

Orlando Paulo Moreira Martins

Estudo, *in vivo*, de uma hidroxiapatite
de arquitectura optimizada.

Faculdade de Medicina
Universidade de Coimbra
2009

Dissertação de Mestrado em Patologia Experimental
apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de Coimbra

Orientador:

Professor Doutor Fernando Alberto Deométrio Rodrigues Alves Guerra

Co-orientadora:

Professora Doutora Isabel Cláudia Masson Poiares Baptista

À Cristina,
meu porto de abrigo, pela minha indisponibilidade.

à Inês e ao Afonso
pela ausência.

Aos meus pais, à minha irmã

A todos os meus

SUMÁRIO

Agradecimentos

I – Introdução	9
1 – Abordagem do tema, objectivos e planificação do trabalho	10
2 – Interface Biomaterial-Meio: considerações gerais.....	13
2.1- Composição Química	14
2.2- Energia de Superfície/Molhabilidade.....	18
2.3- Adsorção de Proteínas.....	23
2.3- Rugosidade de Superfície.....	28
3- Biologia do Osteoclasto.....	32
II – Estudo Experimental em Modelo Animal.....	47
1-Objectivos.....	49
2-Material e Métodos.....	50
3-Resultados.....	69
4-Discussão.....	112
5-Conclusões.....	127
6- Resumo	129
7- <i>Summary</i>	134
III – Bibliografia.....	138

AGRADECIMENTOS

A elaboração da dissertação de Mestrado aqui apresentada é o resultado do apoio e influência de um conjunto grande de amigos. Todos eles contribuíram com as suas ideias, críticas e sugestões. Não posso deixar de manifestar a minha imensa gratidão a todos.

Ao Senhor Professor Doutor Fernando Alberto Deométrio Rodrigues Alves Guerra que muito me honrou com a aceitação da orientação deste trabalho. A sua amizade, partilha de conhecimentos e sabedoria, espírito crítico, postura e constante procura da excelência enquanto docente, investigador e clínico são para mim motivo de permanente inspiração. A sua dedicação incansável e permanente acompanhamento foram primordiais neste trabalho.

À Senhora Professora Doutora Isabel Cláudia Masson Poiares Baptista que me distinguiu com a aceitação da co-orientação deste trabalho. A excelência do seu desempenho científico e clínico, disponibilidade, amizade e espírito crítico são para mim motivo de eterna gratidão. Os seus ensinamentos enriquecem a minha vida profissional e pessoal, sendo, em muito, responsáveis pelo meu percurso académico. O seu incentivo foi essencial para a apresentação deste trabalho.

Ao Senhor Professor António Silvério Cabrita, coordenador deste mestrado, cujo espírito de investigação e conhecimento científico despertam em nós uma enorme admiração. A sua disponibilidade foi essencial para a execução deste trabalho.

À Senhora Professora Doutora Helena Figueiredo pelo seu acompanhamento constante e infatigável. O seu contributo científico e crítico foram basilares neste trabalho. A docente, investigadora e cidadã são merecedoras da minha profunda estima e amizade.

À Senhora D^a Cláudia Brites que, privando-se da vida familiar e com um esforço pessoal, me acompanhou de forma determinada, amiga e incansável no auxílio da parte experimental deste trabalho e no processamento das amostras.

Ao Senhor Professor Doutor Carlos Viegas, Professor Auxiliar da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, cuja disponibilidade, dedicação a aconselhamento para a execução da parte experimental merecem a minha profunda gratidão e

amizade. A proveitosa troca de conhecimentos com o investigador enriqueceu este trabalho.

À Senhora Professora Doutora Isabel Dias, Professora Auxiliar da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, investigadora abnegada e cujo contributo foi determinante para a execução da parte experimental.

À Senhora Professora Doutora Teresa Vieira, docente do Departamento de Engenharia Mecânica da FCTUC, que nos disponibilizou o biomaterial a testar e cujo perfil de investigadora e docente são para mim motivo de enorme admiração.

Ao Senhor Professor Doutor João Carlos Ramos, investigador, docente e clínico de excelência. Foi o responsável pela minha iniciação na investigação e a sua amizade, disponibilidade, incentivo e atento espírito crítico são presenças constantes e incontornáveis na minha vida profissional e pessoal. A minha sentida gratidão.

Ao Senhor Professor Doutor Sérgio Matos, colega e amigo que muito me apoia e aconselha na prática clínica e de investigação. Os seus ensinamentos críticos e amizade são uma referência profissional e pessoal. A admiração é profunda.

Aos meus colegas de disciplina de Periodontologia, Drs Tony Rolo e Francisco Marques, bem como ao higienista oral Senhor Francisco Marques, pela tolerância e ajuda nos momentos da minha menor disponibilidade no acompanhamento dos alunos.

