligadas em variadas proporções e arranjos sequenciais (Figura 8). (CORTES, 2010; PAWAR; EDGAR, 2012; VENKATESAN et al., 2015)

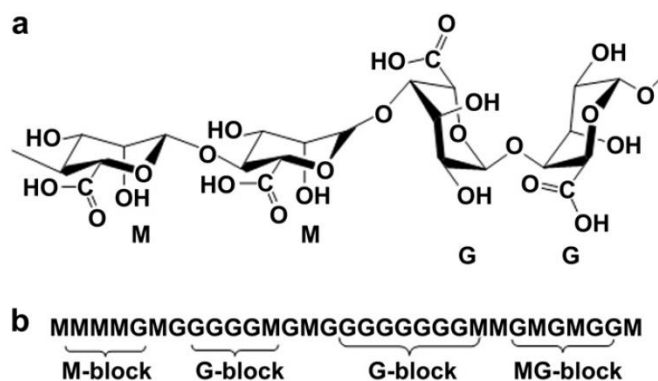
Figura 8 – Estrutura representativa do alginato.



Ácido α-L-gulurônico (G) e Ácido β-D-manurônico (M). **Fonte:** Adaptado de Cortes (2010).

Esse copolímero, de origem natural, é componente importante das algas pardas (*Laminaria sp.*, *Macrocystis sp.*, *Lessonia sp.*, dentre outras) e, também, exopolissacarídeo produzido por bactérias, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*. Seu arranjo estrutural é composto de sequências de M (blocos M) e resíduos G (blocos G) intercalados com sequências MG (blocos MG) (Figura 9). (CORTES, 2010; PAWAR; EDGAR, 2012; VENKATESAN et al., 2015)

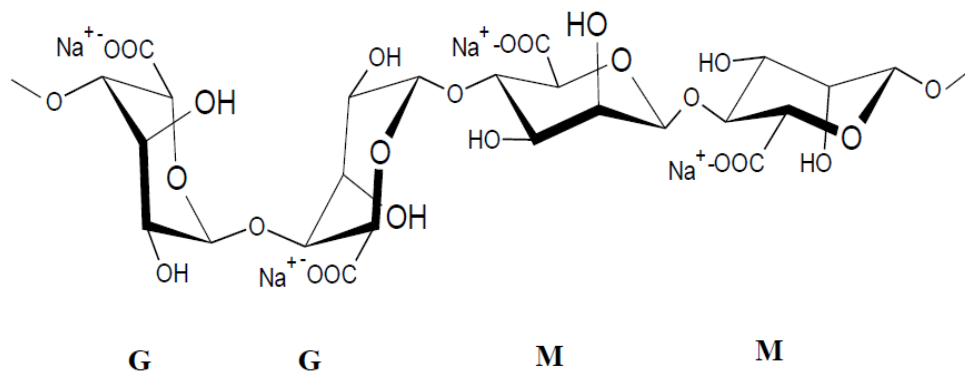
Figura 9 – Estrutura representativa da sequência estrutural do alginato.



(a) Conformação da cadeia e (b) a distribuição típica dos blocos. **Fonte:** Adaptado de Pawar e Edgar (2012).

Embora seja possível obter o alginato de ambas as fontes, algas e bactérias, o mais disponível e utilizado comercialmente é o sal de sódio, comumente chamado de alginato de sódio, extraído de algas (Figura 10). Sua composição química, sequências e pesos moleculares podem variar de acordo às espécies que produzem o copolímero. (CORTES, 2010; PAWAR; EDGAR, 2012; VENKATESAN et al., 2015)

Figura 10 – Estrutura representativa do alginato de sódio.



M (blocos M) e resíduos G (blocos G). **Fonte:** Adaptado de Cortes (2010).

A combinação de diferentes técnicas químicas e bioquímicas fornece possibilidades consideravelmente potenciais para a criação de derivados do alginato, por meio do controle das sequências de monossacarídeos, a localização e quantidade das moléculas substituintes. Isto, por sua vez, permite a manipulação das propriedades físico-químicas dos derivados do alginato, tais como solubilidade, hidrofobicidade, afinidade às proteínas específicas, dentre outros. Estas modificações tornam-se complexas devido às outras propriedades do alginato, incluindo, principalmente, a sensibilidade ao potencial hidrogeniônico (pH). Esta dificuldade de controlar as modificações do alginato tem atraído grande interesse dos pesquisadores na busca de compreender os mecanismos envolvidos. (PAWAR; EDGAR, 2012; VENKATESAN et al., 2015)

O alginato é utilizado, frequentemente, para compor materiais de revestimento para o tratamento de feridas agudas e/ou crônicas. Esses dispositivos têm desempenhado papel crucial na progressão da fibrose cística, por exemplo, em que o biofilme bacteriano, formado a partir dos géis de alginato, é secretado por *P. aeruginosa*. A utilização vantajosa do alginato na biomedicina se dá, principalmente,

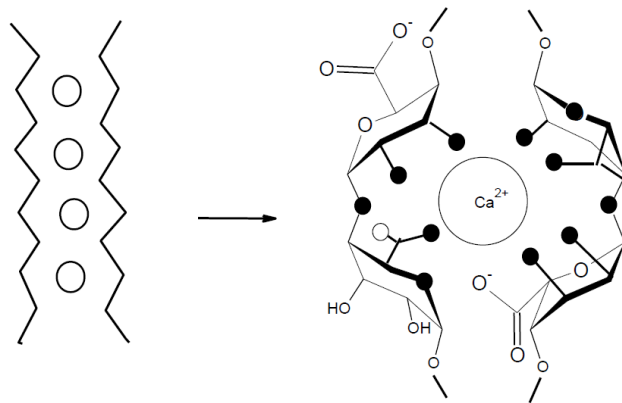
devido à sua capacidade de realizar ligações cruzadas e formar hidrogéis, que podem servir para encapsulação de células, a mencionar, por exemplo, as ilhotas de Langerhans, no tratamento da diabetes. (PAWAR; EDGAR, 2012; VENKATESAN et al., 2015)

As modificações químicas do alginato são utilizadas, também, como ferramenta para duas principais finalidades: I) melhorar as propriedades físico-químicas existentes, tais como aumentar da resistência iônica de géis por meio da reticulação covalente, aumentar a hidrofobicidade da espinha dorsal da cadeia, melhorar a biodegradação e/ou realizar maior nucleação e crescimento da HA; ou II) introduzir propriedades inteiramente novas, em alginato não modificado, tais como propriedades anticoagulantes, e fornecer ancoragem química e bioquímica para interagir com superfícies celulares. (PAWAR; EDGAR, 2012; VENKATESAN et al., 2015) Todavia, a degradação do alginato não está totalmente elucidada, e continua a ser questão crítica para garantir desempenho biológico previsível deste material *in vivo*. (CARDOSO et al., 2014)

A solubilidade do alginato, em água, é regulada por três parâmetros: I) pH do solvente; II) força iônica do meio e; III) presença de íons de gelificação no solvente. Além disso, a solubilidade depende fortemente do estado dos grupos de ácido carboxílico de sua estrutura. Para que o alginato se torne solúvel, é essencial que o pH esteja acima de certo valor crítico e os grupos de ácido carboxílico ser desprotonados. A alteração da força iônica do meio afeta diretamente as propriedades da solução, tais como conformação, extensão da cadeia, viscosidade e, por conseguinte, solubilidade. (CORTES, 2010; PAWAR; EDGAR, 2012; VENKATESAN et al., 2015) Ácidos carboxílicos na sua forma protonada não são totalmente solúveis em qualquer sistema solvente, incluindo a água. (PAWAR; EDGAR, 2012) Há presença de cátions divalentes, tais como Ca^{2+} , íon de Sr (Sr^{2+}) e íons de bário (Ba^{2+}) nos géis de alginato. Por isso, é necessário ter um solvente aquoso livre de íons de reticulação, que permitam dissolução. Assim, a solubilidade do alginato, em meios orgânicos, requer a formação de sal tetrabutylamônio (TBA). (PAWAR; EDGAR, 2012) Vale ressaltar que alginato de sódio, dissolvido em água, não é completamente solúvel em qualquer meio orgânico. Já o sal TBA de alginato é completamente solúvel em água, etileno glicol e solventes apróticos polares, contendo fluoreto de tetrabutylamônio (TBAF), mas não em qualquer outro sistema solvente. (PAWAR; EDGAR, 2012)

Ao ser associado aos cátions monovalentes, o alginato tem a propriedade de formar gel solúvel, e na presença de cátions polivalentes como cálcio, cromo, bário, alumínio, magnésio e estrôncio, este gel é insolúvel. (RODRIGUES, 2008; CORTES, 2010) Dentre estes compostos inorgânicos, o mais comumente utilizado é o Ca. Tais íons localizam-se nas cavidades eletronegativas e fazem interações iônicas fortes com quatro blocos G, formando uma rede tridimensional com um arranjo químico do tipo *egg-box* (Figura 11). (TENGG et al., 2006; CORTES, 2010)

Figura 11 – Representação da interação dos blocos G na presença de íons Ca II, de acordo com o modelo *egg-box*.



Os círculos pretos representam os átomos de oxigênio envolvidos na coordenação do cátion.

Fonte: Adaptado de Cortes (2010).

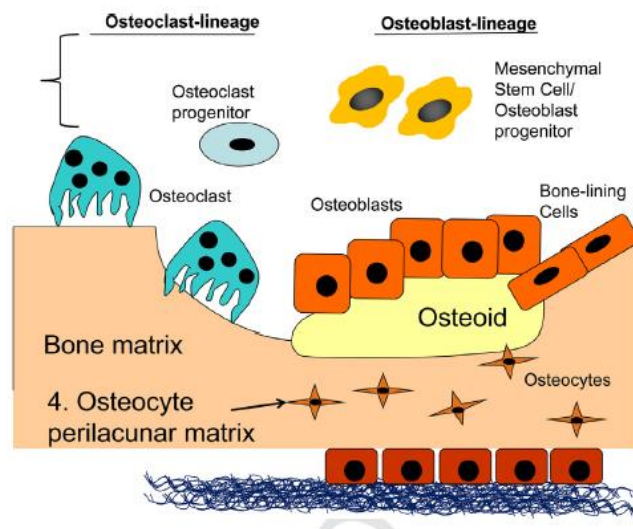
Tendo em vista as propriedades anteriormente descritas, o alginato tem sido um substrato importante para composição de biomateriais nanoestruturados compósitos. Sabe-se que um dos requisitos essenciais desses biomateriais é a capacidade de fornecer um ambiente que é física e quimicamente favorável à presença de espécies biológicas, como células vivas. Sendo assim, a fim de reforçar as interações químicas das matrizes à base de alginato com as células, faz-se associação de ligantes celulares específicos ou moléculas de sinalização extracelulares. Visando melhorar, ainda mais, as interações celulares pode-se, também, influenciar no controle do crescimento, diferenciação e comportamento de células em meio de cultura. Desta maneira, o alginato oferece vantagens, incluindo hidrofiliabilidade, biocompatibilidade e baixa imunogenicidade. Simultaneamente, sua capacidade de formar géis, elásticos, fibras, espumas, e nanopartículas, capazes de

encapsular células, drogas e outras entidades biológicas, tem sido importantes potencialidades para aplicações em biomedicina. (PAWAR; EDGAR, 2012; VENKATESAN et al., 2015)

2.2 FISIOLOGIA DO REPARO ÓSSEO

O osso é um tipo de TC especializado, metabolicamente ativo, que possui estrutura complexa e altamente organizada, rica em MEC mineralizada e diferentes tipos celulares – células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e as células de revestimento ósseo, conhecidas como *bone lining cells* – responsáveis pela síntese, manutenção e reabsorção da MEC óssea. Esta é composta pelas fases orgânica e inorgânica, que interagem e proporcionam resistência e resiliência ao TO (Figura 12). (ANDRADE et al., 2007; ALFORD; KOZLOFF; HANKENSON, 2015)

Figura 12 – Distribuição das células no TO.



Fonte: Adaptado de Alford, Kozloff e Hankenson (2015).

As células osteoprogenitoras são fusiformes, de origem mesenquimal, presentes em todas as superfícies não reabsorvidas, no endóstio e na camada interna do perióstio, revestindo os canais de Havers. (ANDRADE et al., 2007; ALFORD; KOZLOFF; HANKENSON, 2015) Estes canais se comunicam com a cavidade medular e a superfície externa do osso por meio de canais transversais ou oblíquos denominados canais de Volkmann. Essas células caracterizam-se por exibir

muitos ribossomos livres, pouca quantidade de retículo endoplasmático rugoso (RER), e pequenos complexos de Golgi. Têm como principal potencialidade a diferenciação em osteoblastos. (ANDRADE et al., 2007; ALFORD; KOZLOFF; HANKENSON, 2015) Tal mecanismo é induzido pela liberação das BMPs e fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento de insulina (IGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF). Haja vista que a osteogênese tem relação direta com crescimento vascular, as células perivasculares, em forma de estrela, conhecidas como pericitos, são consideradas as principais células osteoprogenitoras. (ANDRADE et al., 2007; ALFORD; KOZLOFF; HANKENSON, 2015)

Os osteoblastos são células caracterizadas por conter grande quantidade de RER e grandes unidades de complexos de Golgi. (ANDRADE et al., 2007; ALFORD; KOZLOFF; HANKENSON, 2015) Localizam-se nas superfícies ósseas, justapostas, formando arranjo semelhante ao epitélio simples, e são responsáveis pela síntese da parte orgânica da matriz, denominada oteoide, que tem como principais componentes o colágeno do tipo I, (ANDRADE et al., 2007; ALFORD; KOZLOFF; HANKENSON, 2015) principal proteína estrutural; e proteínas não-colagênicas como osteopontina, sialoproteína, osteonectina, osteocalcina. (HING, 2004; ANDRADE et al., 2007; ALFORD; KOZLOFF; HANKENSON, 2015) Esta última facilita a deposição dos Ca^{2+} na MEC, enquanto osteonectina estimula a atividade dos osteoblastos. (ANDRADE et al., 2007; ALFORD; KOZLOFF; HANKENSON, 2015) Enquanto a sialoproteína não tem função específica completamente elucidada, (MALAVAL et al., 2008; ALFORD; KOZLOFF; HANKENSON, 2015) a osteopontina encontra-se nos depósitos e na superfície óssea, por isto, sua principal função na mineralização está direcionada à adesão dos osteoblastos e osteoclastos na MEC óssea. Essas proteínas formam a matriz 3D do TO, onde há constante interação célula-célula, célula-matriz, (ALFORD; KOZLOFF; HANKENSON, 2015) células-fatores de crescimento e deposição de sais minerais. Os osteoblastos também participam da mineralização, durante o mecanismo de concentração dos CaP. Estas células possuem receptores do hormônio da paratireoide (PTH), 1,25-diidroxivitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$) e estrogênio, glicocorticóides, insulina, mas não para a calcitonina. Deste modo, o estímulo do PTH, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, hormônio de crescimento e estrogênio induzem os osteoblastos a produzirem o fator de crescimento “insulin like” I (IGF-1), que tem papel importante na regulação e modelagem óssea local. Quando estão em

intensa atividade sintética, são cuboídes e apresentam citoplasma basófilo. Por outro lado, quando quiescentes, tornam-se achatadas e menos basófilas. Uma vez aprisionados na matriz recém-sintetizada, os osteoblastos se tornam osteócitos. (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006; ALFORD; KOZLOFF; HANKENSON, 2015)

As células de revestimento ósseo, *bone lining cells*, são de formato alongado que recobrem a superfície do TO e não apresentam atividade de síntese. Essas células são aqueles osteoblastos que cessaram sua atividade e entraram em estado de quiescência. (ANDRADE et al., 2007; ALFORD; KOZLOFF; HANKENSON, 2015)

Os osteócitos, células mais abundantes do TO, possuem formato achatado, exibem pequena quantidade de RER, complexo de Golgi pouco desenvolvido e núcleo com cromatina condensada. Estas células são encontradas no interior da matriz óssea, em lacunas das quais partem canalículos. Dentro destes canalículos, os prolongamentos dos osteócitos se interconectam, organizados como sincício, por meio de junções comunicantes, onde podem ser transportadas pequenas moléculas e íons. (ANDRADE et al., 2007; ALFORD; KOZLOFF; HANKENSON, 2015) Embora suas características ultraestruturais indiquem pequena atividade sintética, os osteócitos são essenciais na manutenção e nutrição da MEC. Sua morte é procedida por reabsorção da matriz.