À Senhora Dr^a Ana Mesias pela incansável disponibilidade e ajuda em alturas determinantes para a execução deste trabalho.

À Senhora Engenheira Gabriela Martins pelo apoio nalgumas questões relacionadas com aspectos químicos.

Aos meus amigos, eterna presença nos bons e maus momentos da minha vida e que em muito a enriquecem, pelo vosso apoio e tolerância. O vosso companheirismo e arguto espírito crítico são pilares da minha existência.

A todos os que, directa ou indirectamente, contribuíram, para a realização deste trabalho.

Capítulo I

I- INTRODUÇÃO

1- ABORDAGEM DO TEMA

Nas últimas cinco décadas tem-se assistido a um esforço multifacetado e polivalente no desenvolvimento de numerosos materiais sintéticos de enxerto ósseo para aplicações no âmbito da medicina dentária, da ortopedia e da cirurgia maxilofacial. Nesta área, destaca-se a sua utilização na reparação de defeitos periodontais, aumento do osso alveolar, elevação do seio maxilar e reparação de extensos defeitos ósseos causados por tumores ou traumatismos¹⁻³.

Estes materiais têm sido otimizados no sentido de melhorar a sua biointegração e funcionalidade, verificando-se uma tendência de aproximação das suas propriedades às do tecido ósseo original. Com efeito, após terem sido sintetizados materiais bioinertes e, mais recentemente, biocompatíveis, bioactivos e bioreabsorvíveis, o passo seguinte aponta para o desenvolvimento de materiais biomiméticos com uma composição e estrutura capaz de lhes fornecer intrínsecas capacidades osteoindutoras⁴. Efectivamente, uma das vantagens da utilização de materiais sintéticos reside na possibilidade de manipulação das suas características, de forma a estimular e modular as respostas celulares e moleculares no sentido pretendido^{4, 5}.

A ausência de problemas de imunogenicidade e facilidade de esterilização contribuem também para a crescente expansão dos materiais sintéticos⁶. Acresce, ainda, a possibilidade de obter lotes uniformes, com propriedades mais previsíveis do que os materiais de origem natural. Salienta-se, neste campo, o desenvolvimento de materiais capazes de proporcionar um suporte mecânico adequado à diferenciação e maturação do novo tecido ósseo e cuja degradação se processe de forma gradual, num período compatível com o crescimento dos tecidos que pretendem substituir. A este respeito é importante salientar o papel primordial dos osteoclastos nos processos de biodegradação/reabsorção destes materiais⁷. Os osteoclastos são, frequentemente, as células ósseas que primeiro contactam com os biomateriais determinando, muitas vezes, a sua estabilidade e sucesso clínico. Estas células, na sua actividade de reabsorção de matriz mineralizada (de origem natural ou sintética), estão, também, a preparar estas superfícies de forma a criar condições para uma posterior e eficaz adesão e proliferação das células da linha osteoblástica. Seguindo os ensinamentos da natureza esta marca estrutural será talvez de começar a ser levada em conta nos processos de fabricação de materiais biomiméticos de substituição óssea. O *footprint*

deixado na superfície dos biomateriais, pela actividade osteoclástica, terá uma micro, sub-micro e nanotopografia de excelência para a indução de um fenótipo osteoblástico, contribuindo de forma determinante para os processo de osteointegração e osteocondução dos biomateriais⁸.

OBJECTIVOS DO TRABALHO

A matriz mineral do tecido ósseo tem sido mimetizada através da manipulação de fosfatos de cálcio, entre os quais se destaca a hidroxiapatite, utilizando várias estratégias que incluem a fabricação de materiais nanoestruturados. A este propósito parece-nos pertinente lembrar que a matriz óssea é um biomaterial nanoestruturado, possuindo uma fase orgânica e uma fase mineral com dimensões nanométricas e que grande parte dos processos biológicos ocorrem a uma escala nano. Assim, os cerâmicos de fosfato de cálcio nanocristalinos parecem constituir materiais bastante promissores nos processos de osteointegração.

O trabalho experimental apresentado neste estudo propõe-se avaliar *in vivo*, no coelho, o processo de osteointegração e o potencial de regeneração óssea de uma hidroxiapatite sintética nanocristalina (cedida pelo Departamento de Engenharia Mecânica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra), recorrendo essencialmente a uma análise de índole histológica efectuada em microscopia de luz.

Este trabalho foi concebido com o objectivo de analisar o comportamento biológico desta hidroxiapatite sintética, utilizando um modelo de cicatrização óssea retardada com defeitos ósseos cranianos com reduzida contenção física, tendo como referência um defeito ósseo preenchido com osso autógeno (controlo positivo) e um defeito ósseo sem preenchimento (controlo negativo). Em paralelo foi ainda avaliada uma hidroxiapatite natural de origem bovina (Bio-Oss® Spongiosa), por ser um material de ampla utilização na clínica de Medicina Dentária.