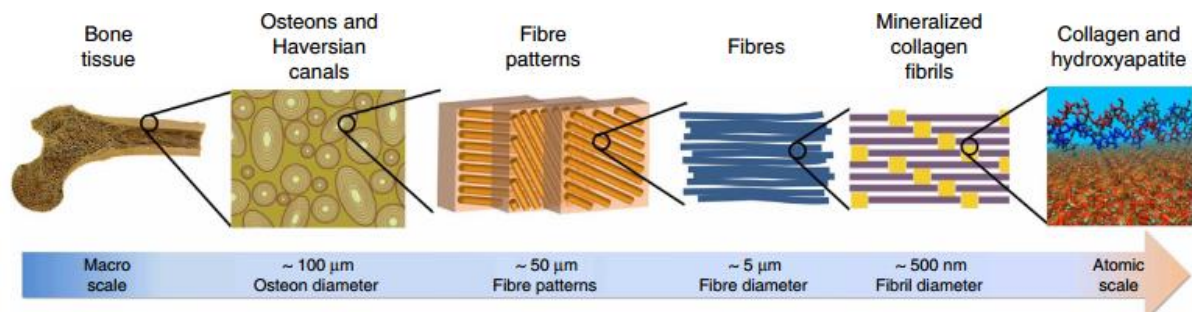
Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas, móveis, de linhagem monocítica, que possuem grande quantidade de prolongamentos, e dispõem-se nas superfícies ósseas. Seus prolongamentos são irregulares, de forma e espessura variáveis. Durante a reabsorção óssea, as porções dilatadas dos osteoclastos encontram-se alocadas em depressões da matriz mineralizada, escavadas pela atividade de degradação ácida, denominadas lacunas de Howship, onde, sob o controle do PTH, são estimulados a secretar enzimas proteolíticas e ácidos orgânicos (lactato e cítrico) que digerem e solubilizam a matriz óssea. (MOTTA, 2003; ALFORD; KOZLOFF; HANKENSON, 2015) Estas células exibem citoplasma granuloso, contendo, algumas vezes, vacúolos (menos basófilos em células jovens e acidófilo nas maduras). (NAIR et al., 2013; ALFORD; KOZLOFF; HANKENSON, 2015)

Já a fase inorgânica do TO, que representa aproximadamente 50% do seu peso total, possui como íons mais abundantes o Ca e P. Devido à grande superfície de troca iônica da microestrutura cristalina da matriz mineral, há alguns outros elementos traços essenciais à fisiologia óssea, tais como bicarbonato, citrato,

carbonato, lactato, fluoreto, (BANDYOPADHYAY et al., 2006; ALFORD; KOZLOFF; HANKENSON, 2015) dentre outros, dispostos em diferentes proporções. Dependendo da ingestão de flúor, quantidades variáveis de fluorapatita também podem estar presentes. (LACERDA, 2005) O Ca e o P são depositados como sais amorfos e, posteriormente, organizam-se na forma de cristais de HA, de composição química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$. Os íons da superfície desses cristais são hidratados e, desta forma, existe uma camada de água e íons em volta de cada cristal. Essa camada é denominada capa de hidratação, a qual promove a troca de íons entre os cristais e o líquido intersticial. (NAIR et al., 2013; ALFORD; KOZLOFF; HANKENSON, 2015)

É importante ressaltar que a associação da HA às fibras de colágeno confere rigidez e resistência ao TO. Assim sendo, após a remoção do Ca, os ossos mantêm sua forma, porém tão flexíveis quanto os tendões (Figura 13). (NAIR et al., 2013; ALFORD; KOZLOFF; HANKENSON, 2015)

Figura 13 – Representação da associação entre os cristais de HA e as fibras de colágeno no TO.

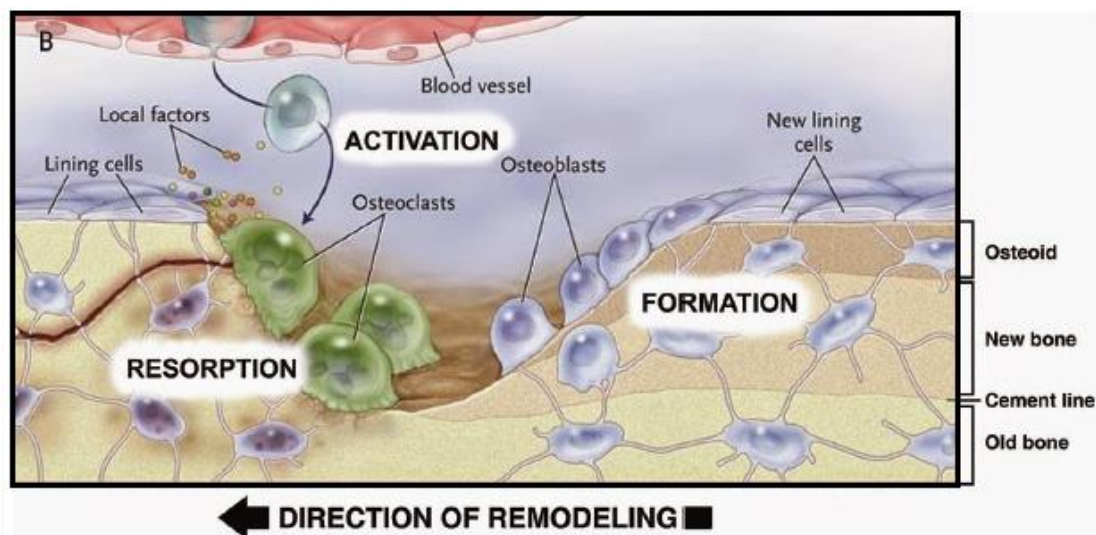


Fonte: Adaptado de Nair e colaboradores (2013).

O perióstio e endóstio, superfícies externa e interna dos ossos, respectivamente, são recobertas por células osteogênicas e TC. A camada mais superficial do perióstio é composta, principalmente, de fibras de colágeno e fibroblastos. Essas fibras penetram no TO em forma de feixes, conhecidos como fibras de Sharpey, que prendem firmemente o perióstio ao TO. Já o endóstio é constituído de células osteogênicas que revestem, principalmente, as cavidades do osso esponjoso, canal medular, canais de Volkmann e Havers. Esses revestimentos são essenciais para a manutenção do TO. (NAIR et al., 2013; ALFORD; KOZLOFF; HANKENSON, 2015)

A morfogênese e remodelação óssea compreendem síntese, pelos osteoblastos, e reabsorção, coordenada pelos osteoclastos. Esse mecanismo inicia-se com atividade dos osteoclastos, adjacentes aos vasos sanguíneos, presentes nos canais de Havers. Durante esse evento, o caminho percorrido pelos osteoclastos, nas superfícies do osso, forma um cone de corte, que é ocupado por tecido vascular e células osteogênicas. Em seguida, os osteoclastos liberam fatores osteoindutivos aos pré-osteoblastos e ativam sua diferenciação, para estimular, por sua vez, a neoformação óssea (Figura 14). (ANDRADE et al., 2007; ALFORD; KOZLOFF; HANKENSON, 2015)

Figura 14 – Representação do mecanismo de remodelação óssea.



Fonte: Adaptado de Warden, Davis e Fredericson (2014).

O TO possui excelente capacidade regenerativa, em virtude de dispor de mecanismos reparadores semelhantes ao da osteogênese embriológica. (SEAL; OTERO; PANITCH, 2001; NAIR et al., 2013; ALFORD; KOZLOFF; HANKENSON, 2015) Deste modo, lesões ósseas de pequenas dimensões regeneram-se espontaneamente com facilidade. (SEAL; OTERO; PANITCH, 2001; ALFORD; KOZLOFF; HANKENSON, 2015) Contudo, em algumas situações que existam distúrbios metabólicos, por exemplo, osteoporose; comprometimento vascular; e/ou perda tecidual extensa, resultante de traumas ou ressecções cirúrgicas, a capacidade regenerativa deste tecido torna-se limitada (SEAL, OTERO, PANITCH, 2001; LOGEART-AVRAMOGLU et al., 2005) e o reparo é finalizado com formação de tecido conjuntivo fibroso (TCF), (CARDOSO et al., 2006; MIGUEL et al., 2006;

MIGUEL, 2008; ROLIM, 2010; BARRETO, 2011; MIGUEL et al., 2013) em razão da ausência de arcabouço 3D, essencial para os eventos celulares, o que pode comprometer a função e a estética da região acometida. Entretanto, se o defeito for superior a um tamanho crítico, o mecanismo de regeneração deixa de preencher a lacuna óssea, com novo tecido ósseo, de forma completa. (ELDESOQI et al., 2014)

Sabendo-se disso, a utilização de roedores como modelo experimental apresenta vantagens, em relação aos animais de grande porte, tais como uma melhor relação custo-benefício, a reabilitação e manipulação mais fáceis; e permite a normalização das condições experimentais em indivíduos geneticamente semelhantes. (ELDESOQI et al., 2014) Deste modo, defeitos ósseos de dimensão crítica, cuja regeneração é limitada às bordas ósseas e o reparo é finalizado com a formação de tecido conjuntivo em toda a sua extensão, confeccionados na calvária de rato, vêm sendo frequentemente utilizados em estudos com modelos experimentais, (MARQUES et al., 2015) haja vista que podem fornecer informações que permitem elucidar questões importantes sobre a biocompatibilidade e as funções biológicas de biomateriais projetados para regeneração óssea posteriormente à sua aplicação clínica. (SHAH et al., 2014)

Diante do exposto, os pesquisadores da BTO têm utilizado fundamentos teóricos, multi e interdisciplinares, com o objetivo de elucidar respostas celulares específicas que estimulem a regeneração do TO influenciadas pela utilização de biomateriais fosfatados em diferentes formatos, tais como microesferas e grânulos.

2.3 PRINCIPAIS PROPRIEDADES DAS MICROESFERAS E DOS GRÂNULOS

Os biomateriais compósitos sintetizados no formato de microesferas, projetados para a BTO, apresentam, como principal propriedade, o arcabouço 3D, formado por poros interligados que, após implantação, favorecem a formação de um interstício que possibilita a difusão de micronutrientes e fatores de crescimento, migração, proliferação e diferenciação celular, especialmente mesenquimais e osteoprogenitoras, síntese de nova MEC, e neovascularização, eventos fundamentais para a neoformação tecidual. Além dessas propriedades químicas, o formato de microesferas permite aplicação versátil, em vistas que podem ser implantadas por meio de técnicas cirúrgicas minimamente invasivas, como veículos de liberação controlada de drogas, por exemplo, devido à alta microporosidade

interligada que compõe sua estrutura. (PICCININI, 2012; RIBEIRO, 2013)

Já os biomateriais no formato de grânulos incluem partículas irregulares e multifacetadas redondas e/ou lisas, com estruturas sólidas e/ou porosas. O comportamento dessas partículas no organismo depende da sua morfologia e microestrutura. (PICCININI, 2012) Esses arcabouços exibem organização microestrutural de partículas que se distribuem de maneira diferente no local de implante, em relação às microesferas, uma vez que elas irão se agrupar em um arranjo espacial semelhante a um mosaico e diminuir, quase completamente, interstício entre as partículas. (PICCININI, 2012; RIBEIRO, 2013) Este fator ganha grande destaque, haja vista que a redução quase completa do interstício, em resposta ao biomaterial, interfere na migração celular durante o reparo ósseo. Entretanto, o arranjo dos grânulos possibilita área de superfície do interstício consideravelmente maior, o que garante maior superfície para atividades celulares. Esses biomateriais podem ser utilizados para preencher defeitos e lesões de formas irregulares, por meio de sistemas injetáveis, em procedimentos cirúrgicos minimamente invasivos, por exemplo. (PICCININI, 2012; RIBEIRO, 2013)

Os grânulos utilizados em aplicações farmacêuticas apresentam tamanhos que variam entre 0,2 – 4,0 mm, nas cirurgias ortopédicas entre 1,0 – 2,0 mm, enquanto na cirurgia periodontal entre 0,25 – 1,0 mm. Já as partículas com diâmetro menor podem ser totalmente reabsorvidas. Sendo assim, os grânulos sob 50 µm, nanoestruturados, após implantação podem ser fagocitados por macrófagos e, em seguida, estimular a reabsorção óssea local. (PICCININI, 2012)

Vale ressaltar que, a microporosidade interligada dos grânulos, assim como das microesferas, também favorecem a osteoindução, vascularização e proliferação celular com conseqüente neofomação óssea no interior do arcabouço, que pode contribuir significativamente para a regeneração óssea. (CAMARGO; LIMA; GEMELLI, 2012)

Objetivo

3 OBJETIVO

Avaliar a influência do formato e da composição de novos biomateriais compósitos de HA nanoestruturada associada ao alginato, para o reparo ósseo. O potencial osteogênico dos biomateriais será analisado através da caracterização histomorfológica do reparo tecidual decorrente da implantação em defeito ósseo crítico.

Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

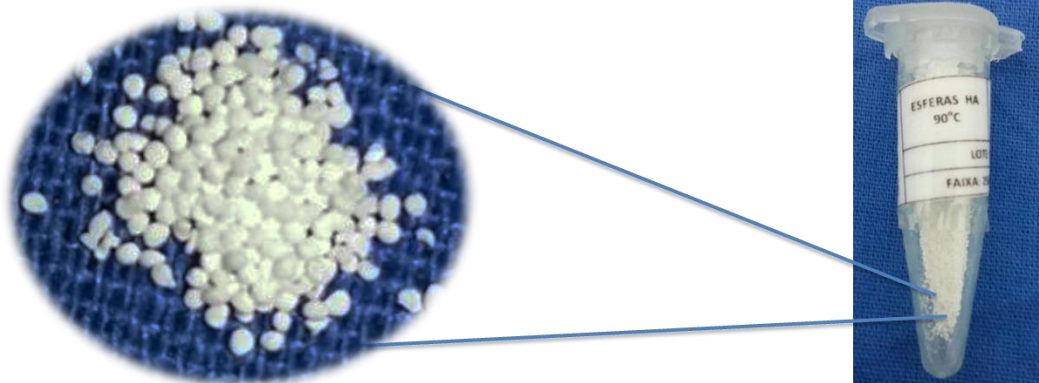
4.1 BIOMATERIAIS

Ambos os biomateriais utilizados neste estudo, microesferas e grânulos, foram produzidos, caracterizados e fornecidos por pesquisadores do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), sob supervisão do pesquisador Alexandre Malta Rossi.

4.1.1 Síntese e caracterização físico-química

A síntese dos biomateriais foi realizada pela mistura da solução de fosfato de amônio dibásico $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$, mantida em pH superior a 12, à solução com nitrato de Ca $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2]$, sob agitação constante. O precipitado resultante foi filtrado, lavado e, posteriormente, adicionado à solução de alginato de sódio a 1,5%, numa proporção de 15:1, misturado em aquecimento à 90°C para incorporação completa da biocerâmica na solução. Para obtenção das microesferas, a pasta formada foi extrudada com o auxílio de seringa em solução de cloreto de cálcio 0,15 M. Na temperatura ambiente, as microesferas passaram por uma seleção de 250 a 425 μm utilizando-se uma peneira apropriada. Em seguida, fracionadas em partes iguais, acondicionadas em tubos *ependorf* e esterilizadas por raios gama. Cada alíquota foi utilizada para preencher o defeito ósseo de, aproximadamente, quatro animais (Figura 15).

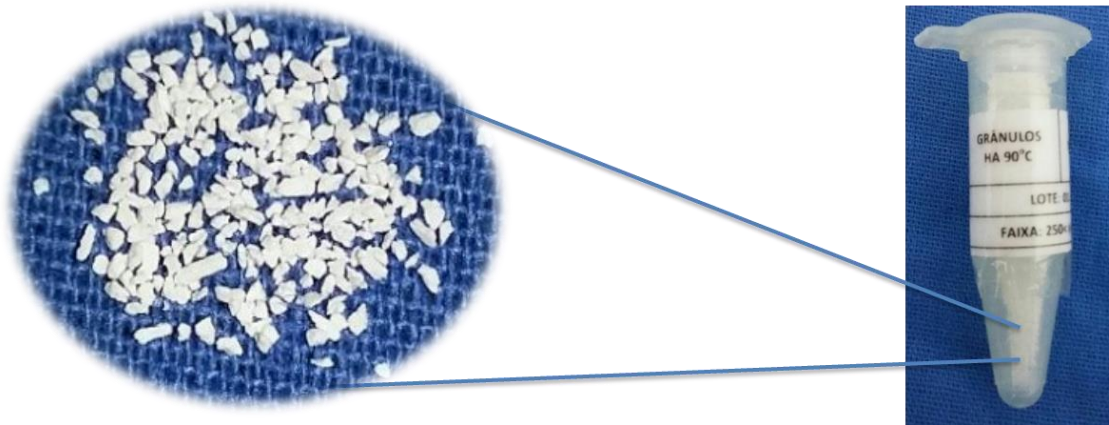
Figura 15 – Microesferas em tubos *ependorf*.



Fonte: Foto do autor.

Para obtenção dos grânulos, o sólido obtido foi secado em estufa à 80°C durante 24h, macerado para formação dos grânulos e peneirado para seleção de grânulos com diâmetro entre 250 e 425 µm. As amostras foram fracionadas em partes iguais, acondicionadas em tubos *ependorf* e esterilizadas por raios gama. Cada alíquota foi utilizada para preencher o defeito ósseo de, aproximadamente, quatro animais (Figura 16).

Figura 16 – Grânulos em tubos *ependorf*.



Fonte: Foto do autor.

Área superficial foi analisada por meio do analisador de área superficial, volume e distribuição de tamanho de poro, modelo ASAP 2020 – MICROMERITICS; e a técnica de análise química triplicada, por meio de espectrômetro de fluorescência de raios-X modelo PHILIPS PW2400 (Tabela 2).

Tabela 2 – Resultados da análise química triplicada das amostras.

Amostra	Ca%	mol do Ca	P%	mol do P	Razão Ca/P
HA	35,70	0,8908	16,40	0,52948	1,6823
HA	36,00	0,8982	16,60	0,53593	1,6760
HA	37,12	0,9262	17,20	0,55530	1,6679
MÉDIA					1,6754

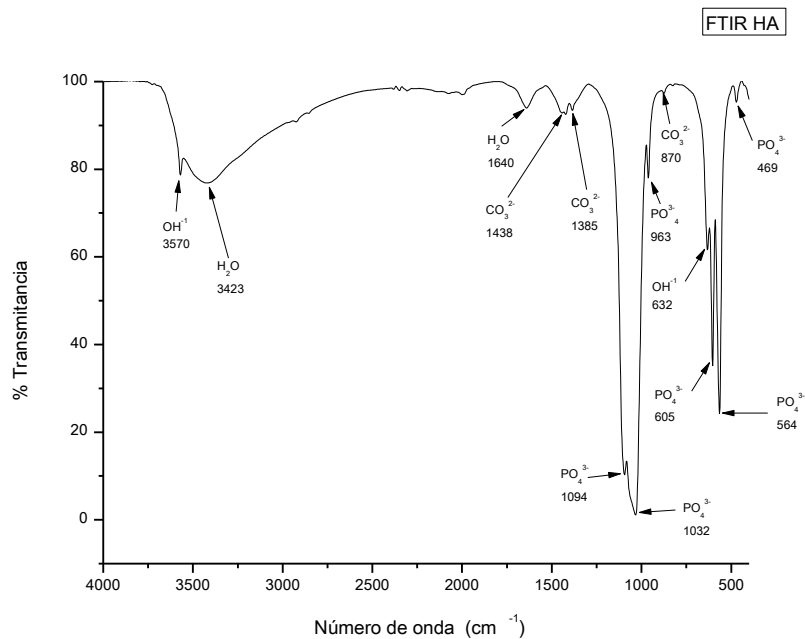
Fonte: CBPF (2015).

A difração de raios-X foi realizada por meio do difratômetro de alta resolução ZEISS HZG4 com radiação de CuK α ($\lambda = 1,5418\text{Å}$) e varredura angular de 10 – 80°(2 θ), com passo de 0,05/s, tempo 160 segundos; ficha padrão de banco de dados PCPDFWIN 09.0432 do International Centre for Diffraction Data (ICDD). A Análise infravermelho foi feita com utilização de espectrofotômetro de infravermelho com

transformada de Fourier da Shimadzu, IR-Prestige 21 com separador de feixes de KBr. A análise foi feita por transmitância com utilização de pastilha de KBr 1% na região mediana do infravermelho ($400 - 4000\text{cm}^{-1}$).

Em relação aos espectros vibracionais de infravermelho da amostra preparada a 90°C , observou-se que as bandas são correspondentes ao de uma hidroxiapatita [Referência da tabela de FTIR: SLOSARCZYK et al., 2005, STOCH et al., 2000, MARQUES, 2003, MARKOVIC et al., 2004] nas regiões de 3430 e 1646cm^{-1} bandas de água intensa e larga. Nas regiões de 1462 a 1414cm^{-1} encontram-se as bandas características dos íons carbonato, mostrando que a substituição ocorreu conforme previsto. As demais bandas observadas em $1038, 961, 602$ e 560cm^{-1} são características dos íons fosfatos. Mesmo a amostra com grande hidratação foi possível identificar as bandas dos íons hidroxila em 3570 e 635cm^{-1} (Figura 17).

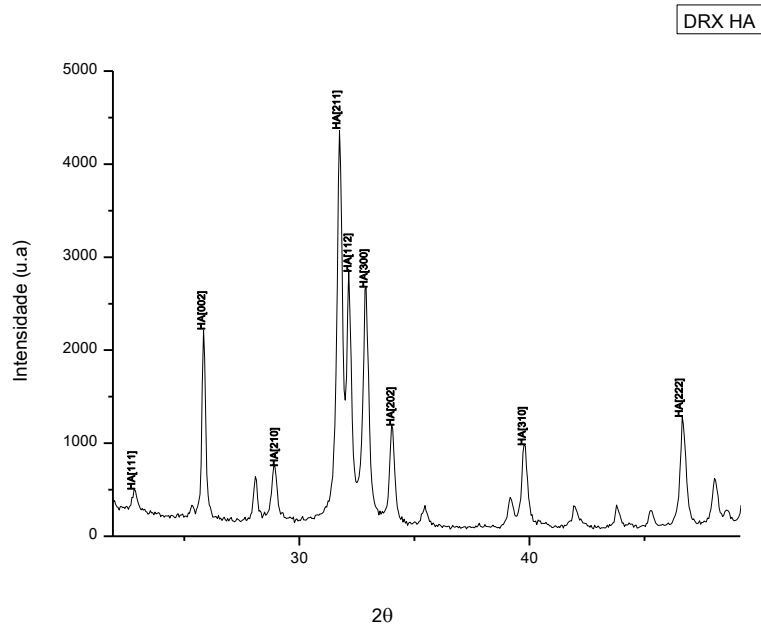
Figura 17 – Espectros vibracionais de infravermelho da amostra preparada a 90°C .



Fonte: CBPF (2015).

O difratograma demonstrou picos correspondentes ao tamanho de uma HA padrão de acordo com a ficha PCPDFWIN 09.0432. Observou-se que a temperatura de síntese promove a formação de uma hidroxiapatita com alta cristalinidade. Esta cristalinidade tem influência direta no grau de dissolução destes materiais (Figura 18).

Figura 18 – Picos correspondentes ao tamanho de HA padrão.



Fonte: CBPF (2015).

4.2 AMOSTRA

Utilizaram-se 15 ratos da linhagem *Wistar* albinos, machos, adultos, com peso corporal entre 350 e 400g, fornecidos pelo Biotério Central da UEFS. Esses animais foram distribuídos, aleatoriamente, para compor três grupos experimentais (Tabela 3):

GHAGr – Defeito ósseo preenchido com grânulos de HA e alginato;

GHAMi – Defeito ósseo preenchido com microesferas de HA e alginato;

DC – Defeito ósseo preenchido com coágulo sanguíneo.

Tabela 3 – Número de animais de acordo com o grupo experimental e ponto biológico.

Grupo Experimental	Ponto Biológico	
	15 dias	Total
GHAGr	5	5
GHAMi	5	5
DC	5	5
		15

Fonte: Elaborado pelo autor

4.3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os grupos experimentais descritos neste estudo estão incluídos no Projeto de Pesquisa, aprovado junto ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), do Instituto de Ciências da Saúde (ICS), da Universidade Federal da Bahia (UFBA), com número de protocolo 038/2012. Deste modo, foram seguidas as Normas Éticas de Pesquisas em Animais (Lei nº. 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); e as normas de Biossegurança do Biotério Central da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

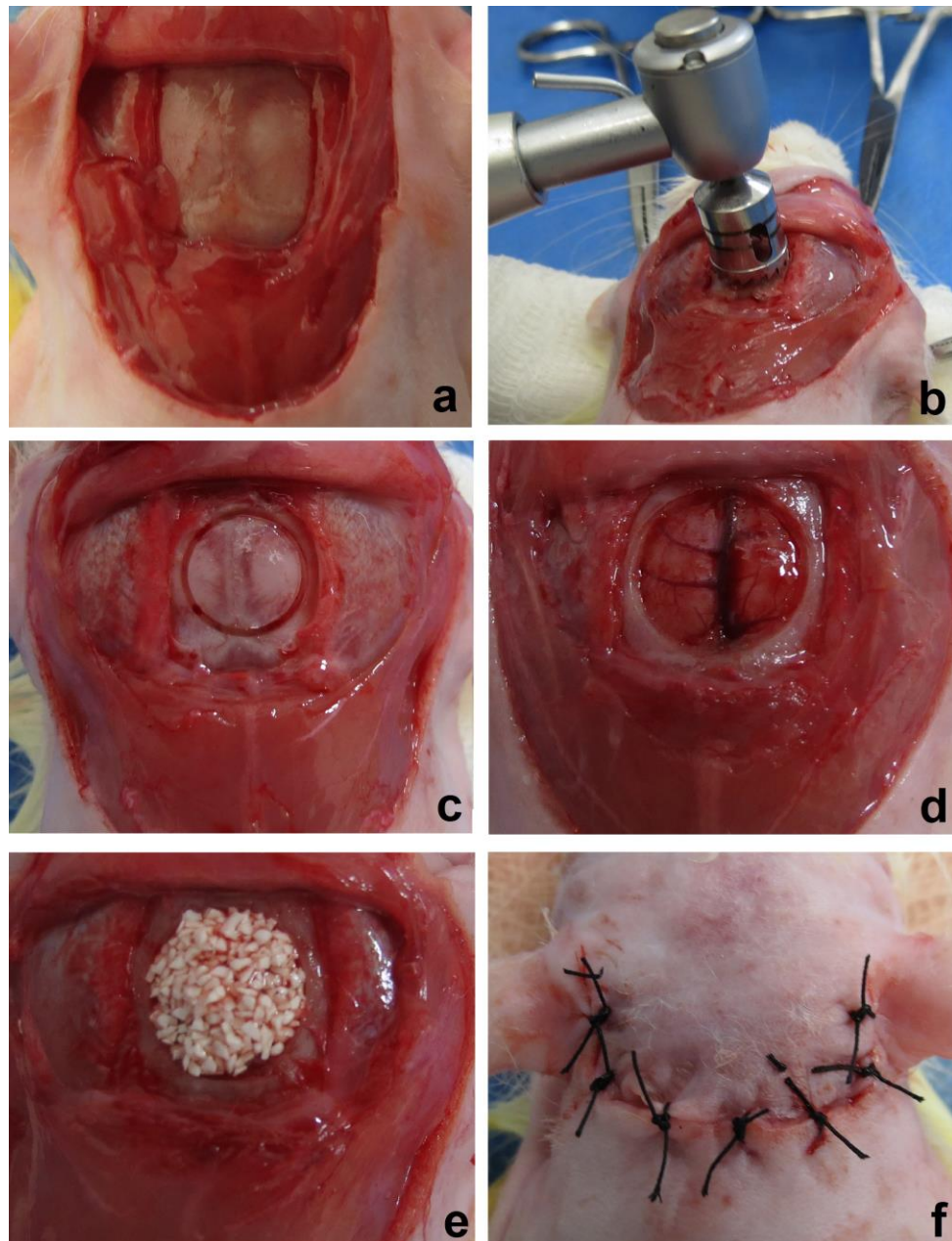
4.4 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Previamente aos procedimentos cirúrgicos, os animais receberam anestesia com injeção intramuscular de cloridrato de quetamina, na proporção de 0,1 mL/100g de massa corpórea; e sedação e analgesia por injeção intramuscular de cloridrato de xilazina a 2%, na proporção de 0,04 mL/100g de massa corpórea. Estas medicações foram administradas em dose única. Após certificação da ausência de reflexos à dor, os animais foram posicionados em decúbito ventral, para realização da tricotomia na calvária e submetidos à antissepsia do campo operatório com álcool iodado.

A técnica cirúrgica de confecção do defeito ósseo crítico na calvária de rato foi a mesma descrita em Cardoso e colaboradores (2006) e Miguel e colaboradores (2006; 2013). Para a confecção do defeito crítico de, aproximadamente, 8,5 mm de diâmetro e, aproximadamente, 0,8 mm de espessura, utilizou-se fresa trefina de 8 mm acoplada ao motor cirúrgico de implante. Por fim, fez-se o preenchimento do defeito ósseo crítico com biomateriais, de acordo com cada grupo experimental, exceto para o controle. Em seguida, o retalho foi reposicionado e suturado com pontos interrompidos, utilizando-se fio de seda (Figura 19).

Durante todo o período experimental, os animais receberam ração e água *ad libitum*, em bebedouro usual para ratos. Estes, mantidos em caixas plásticas individuais, identificadas conforme pesquisador responsável, grupo experimental e ponto biológico.

Figura 19 – Principais etapas do procedimento cirúrgico: **a.** Exposição do TO. **b.** Confecção do defeito ósseo. **c.** Demarcação do defeito ósseo. **d.** Defeito ósseo crítico confeccionado. **e.** Biomaterial implantado. **f.** Sutura do retalho.



Fonte: Foto do autor.

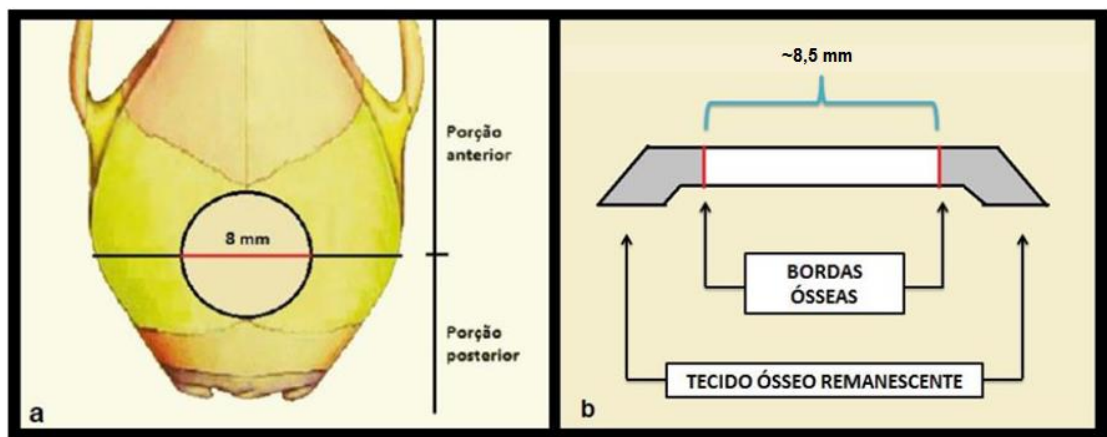
4.5 ETAPA LABORATORIAL

4.5.1 Processamento Histológico

Esta etapa foi realizada no Instituto de Patologia Geral e Cutânea (IPAC) S/C LTDA.

Após eutanásia, a calvária do animal foi removida e fixada em formaldeído tamponado a 4%, por no mínimo 72 horas. Posteriormente a calvária foi reduzida e dividida em porção anterior e posterior. A porção posterior foi descalcificada com ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) durante 7 dias, processadas e incluídas em parafina (Figura 20). Os blocos serão cortados com 4-5 μ m de espessura e corados com Hematoxilina-Eosina (HE), para avaliação histológica, Picrossírius-Red (PIFG), para identificação de proteína colagênica, e Tricrômico de Masson-Goldner (GOLD), para observação de matriz osteoide e células ósseas.

Figura 20 – Representação do defeito crítico em calvária de rato. **a.** Vista superior. **b.** Vista pósterio-anterior.



Fonte: a. Adaptado de Meinel e colaboradores (2005). b. Foto do autor.

4.5.2 Análise Histomorfológica

A análise morfológica foi realizada com auxílio do pesquisador patologista Dr. Aryan de Almeida Barbosa Júnior. A captura de imagens foi feita por meio da utilização de microscópio óptico trinocular LEICA DM1000[®], acoplado a uma câmera digital LEICA DFC310FX[®]; e o sistema de análise de processamento de imagens LEICA QWIN[®].

Resultados

5 RESULTADOS

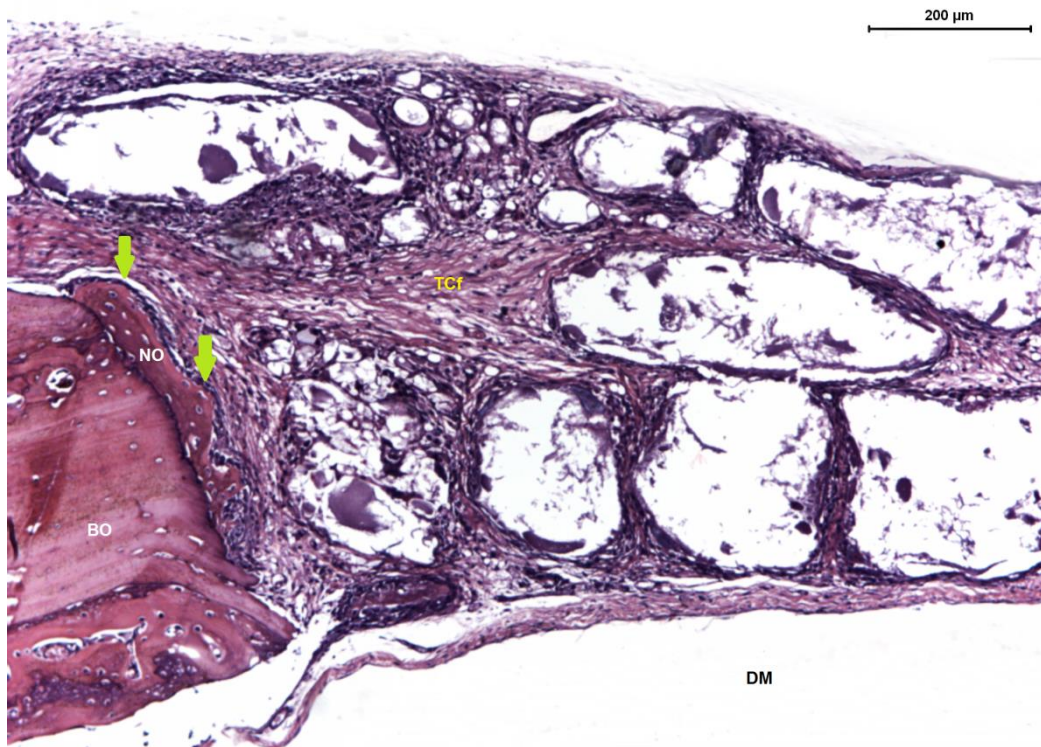
5.1 PONTO BIOLÓGICO DE 15 DIAS

A análise histomorfológica evidenciou neoformação de matriz osteoide reacional, realizada por osteoblastos visivelmente ativos, restrita às bordas do defeito ósseo, com alcance menor que, aproximadamente, cinco centésimos da área total do defeito, no GHAGr, no GHAMi e no DC (Figura 21, 22, 23). Ademais, em todos os grupos, o reparo ósseo de toda a extensão do defeito caracterizou-se por formação de tecido conjuntivo frouxo, edemaciado (Figura 24, 25, 26, 27), com proliferação de capilares sanguíneos mais abundante em GHAMi e GHAGr, em torno dos biomateriais. Quando comparada às bordas ósseas, a espessura tecidual produzida na região do defeito manteve-se proporcional em GHAMi e GHAGr, e reduzida em DC (Figura 28, 29, 30, 31).

No GHAMi, as microesferas dispuseram-se em monocamada, com pequena variação de tamanho, em toda região de preenchimento do defeito ósseo, onde a maioria manteve-se íntegra e algumas apresentaram fragmentação parcial e/ou total. Houve reação inflamatória crônica granulomatosa, caracterizada pela presença de macrófagos, células gigantes multinucleadas e alguns linfócitos, ao redor de todas as microesferas, principalmente naquelas localizados à periferia do defeito ósseo (Figura 32, 33, 34, 35).

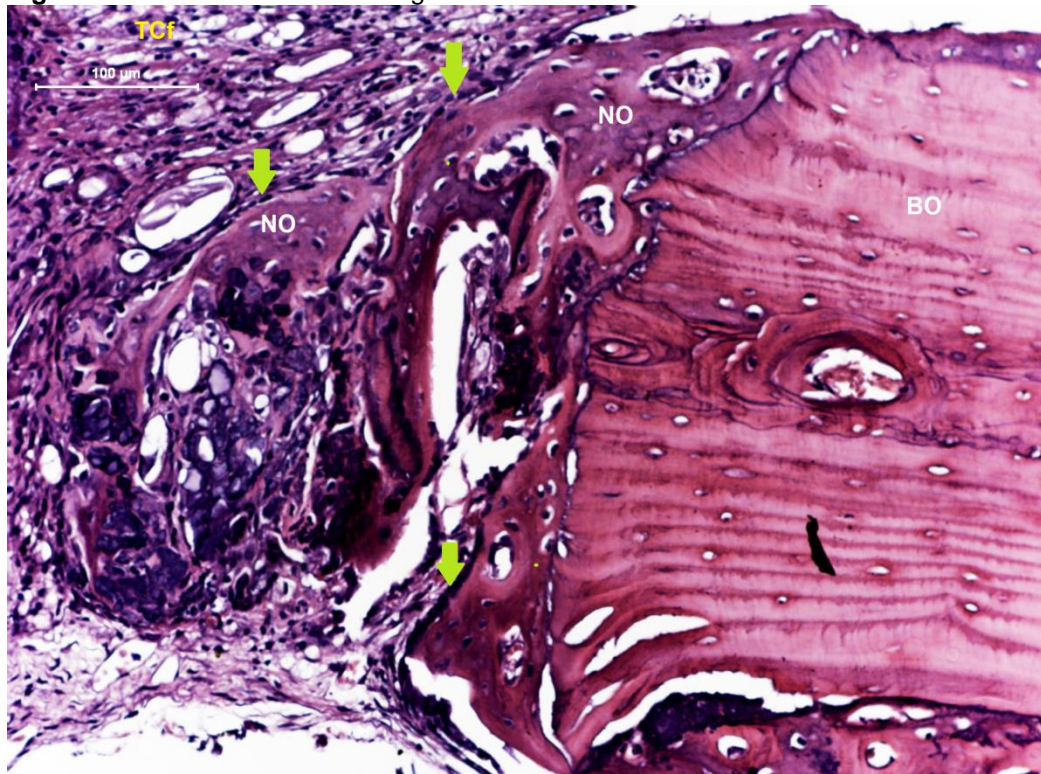
No GHAGr, os grânulos distribuíram-se em mono e multicamadas, cujas partículas apresentavam dimensão menor em relação ao GHAMi. Além disso, a reação inflamatória crônica granulomatosa foi mais intensa, em comparação à observada ao redor das microesferas no GHAMi. A maior parte dos grânulos permaneceu íntegra, enquanto outros apresentaram fragmentação parcial menos acentuada em relação ao GHAMi (Figura 36, 37, 38, 39).

Figura 21 – GHAGr. Análise da região das bordas ósseas.



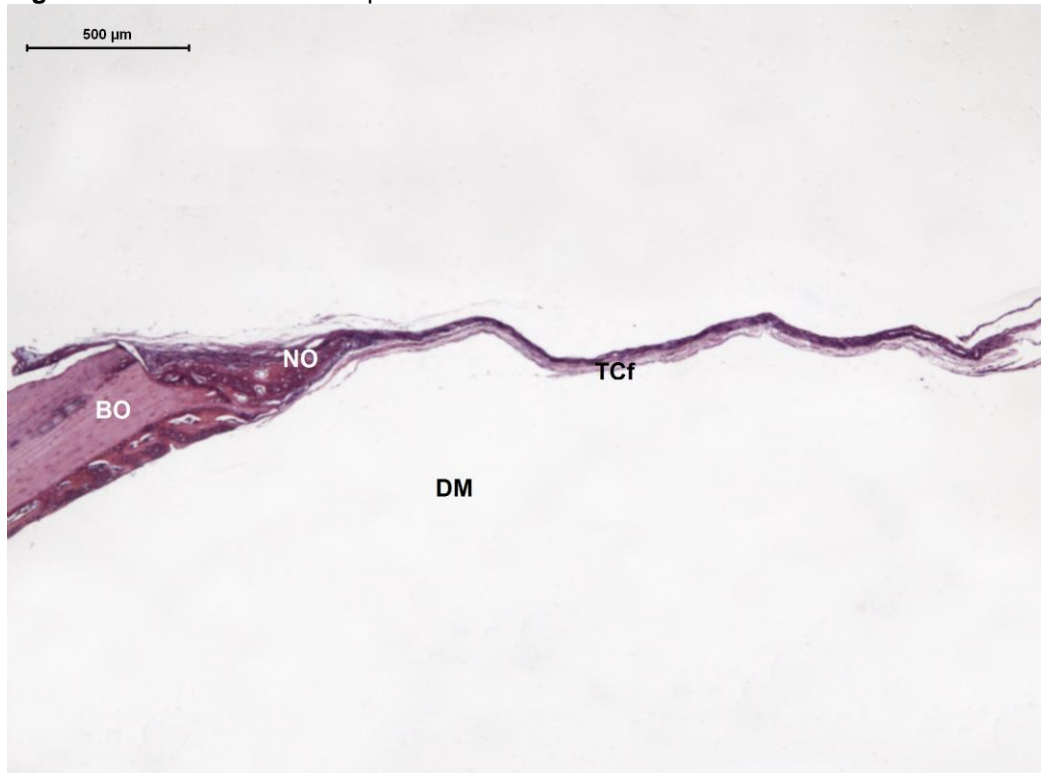
Região da borda óssea (BO) com neoformação óssea (NO). Tecido conjuntivo frouxo (TCf). Osteoblastos ativos (setas verdes). Região da dura-máter (DM). HE. Barra 200 μm. **Fonte:** Foto do autor.

Figura 22 – GHAMi. Análise da região das bordas ósseas.



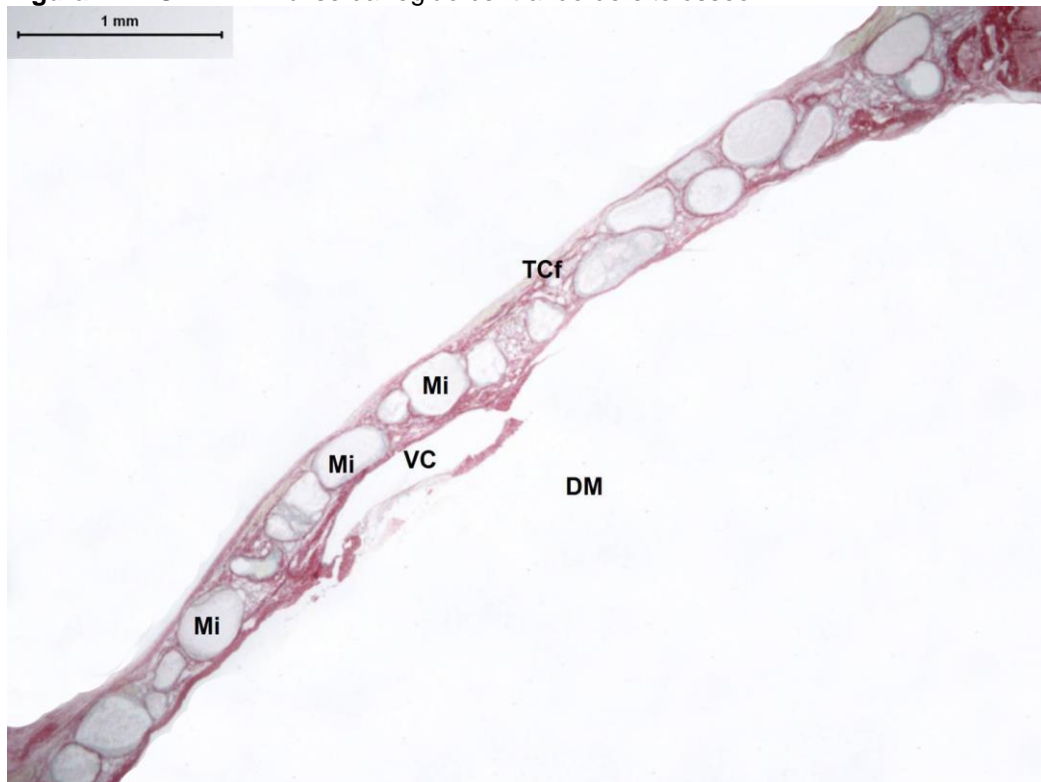
Região da borda óssea (BO). Neoformação óssea (NO). Tecido conjuntivo frouxo (TCf). Osteoblastos ativos (setas verdes). HE. Barra 100 μm. **Fonte:** Foto do autor.

Figura 23 – DC. Análise da espessura do defeito e das bordas.



Região da borda óssea (BO). Neoformação óssea (NO). Tecido conjuntivo frouxo (TCf). Região da dura-máter (DM). HE. Barra 500 μm. **Fonte:** Foto do autor.

Figura 24 – GHAMi. Análise da região central do defeito ósseo.



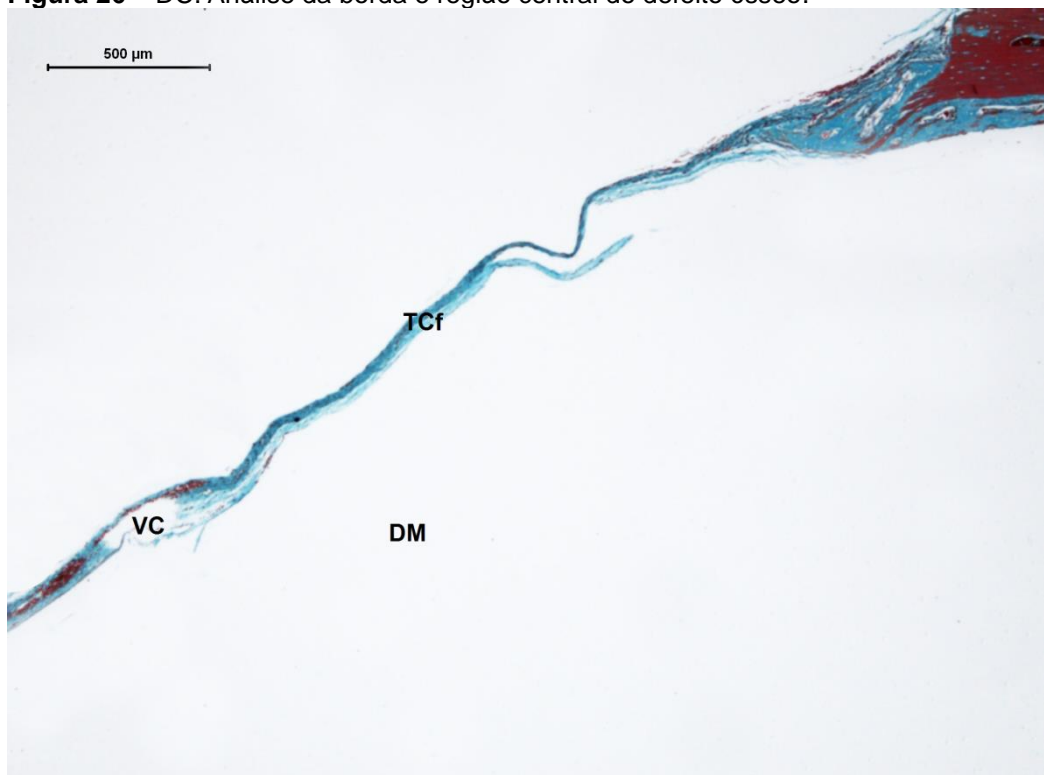
Microesferas (Mi). Tecido conjuntivo frouxo (TCf). Veia Central (VC). Região da dura-máter (DM). PIFG. Barra 1 mm. **Fonte:** Foto do autor.

Figura 25 – GHAGr. Análise da região central do defeito ósseo.



Grânulos (Gr). Tecido conjuntivo frouxo (TCf). Veia Central (VC). Região da dura-máter (DM). HE. Barra 1 mm. **Fonte:** Foto do autor.

Figura 26 – DC. Análise da borda e região central do defeito ósseo.



Tecido conjuntivo frouxo (TCf). Veia Central (VC). Região da dura-máter (DM). GOLD. Barra 500 µm. **Fonte:** Foto do autor.

Figura 27 – DC. Análise da região central do defeito ósseo.



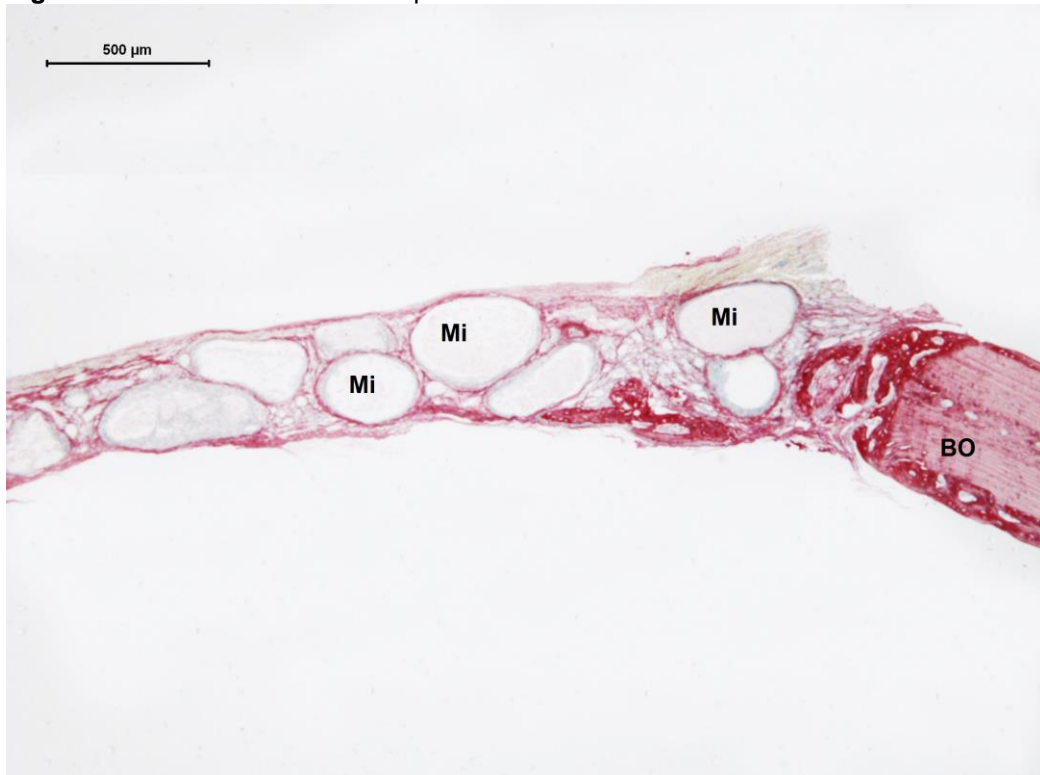
Tecido conjuntivo frouxo (TCf). Veia Central (VC). Região da dura-máter (DM). HE. Barra 200 μm.
Fonte: Foto do autor.

Figura 28 – GHAMi. Análise da espessura do defeito e das bordas.



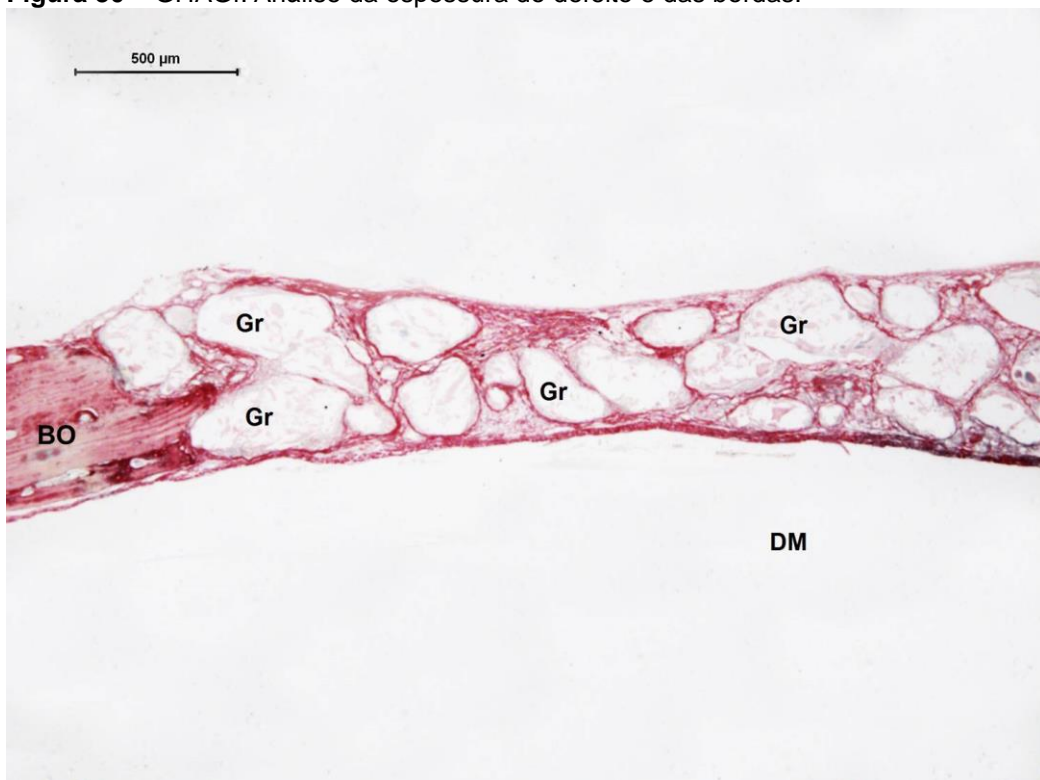
Microesferas (Mi). Borda óssea (BO). Região da dura-máter (DM). HE. Barra 500 μm. **Fonte:** Foto do autor.

Figura 29 – GHAMi. Análise da espessura do defeito e das bordas.



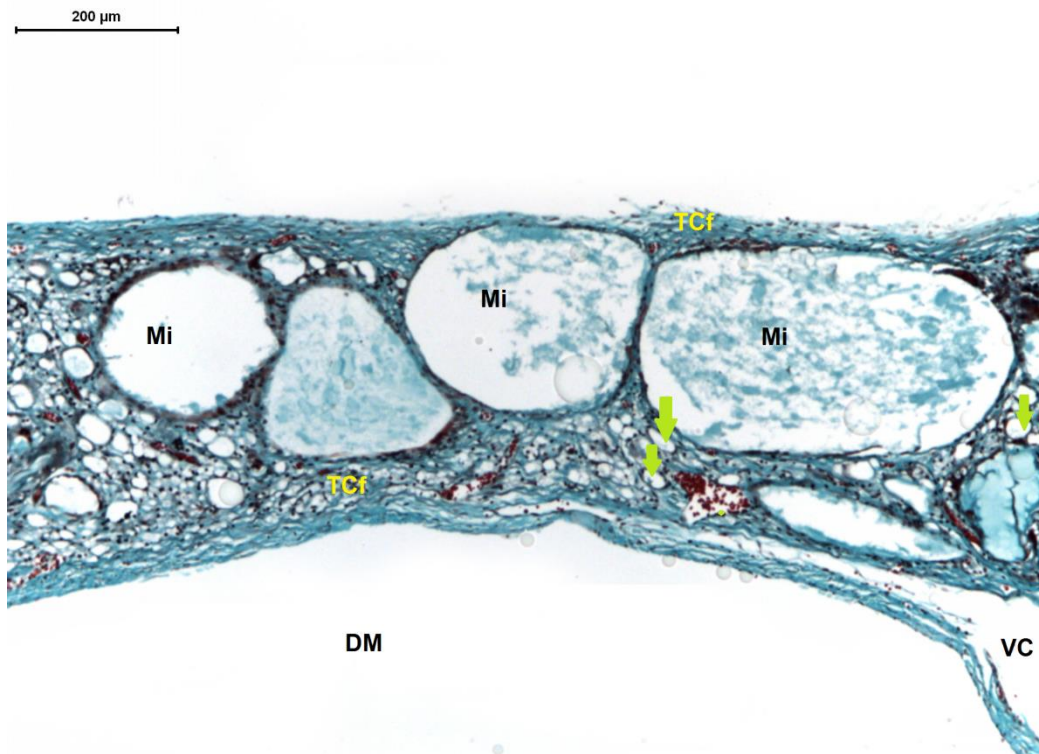
Microesferas (Mi). Borda óssea (BO). PIFG. Barra 500 μ m. **Fonte:** Foto do autor.

Figura 30 – GHAGr. Análise da espessura do defeito e das bordas.



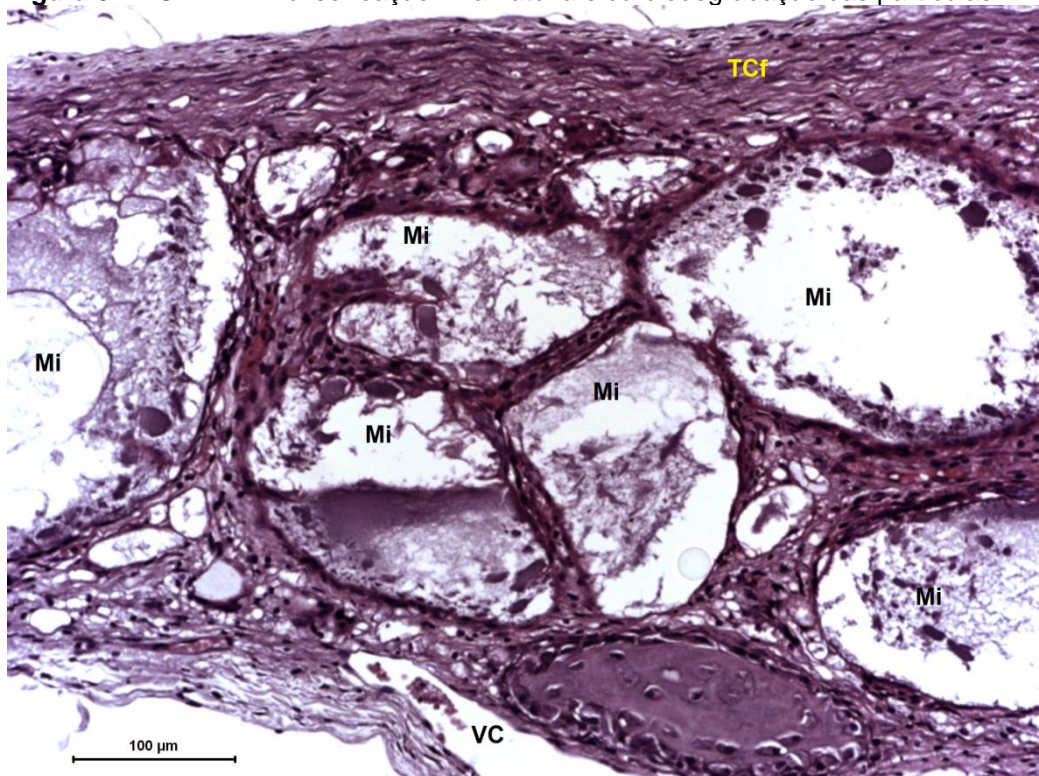
Microesferas (Gr). Borda óssea (BO). Região da Dura-máter PIFG. Barra 500 μ m. **Fonte:** Foto do autor.

Figura 31 – GHAMi. Análise do interstício entre as partículas.



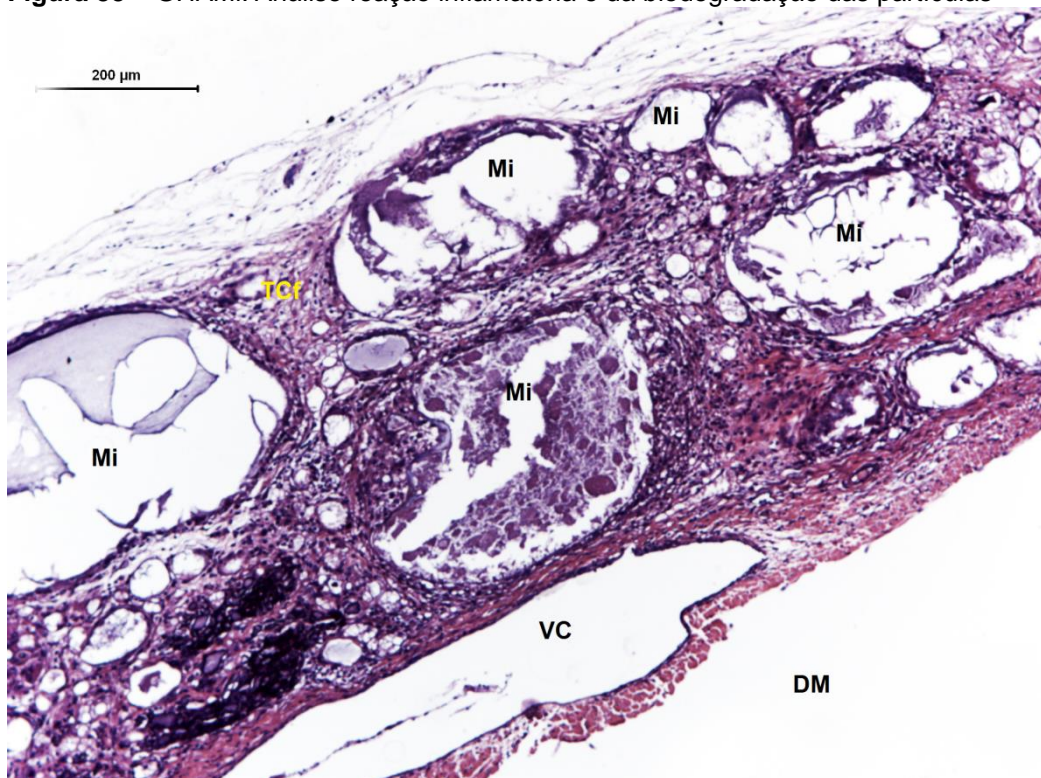
Microesferas (Mi). Capilar sanguíneo (Setas verdes) Tecido conjuntivo frouxo (TCf). Veia Central (VC). Região da dura-máter (DM). GOLD. Barra 200 μm. **Fonte:** Foto do autor.

Figura 32 – GHAMi. Análise reação inflamatória e da biodegradação das partículas.



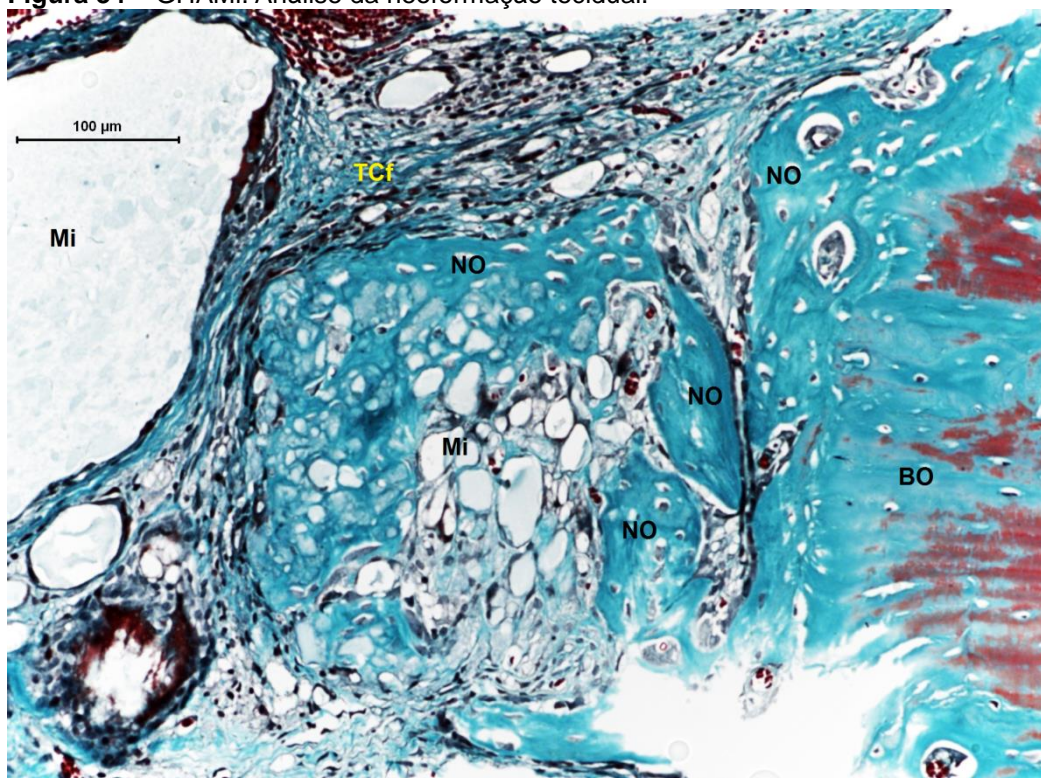
Microesferas (Mi). Tecido conjuntivo frouxo (TCf). Veia Central (VC). HE. Barra 100 μm. **Fonte:** Foto do autor.

Figura 33 – GHAMi. Análise reação inflamatória e da biodegradação das partículas



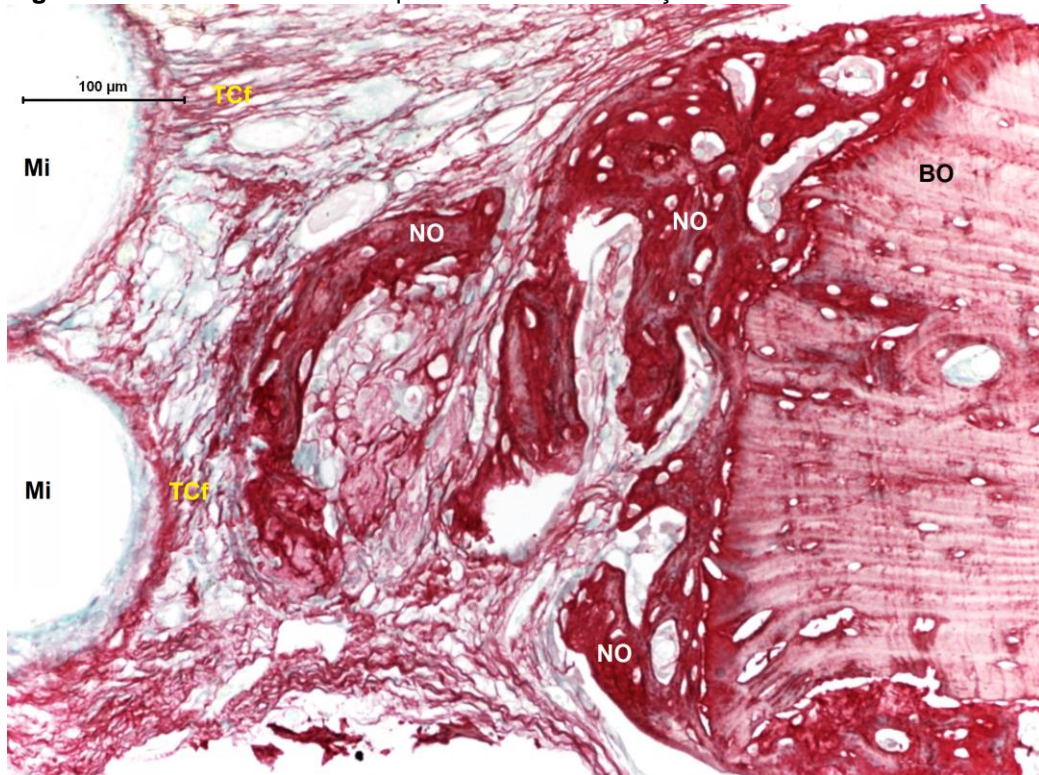
Microesferas (Mi). Tecido conjuntivo frouxo (TCf). Veia Central (VC). HE. Barra 200 μm. **Fonte:** Foto do autor.

Figura 34 – GHAMi. Análise da neoformação tecidual.



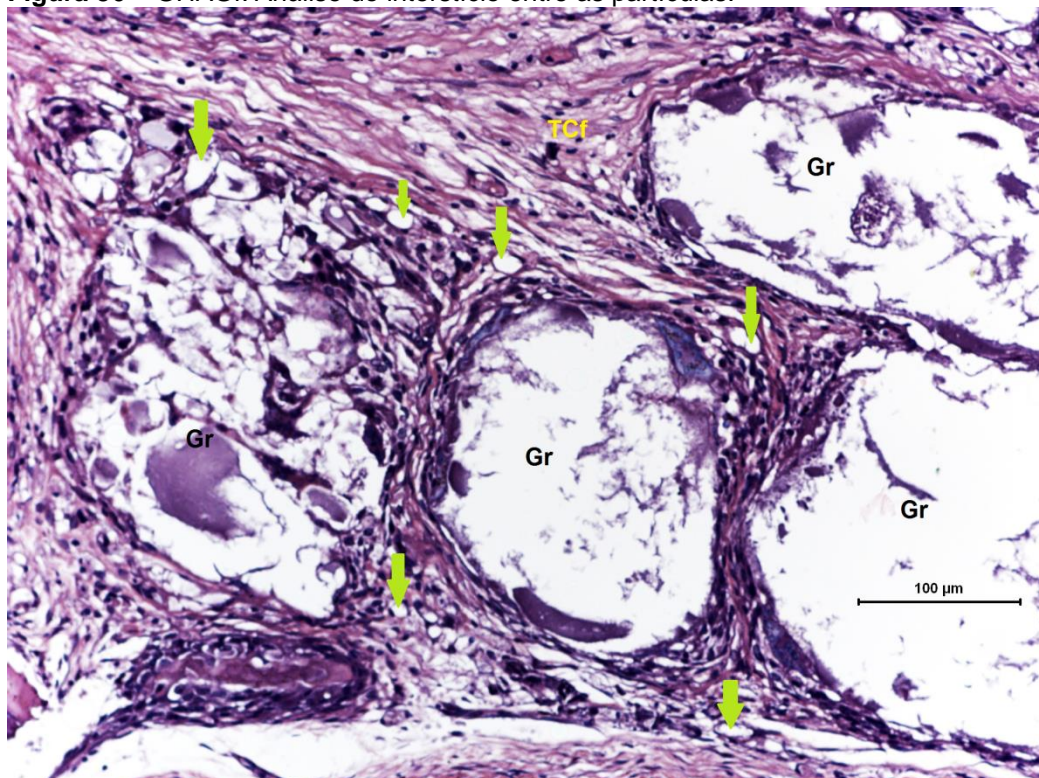
Microesferas (Mi). Tecido conjuntivo frouxo (TCf). Neoformação óssea (NO). Borda óssea (BO). GOLD. Barra 100 μm. **Fonte:** Foto do autor.

Figura 35 – GHAMi. Análise da qualidade da neoformação tecidual.



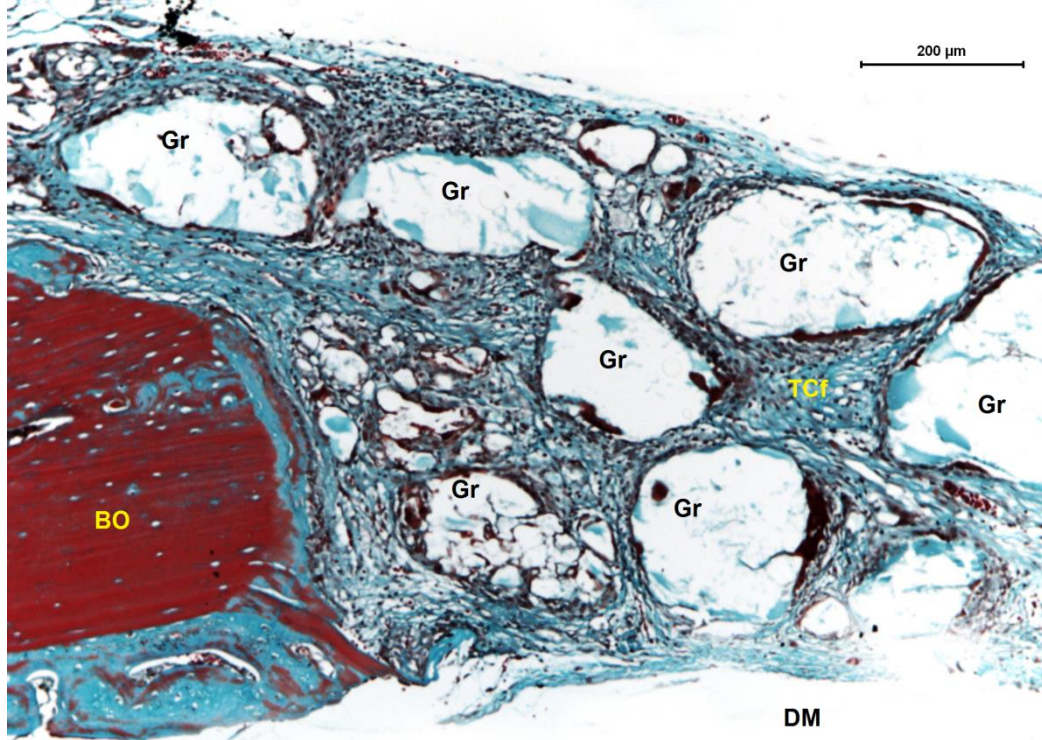
Microesferas (Mi). Tecido conjuntivo frouxo (TCf). Neoformação óssea (NO). Borda óssea (BO). PIFG. Barra 100 μm. **Fonte:** Foto do autor.

Figura 36 – GHAGr. Análise do interstício entre as partículas.



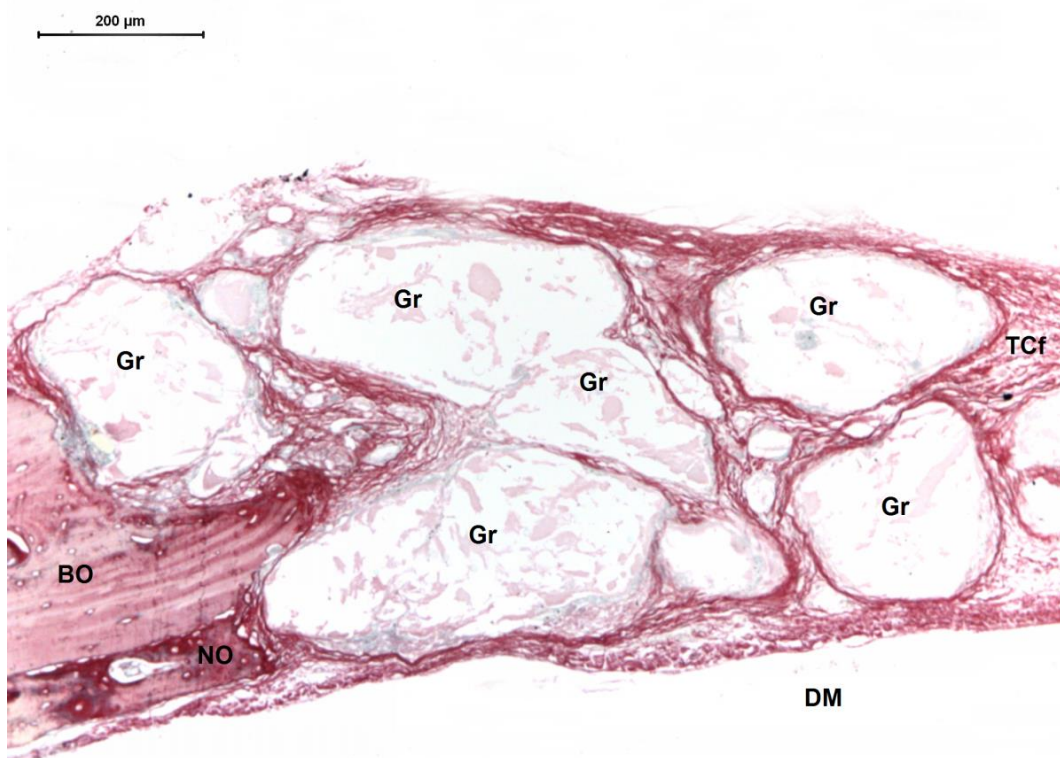
Grânulos (Gr). Tecido conjuntivo frouxo (TCf). Capilar Sanguíneo (Setas verdes). HE. Barra 100 μm. **Fonte:** Foto do autor.

Figura 37 – GHAGr. Análise da neoformação tecidual.



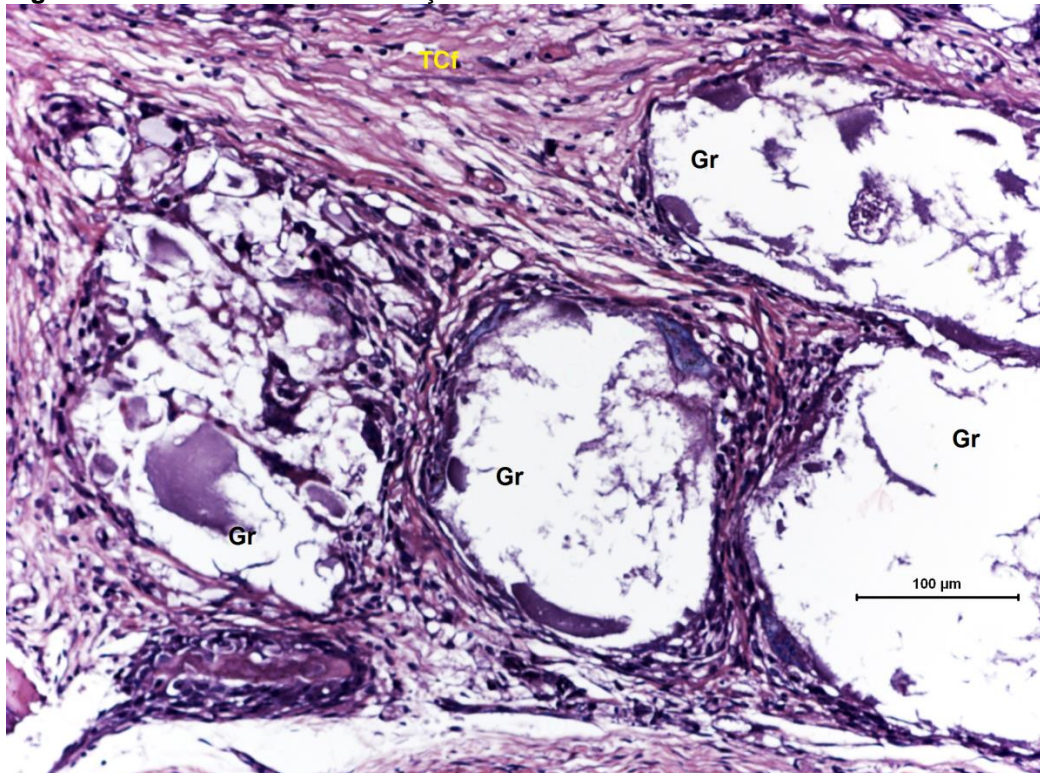
Grânulos (Gr). Tecido conjuntivo frouxo (TCf). Borda óssea (BO). Região da dura-máter (DM). GOLD. Barra 200 µm. **Fonte:** Foto do autor.

Figura 38 – GHAGr. Análise da qualidade da neoformação tecidual.



Grânulos (Gr). Tecido conjuntivo frouxo (TCf). Neoformação óssea (NO). Borda óssea (BO). Região da dura-máter (DM). PIFG. Barra 200 µm. **Fonte:** Foto do autor.

Figura 39 – GHAGr. Análise da reação inflamatória.



Grânulos (Gr). Tecido conjuntivo frouxo (TCf). HE. Barra 100 μm. **Fonte:** Foto do autor.

Discussão

6 DISCUSSÃO

O mecanismo de reparação óssea é um fenômeno dinâmico e complexo que requer compreensão dos principais fatores que interferem na maneira das células ósseas interagirem com o ambiente em sua volta. Sob condições fisiológicas, esse evento pode consolidar-se por regeneração naquelas situações que resultam em pequenos defeitos e/ou lesões, de forma espontânea. (SULAIMAN et al., 2013)

Como observado no DC, pelas características teciduais produzidas e a espessura reduzida do preenchimento em toda extensão do defeito ósseo, uma lesão e/ou defeito de dimensão crítica impossibilita a migração das células ósseas presentes no tecido ósseo remanescente às bordas do defeito ósseo e periosteio, devido à falta de arcabouço adequado. Desta forma, o reparo tecidual foi findado por deposição de tecido conjuntivo frouxo, que não exerce a função do tecido ósseo natural, e a neoformação óssea reativa limitou-se às bordas do defeito ósseo, semelhante aos estudos de Cardoso e colaboradores (2006), Rolim (2010), Barreto (2011), Miguel e colaboradores (2006; 2013), Ribeiro (2013) e Ribeiro e colaboradores (2014). Esse fato comprova, também, a pertinência e a confiabilidade da utilização do modelo experimental deste estudo, que se caracteriza por simular uma lesão óssea cujo mecanismo de reparação não é finalizado por regeneração completa da área acometida, (ŠPONER; STRNADOVÁ; URBAN, 2010) como naqueles casos de doenças congênitas, ressecções cirúrgicas extensas, traumas e eventos inflamatórios graves, dentre outros. Assim sendo, vê-se a necessidade da utilização de estruturas que sirvam como arcabouço ideal, e temporário, para viabilizar a atividade celular, proliferação de novos vasos sanguíneos e o transporte de nutrientes e moléculas fundamentais para a regeneração tecidual.

A espessura proporcional à do tecido ósseo remanescente às bordas, e a integridade da maioria das partículas dispostas nas regiões mais centrais do defeito ósseo, observada nos dois grupos em que houve implantação dos biomateriais nanoestruturados, GHAMi e GHAGr, demonstra que as partículas foram biocompatíveis e serviram como estrutura de suporte para a neoformação tecidual circunjacente. Desta forma, esses biomateriais nanoestruturados podem atuar como condutores, independente do formato e da variação de tamanho entre as partículas, e oferecer arcabouço que favorece o reestabelecimento funcional, e estrutural, da área lesionada.

Em relação à proliferação dos capilares sanguíneos, mais abundante no GHAMi e no GHAGr, circunjacentes aos biomateriais, observa-se que os arcabouços compósitos à base de HA e alginato forneceram estrutura superficial que assegurou ambiente biológico favorável à angiogênese, e à neoformação tecidual circundante, pois proporcionou a passagem e influxo de nutrientes através dos vasos neoformados. (VENKATESAN et al., 2015)

Para que um biomaterial sirva como arcabouço temporário e seja substituído por novo tecido ósseo, é necessário que haja biodegradação e/ou biorreabsorção, numa velocidade ideal, compatível com a neoformação tecidual. (LIU; MA, 2004) Neste sentido, como observado no GHAMi e no GHAGr, enquanto aquelas partículas que permaneceram íntegras serviram como arcabouço estrutural, outras apresentaram biodegradação parcial e/ou total, principalmente, na região das bordas do defeito. Essa propriedade, apresentada por esses compósitos, destaca a influência positiva da presença do alginato na composição química do arcabouço. Esse componente orgânico, ao entrar em contato com o estroma, é então dissolvido pelas enzimas contidas nos fluidos corpóreos, e reabsorvido de forma que permite a liberação gradual dos componentes inorgânicos do compósito, íons de Ca e P, contidos nos cristais de HA. Dessa maneira, o alginato atua de forma a potencializar o mecanismo de biomineralização desses biomateriais, pois permite que haja o estímulo para CaP amorfo, precursor dos nanocristais de HA, a iniciar a nucleação nos espaços situados entre as fibras de colágeno, (CHAE et al., 2013) presentes na matriz osteoide neoformada no interior das partículas, como notado no GHAMi. Diferentemente do que foi observado no estudo de Barreto (2008), quando o alginato fora removido à temperatura de 300°C, durante a síntese dos biomateriais, em que, aos 15 dias, as microesferas não foram degradadas devido, em parte, ao processo de calcinação que levou à sinterização mais efetiva da HA, em rampa de aquecimento até 1100°C, e resultou em maior cristalinidade, agregação e crescimento das nanopartículas com formação dos contornos de grão, e maior resistência à compressão e biodegradação. Fato este que, ao contrário do que foi observado em GHAMi, restringiu o potencial osteogênico do biomaterial à osteocondutividade. Isso poderia ser atribuído ao fato das microesferas, no trabalho de Barreto (2008), apresentarem dimensão maior (entre 400 e 600 µm). Todavia, como observado por Paula (2008) e Paula e colaboradores (2009), quando as microesferas não calcinadas apresentavam, aproximadamente, a mesma dimensão

(400 μm), houve biodegradação e presença de fibras de colágeno no interior das partículas. Outro achado significativo foi que, no trabalho de Barreto (2011), as partículas sinterizadas tinham a mesma dimensão do GHAMi (entre 250 e 425 μm), e não houve biodegradação expressiva das microesferas de HA.

Uma das inovações trazidas pelos novos biomateriais utilizados neste experimento, em ambos os formatos, é o fato de terem sido sintetizados em escala nanométrica. Os focos de matriz osteoide neoformada no interior das microesferas, parcialmente biodegradadas, no GHAMi, com presença de inúmeros osteócitos aprisionados e viáveis, evidenciam que, como proposto Valenzuela e colaboradores (2012), os cristais de HA nanoestruturados podem se dissolver mais rapidamente devido à maior área de superfície exposta ao ambiente biológico e acelerar a velocidade de formação e crescimento da camada de apatita biologicamente ativa e potencializar a interligação química entre os biomateriais e o osso neoformado, com consequente fixação, seguida de diferenciação das células-tronco locais.

Por outro lado, a predominância da invasão de macrófagos, linfócitos, células gigantes multinucleadas e muitos fibroblastos, que resultou na formação de tecido conjuntivo no interior de alguns poucos grânulos degradados, no GHAGr, reforça a hipótese de que o formato e a superfície irregular dos grânulos podem não atrair células de linhagem óssea e, deste modo, há formação de tecido cicatricial.

No que tange aos aspectos das estruturas formadas entre as partículas, infere-se que a quantidade de interstício neoformado por tecido conjuntivo frouxo, edemaciado, vascularizado, entre os grânulos, no GHAGr, menor do que observado entre as microesferas, no GHAMi, resultou da redução, quase completa, do interstício. Isto, resultante da distribuição das partículas no defeito ósseo que, como sugerido por Piccinini (2012), Ribeiro (2013) e Ribeiro e colaboradores (2014), interfere na migração das células durante o reparo tecidual.

A reação inflamatória crônica granulomatosa, resultante da implantação dos biomateriais, consideravelmente mais acentuada de permeio aos grânulos do GHAGr, em comparação à observada ao redor das microesferas do GHAMi, demonstra que, quanto menor for a partícula, maior será a área superficial de contato entre estas e o estroma circundante. Fato este que modulou a resposta celular do interstício em que os biomateriais foram implantados.

Por não serem esferoides, e possuírem formas irregulares na superfície, os grânulos organizaram-se em mosaico e, possivelmente, induziram as células

inflamatórias a responderem de forma mais intensa. Supõe-se que seja um mecanismo de defesa durante a interação célula-arcabouço, na interface estroma-biomaterial. Consequência disto, houve presença mais acentuada de CGM no tecido granulomatoso, produzido de permeio às partículas no GHAGr, em relação às microesferas do GHAMi. Isso reforça a premissa de que o formato com que os biomateriais apresentam-se interfere, diretamente, sobre a formação de um interstício adequado e, subsequente, na resposta tecidual à presença das partículas. (ŠPONER; STRNADOVÁ; URBAN, 2010; CAMARGO; LIMA; GEMELLI, 2012)

De todo modo, a inflamação crônica granulomatosa, observada na presença das partículas do GHAMi e do GHAGr, denominada reação corpo estranho, esperada toda vez que um material é implantado no organismo, (RATNER et al., 2004) comprovou a biocompatibilidade de ambos os formatos dos biomateriais, pois não houve rejeição pelo organismo, caracterizada por inflamação aguda exacerbada. (ALMEIDA, 2010) Essa potencialidade dos biomateriais compósitos à base de CaP e polímeros se deve, principalmente, à sua composição físico-química, formada por moléculas e íons que mimetizam a porção inorgânica do tecido ósseo natural, por parte da HA, e às propriedades ultraestruturais do alginato, que otimiza este CaP, e torna a estrutura do arcabouço atrativo para as células e viabiliza sua atividade.

Nossos resultados contrapõem aqueles principais observados por Ribeiro (2013) em que, enquanto as microesferas atuaram melhor como arcabouço de preenchimento, os grânulos apresentaram potencial osteocondutor superior. Destaca-se então que, naquele estudo, os biomateriais apresentavam diâmetro entre 425 e 600 μm . Isto, associado ao intenso processo inflamatório crônico granulomatoso notado ao redor das partículas no GHAGr, pode ser explicado pelo fato de, quanto menor o tamanho da partícula, nos planos dos cortes histológicos observados, maior a área de superfície de contato entre o biomaterial e o estroma, conseqüentemente, maior a atividade celular adjacente. Além disso, os grânulos utilizados por Ribeiro (2013) continham alginato a 1%, e tiveram síntese diferente das microesferas, enquanto em nosso estudo esta concentração foi um pouco maior, 1,5%. Assim sendo, a resposta peculiar apresentada pelos grânulos pode ser atribuída ao conjunto de relações entre suas propriedades físico-químicas. (RIBEIRO, 2013)

Tendo em vista que os resultados deste estudo estão relacionados à fase

inicial do mecanismo de reparo ósseo, decorrente da implantação dos novos biomateriais compósitos, que influenciarão significativamente nos eventos consecutivos, torna-se premente a necessidade da observação dos pontos biológicos que os precede. Desta forma, poder-se-á agregar mais informações que auxiliarão na avaliação do formato dos biomateriais no reparo ósseo.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

O formato dos compósitos de HA nanoestruturada associada ao alginato foi determinante na resposta tecidual aos biomateriais.

Nesta fase inicial do reparo ósseo, as microesferas foram mais atraentes para a neoformação óssea.

Referências

REFERÊNCIAS

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

ALFORD A. I.; KOZLOFF, K. M.; HANKENSON, K. D. Extracellular matrix networks in bone remodeling. **Int J Biochem Cell Biol**. v. 65, p. 20-31, 2015.

ALMEIDA, A.S. **Obtenção e caracterização de nanocompósitos de poli(l-lactídeo) e nanopartículas de argila sódica, argilas organofílicas e óxidos de sílica**. 2010. 132f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Polímeros) - Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

ANDIA, D. C.; CERRI, P. S.; SPOLIDORIO, L. C. Bone tissue: morphological and histophysiological aspects. **Rev Odontol UNESP**. v. 35, n. 2, p. 191-98, 2006.

ANDRADE, A.D.; MARINHO, C. F.; BARCELOS, M.; ZORZAL, M. B.; CONZ, M. B., VIDIGAL JR, G. M. Biologia óssea: uma revisão da literatura. **Rev Implant News** , São Paulo, v.4, n.6, p.659-662, 2007.

ARAUJO, 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.

BANDYOPADHYAY, A.; TSUJI, K.; COX, K.; HARFE, B. D.; ROSEN, V.; TABIN, C. J. Genetic Analysis of the Roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in Limb Patterning and Skeletogenesis. **PLoS Genet**. v. 2, n. 12, 2006.

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.

BERNHARDT A.; DITTRICH, R.; LODE, A.; DESPANG, F.; GELINSKY. M. Nanocrystalline spherical hydroxyapatite granules for bone repair: in vitro evaluation with osteoblast-like cells and osteoclasts. **J Mater Sci Mater Med**. v. 24, n. 7, p. 1755-66, 2013.

BERTINETTI, L.; TAMPIERI, A.; LANDI, E.; MARTRA, G.; COLUCCIA, S. Punctual investigation of surface sites of HA and magnesium-HA. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 26, p. 987–991, 2006.

BRUN, F.; TURCO, G.; ACCARDO, A.; PAOLETTI, S. Automated quantitative characterization of alginate/hydroxyapatite bone tissue engineering scaffolds by means of micro-CT image analysis. **J Mater Sci Mater Med**. v. 22, n. 12, p. 2617-29, 2011.

- CAMARGO, N.H.A, DELIMA, S. A., GEMELLI, E. Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite/TiO₂n Nanocomposites for Bone Tissue Regeneration. **American Journal of Biomedical Engineering**, v. 2, n. 2, p. 41-47, 2012.
- CAMPOS, S.D.; CAMPOS, E.A.; SILVEIRA, C.B.; BINI, R.A. Biomateriais à base de Na₂O-CaO-SiO₂-P₂O₅ preparados com serragem e com glucose de milho: influência na porosidade e na cristalinidade. **Cerâmica**. v. 51, p. 274-79, 2005.
- 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.
- CARDOSO, D. A.; ULSET, A. S.; BENDER, J.; JANSEN, J. A.; CHRISTENSEN, B. E.; LEEUWENBURGH, S. C. Effects of physical and chemical treatments on the molecular weight and degradation of alginate–hydroxyapatite composites. **Macromol Biosci**. v. 14, n. 6, p. 872-80, 2014.
- 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.
- CORTES, Gracy Karla da Rocha. **Síntese e caracterização de híbridos à base de alginato de sódio e escamas de peixe para uso na remoção de espécies poluentes**. 2010. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.
- CHAE T.; YANG, H.; LEUNG, V.; KO, F.; TROCZYNSKI, T. Novel biomimetic hydroxyapatite/alginate nanocomposite fibrous scaffolds for bone tissue regeneration. **J Mater Sci Mater Med**. v. 24, n. 8, p.1885-94, 2013.
- DOURADO, Érico Rodrigues. **Preparação e caracterização de hidroxiapatita nanoestruturada dopada com estrôncio**. Dissertação (Mestrado) – Centro Brasileiro De Pesquisas Físicas, Rio de Janeiro, 2006.
- ELDESOQI, K.; HENRICH, D.; EL-KADY, A. M.; ARBID, M. S.; ABD EL-HADY, B. M.; MARZI, I.; SEEBACH, C. Safety evaluation of a bioglass-polylactic acid composite scaffold seeded with progenitor cells in a rat skull critical-size bone defect. **PLoS One**, v. 9, n. 2, 2014.
- FERREIRA, F. R. **Síntese, caracterização e aplicação biológica de hidroxiapatita: em presença de gelatina e associada a sulfato de gentamicina**. 2009. 117f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2009.
- GARCIA, A. G. **Avaliação da biocompatibilidade do compósito: biocerâmica/ácido poli (lático-co-glicólico) em fibroblastos e macrófagos e da resposta pulpar após capeamento direto**. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

GOMES, L.S. **Biomateriais em artroplastia de quadril: Propriedades, estrutura e composição.** In: GOMES LSM et al. editors. O quadril. São Paulo: Atheneu. p. 121-43, 2010.

GOUVEIA, Deiby Santos. **Obtenção de pós nanométricos de Hidroxiapatita sintetizados com magnésio utilizando ultra-som.** Tese (Doutorado em Ciências, Área de concentração: Tecnologia Nuclear - Materiais). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN. 2008.

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

IKADA, I. **Tissue Engineering: Fundamentals and Applications.** Elsevier, Oxford, United Kingdom, 2006.

KALITA, S.J.; BHATT, H.A. Nanocrystalline hydroxyapatite doped with magnesium and zinc: Synthesis and characterization. **Materials Science and Engineering C**, v. 27, P. 837848, 2007.

KASAJ, A. et al. Clinical evaluation of nanocrystalline hydroxyapatite paste in the treatment of human periodontal bony defects--a randomized controlled clinical trial: 6-month results. **J. Periodontol.**, Indianapolis, v. 79, n. 3, p. 394-400, 2008.

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.

KOUTSOS, V. **Polymeric materials: an introduction.** In: Forde M, Telford T. ICE Manual of construction materials. London. p. 571-77, 2009.

LACERDA, K. A. **Obtenção de matrizes bioabsorvíveis à base de hidroxiapatita para aplicação em braquiterapia.** 2005. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais) - Comissão Nacional de Energia Nuclear, Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Belo Horizonte, 2005.

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

LIU, X.; MA, P.X. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. **Annals of Biomedical Engineering**. v. 32, p. 477-86, 2004.

LOGEART-AVRAMOGLU, D.; ANAGNOSTOU, F.; BIZIOS, R.; PETITE, H. Engineering bone: challenges and obstacles. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 9, n. 1, p. 72-84, 2005.

MALAVAL, L.; WADE-GUÉYE, N. M.; BOUDIFFA, M.; FEI, J.; ZIRNGIBL, R.; CHEN, F.; LAROCHE, N.; ROUX, J. P.; BURT-PICHAT, B.; DUBOEUF, F.; BOIVIN, G.; JURDIC, P.; LAFAGE-PROUST, M. H.; AMÉDÉE, J.; VICO, L.; ROSSANT, J.; AUBIN, J. E. Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. **J Exp Med**. v.205, n. 5, p. 1145-53, 2008.

MARKOVIC, M.; FOWLER, B. O.; TUNG, M. S.; Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite reference material. **Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology**. v. 109, n. 6, p. 553-568, 2004.

MARQUES, A. P.; REIS, R. L.; HUNT, J. A. Evaluation of the potential of starch-based biodegradable polymers in the activation of human inflammatory cells. **J Mater Sci Mater Med**, v. 14, n. 2, p. 167-73, 2003.

MARQUES, A. C. F. **Grânulos porosos para regeneração óssea e libertação controlada de fármacos**. 2010. 96f. Dissertação (Mestrado em Materiais e Dispositivos Biomédicos) - Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2010.

MARQUES, L.; HOLGADO, L. A.; FRANCISCHONE, L. A.; XIMENEZ, J. P.; OKAMOTO, R.; KINOSHITA, A. New LLLT protocol to speed up the bone healing process-histometric and immunohistochemical analysis in rat calvarial bone defect. **Lasers Med Sci**. v. 30, n. 4, p. 1225-30, 2015.

MARTIN, R.B. Biomaterials. In: Dorf RC. editor. The Engineering Handbook. Boca Raton: CRC Press LLC, 2000.

MAVROPOULOS, E.; ROCHA, N. C. C.; MOREIRA, J. C.; ROSSI, A. M.; SOARES, G. A. Characterization of phase evolution during lead immobilization by synthetic hydroxyapatite. **Materials Characterization**, v. 53, p. 71– 78, 2004.

MEINEL, L. FAJARDO, R.; HOFMANN, S.; LANGER, R.; CHEN, J.; SNYDER, B.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; KAPLAN, D. Silk implants for the healing of critical size bone defects. **Bone**, v. 37, n. 5, p. 688-698, 2005.

MIGUEL, F.B.; CARDOSO, A. K.; BARBOSA, A. A. Jr; MARCANTONIO, E. Jr; GOISSIS, G., ROSA, F. P. Morphological assessment of the behavior of threedimensional 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 glutaraldeí do, 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.

MIGUEL, F. B.; BARBOSA JÚNIOR, A.; PAULA, F. L.; BARRETO, I. C.; GOISSIS, G.; ROSA, F. P. Regeneration of critical bone defects with anionic collagen matrix as scaffolds. Journal of Materials Science. **Materials in Medicine** (Dordrecht. Online), v. 24, p. 2567-2575, 2013.

MOHARAMZADEH, K.; BROOK, I. M.; VAN NOORT, R. Biocompatibility of Resin-based Dental Materials. **Materials**, v. 2, p. 514-548, 2009.

MOREIRA, J. M. B. **Hidroxiapatita associada à gentamicina: um estudo da influencia da gelatina no meio de precipitação e do processo de secagem na**

inibição do crescimento bacteriano. 2009. 118f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2009.

MOTTA, V.T. **Bioquímica clínica para laboratório: princípios e interpretações.** 4.ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau, 2003. 419 p.

NAIR, A. K.; GAUTIERI, A.; CHANG, S-W.; BUEHLER, M. J. Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone. **Nat Commun.** v. 4, n. 2724, p.1-9, 2013.

O'BRIEN, F. J.; FARELL, E.; WALLER, M. A.; CONNELL, I.; O' MAHONEY, D. O.; McGARRY, J. P.; MURPHY, B. P.; McHUNG, P. E.; CAMPBELL, V. A.; PRENDERGAST, P. J. **Scaffolds and cells: preliminary biomechanical analysis and results for the use of a collagen-GAG scaffold for bone tissue engineering.** In: PRENDERGAST, P. J.; McHUNG, P. E. (Ed.) Topics in biomechanical engineering, cap.4, p.167-183, 2004.

O'BRIEN, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. **Materials Today**, v. 14, n. 3, p. 88–95, 2011.

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

PARK, C. H.; RIOS, H. F.; JIN, Q.; SUGAI, J. V.; PADIAL-MOLINA, M.; TAUT, A. D.; FLANAGAN, C. L.; HOLLISTER, S. J.; GIANNOBILE, W. V. Tissue engineering bone-ligament complexes using fiber-guiding scaffolds. **Biomaterials.** v. 33, n. 1, p. 137-45, 2012.

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.

PARK, J. H.; LEE, E. J.; KNOWLES, J. C.; KIM, H. W. Preparation of in situ hardening composite microcarriers: Calcium phosphate cement combined with alginate for bone regeneration. **J Biomater Appl.** v. 28, n. 7, p. 1079-84, 2014.

PICCININI, M. Porous calcium phosphate granules for biomedical applications. Thesis (Doctoral School in Materials Science and Engineering) – Department of Materials Engineering and Industrial Technologies, University of Trento, Italy, 2012.

PINA, S.; OLIVEIRA, J. M.; REIS, R. L. Natural-based nanocomposites for bone tissue engineering and regenerative medicine: a review. **Adv. Mater.** v.27, n. 7, p. 1143–1169, 2015.

POLDERVAART M. T.; WANG H.; VAN DER STOK, J.; WEINANS, H.; LEEUWENBURGH, S. C. G.; ONER, F. C.; WOUTER J. A. DHERT, W. J. A.;

ALBLAS, J. Sustained release of BMP-2 in bioprinted Alginate for osteogenicity in mice and rats. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

RATNER, B. D. HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. **Biomaterials science: An introduction to materials in medicine**, 2nd edition. New York: Elsevier Academic Press, 2004.

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.

RIBEIRO, I. I. A.; ALMEIDA, R. S.; ROCHA, D. N.; PRADO DA SILVA, M. H.; MIGUEL, F. B.; ROSA, F. P. Biocerâmicas e polímero para a regeneração de defeitos ósseos críticos. **Revista Ciências Médicas e Biológicas**, v. 13, p. 298-302, 2014.

RODRIGUES, A. P. **Preparação e caracterização de membranas de quitosana e alginato para aplicação na terapia de lesões**. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

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.

SANTOS, G. G.; MARINHO, S. M. O. C.; MIGUEL, F. B. Polímeros como biomateriais para o tecido cartilaginoso. **Revista Ciências Médicas e Biológicas**, v. 12, p. 365-371, 2013.

SEAL, B. L.; OTERO, T.C.; PANITCH, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **Mater. Sci. Eng. R.**, v.34, p.147-230, 2001.

SHAH, N. J.; HYDER, N.; QUADIR, M. A.; COURCHESNE, N. M. D.; SEEHERMAN, H. J.; NEVINS, M.; SPECTOR, M.; HAMMOND, P. T. Adaptive growth factor delivery from a polyelectrolyte coating promotes synergistic bone tissue repair and reconstruction. **Proc Natl Acad Sci U S A**; v. 111, n. 35, p. 12847-52, 2014.

ŚLÓSZARCZYKA, A.; PASZKIEWICZA, Z.; PALUSZKIEWICZA, C. FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods. **Journal of Molecular Structure**, v. 744–747, p. 657–661, 2005.

STOCH, A.; JASTRZEBSKI, W.; BROZEK, A.; STOCH, J.; SZATRANIEC, J.; TRYBALSKA, B. FTIR absorption-reflection study of biomimetic growth of phosphates on titanium implants. **J. Mol. Struct.**, 555: 375, 2000.

STRIETZEL, F. P.; REICHART, P. A.; GRAF, H. L. Lateral alveolar ridge augmentation using a synthetic nano-crystalline hydroxyapatite bone substitution material (Ostim): preliminary clinical and histological results. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 18, n. 6, p. 743-751, 2007.

- TELLEMAN, G. et al. Peri-implant endosseous healing properties of dual acid-etched mini-implants with a nanometer-sized deposition of CaP: a histological and histomorphometric human study. **Clin. Implant. Dent. Relat. Res.**, Hamilton, v. 12, n. 2, p. 153-160, 2010.
- TENG, S.; SHI, J.; PENG, B. L.; CHEN, F. The effect of alginate addition on the structure and morphology of hydroxyapatite/gelatin Nanocomposites. **Compos Sci Technol.** v. 66, p. 1532–8, 2006.
- TOCCE, E.J; BRODERICK, A.H; MURPHY, K.C.; LILIENSIEK, S.J.; MURPHY, C.J.; LYNN, D.M.; NEALEY, P.F. Functionalization of reactive polymer multilayers with RGD and an anti-fouling motif: RGD density provides control over human corneal epithelial cell-substrate interactions. **J. Biomed. Mat. Res. Part A.** v. 100, n. 1, p. 84–93, 2012.
- VALENZUELA, F.; COVARRUBIAS, C.; MARTÍNEZ, C.; SMITH, P.; DÍAZ-DOSQUE, M.; YAZDANI-PEDRAM, M. Preparation and bioactive properties of novel bone-repair bionanocomposites based on hydroxyapatite and bioactive glass nanoparticles. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.** v. 100, n. 6, p.1672-82, 2012.
- VALLET-REGÍ, M.; GONZÁLEZ-CALBET, J.M. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 32, p.1-31, 2004.
- VASCONCELOS, L. Q.; SILVA, S. C.; SANTOS, G. G.; ROSA, F. P. Utilização de nanobiomateriais na regeneração óssea: uma revisão baseada em ensaios clínicos. **Revista Ciências Médicas e Biológicas**, v. 13, p. 377-380, 2014.
- VENKATESAN, J.; BHATNAGAR, I.; MANIVASAGAN, P.; KANG, K. H.; KIM, S. K. Alginate composites for bone tissue engineering: a review. **Int J Biol Macromol.** v. 72, p. 269-81, 2015.
- WAHL, D. A.; CZERNUSZKA, J. T. Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair. **Eur Cell Mater.** v. 28, n. 11, p.43-56, 2006.
- WALMSLEY, G. G.; MCARDLE, A.; TEVLIN, R.; MOMENI, A.; ATASHROO, D.; HU, M. S.; FEROZE, A. H.; WONG, V. W.; LORENZ, P. H.; LONGAKER, M. T.; WAN, D. C. Nanotechnology in bone tissue engineering. **Nanomedicine.** v.11, n. 5, p. 1253-63, 2015.
- WARDEN S. J.; DAVIS, I. S.; FREDERICSON, M. Management and prevention of bone stress injuries in long-distance runners. **J Orthop Sports Phys Ther.** v.;44, n. 10, p. 749-65, 2014.
- YIP, I.; MA, L.; MATTHEOS, N.; DARD, M.; LANG, N. P. Defect healing with various bone substitutes. **Clin. Oral Impl. Res.** v. 0, p. 1-9, 2014.
- YUASA, T.; MIYAMOTO, Y.; ISHIKAWA, K.; TAKECHI, M.; MOMOTA, Y.; TATEHARA, S.; NAGAYAMA, M. Effects of apatite cements on proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. **Biomaterials**, v.25, p.1159-66, 2004.

ANEXO



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 **22 de julho de 2013**.

Salvador, 22 de julho de 2013.

Profª Dra. Songeli Menezes Freire
Coordenadora da CEUA-ICS



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>