O presente trabalho insere-se num conjunto de estudos desenvolvidos no âmbito da regeneração óssea, em execução no Departamento de Medicina Dentária, Estomatologia e Cirurgia Maxilo-Facial e Laboratório de Tecidos Duros da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Pretende-se, com este estudo, dar continuidade ao trabalho desenvolvido pelo grupo em que estamos integrados, contribuindo com mais alguns dados em relação ao

comportamento biológico de um material sintético, nanocristalino, à base de fosfato de cálcio.

PLANIFICAÇÃO DO TRABALHO

Esta dissertação encontra-se organizada em três capítulos distintos.

No primeiro capítulo, após breve abordagem do tema escolhido e depois de enunciados os objectivos, procede-se a uma pequena exposição sobre a “interface biomaterial-meio”. Neste âmbito dá-se especial enfoque a algumas das características do biomaterial que condicionam o seu desempenho biológico, nomeadamente a sua composição química, energia de superfície e adsorção de proteínas. Ainda nesta perspectiva, e tendo por base os resultados dos estudos histológicos por nós efectuados, pareceu-nos pertinente dar particular desenvolvimento à “Biologia do osteoclasto”. Com efeito, de entre a profusão de diferentes populações celulares observadas e analisadas nas lâminas histológicas, o osteoclasto estimulou o nosso interesse e curiosidade, considerando o seu papel primordial nos processos de biodegradação/reabsorção dos materiais em estudo. Assim, pretendemos chamar a atenção para a importância do osteoclasto e contribuir para uma melhor compreensão das capacidades funcionais desta célula na dinâmica do tecido ósseo e na reabsorção de alguns materiais de substituição óssea.

O segundo capítulo, que constitui a essência desta tese, compreende o “Estudo experimental em modelo animal” de diferentes biomateriais. Depois de uma descrição pormenorizada dos materiais utilizados e das metodologias aplicadas, procede-se à apresentação dos resultados. Por se tratar de um trabalho essencialmente de índole histológica e “como uma imagem vale mais que muitas palavras”, não quisemos deixar de documentar este estudo com numerosas imagens microfotográficas do material em análise, acreditando que a sua apresentação facilitará a compreensão deste trabalho.

Finalmente apresenta-se uma “Discussão” e interpretação global dos resultados, tendo por base as características do novo tecido ósseo formado nos processos de regeneração. Por último são enunciadas as principais “Conclusões” e apresentadas algumas hipóteses de trabalho futuro, bem como um breve “Resumo” do conjunto dos estudos experimentais realizados.

O terceiro capítulo engloba a “Bibliografia” que serviu de apoio a este trabalho.

2- INTERFACE BIOMATERIAL-TECIDO ÓSSEO: considerações gerais.

A eficácia e velocidade do processo de osteointegração de um material de enxerto ósseo estão muito dependentes das características e propriedades da sua superfície. A importância, cada vez mais evidente, da interface biomaterial/meio resultou no desenvolvimento e optimização de uma grande variedade de metodologias de tratamento e controlo das características de superfície, as quais fomentaram o aparecimento de materiais ditos bioactivos em substituição dos materiais bioinertes. Sabe-se actualmente que parâmetros como a composição química, a energia e a topografia de superfície são críticos nos processos de adesão e diferenciação das células osteoprogenitoras, podendo determinar uma rápida e eficaz aposição de tecido ósseo.

A influência das características de superfície de um biomaterial manifesta-se muito precocemente e tem uma importância crucial na evolução da resposta osteoblástica. Com efeito, as características de superfície dos diferentes materiais vão determinar o tipo de moléculas proteicas (natureza, quantidade e conformação) que serão adsorvidas à sua superfície. Esta “película” proteica irá mediar a interacção entre o material implantado e as células. De facto, são muitas vezes estas proteínas que irão modular a resposta inicial dos tecidos ao biomaterial em questão.

Está hoje em expansão o fabrico de uma nova geração de biomateriais com uma nanotopografia estrategicamente pensada e desenhada, de forma a estimular e modular a resposta celular e molecular no sentido pretendido. Muitos destes biomateriais *high-tech* pretendem activar processos celulares de osteoindução apenas com base nas propriedades físico-químicas da sua superfície, sem necessidade de recurso a técnicas de imobilização de moléculas bioactivas.

A interacção entre a superfície dos biomateriais, as proteínas, as células e os tecidos, particularmente a sua importância na fase inicial dos processos de osteointegração, não está ainda totalmente esclarecida. Esta interacção é de particular interesse na compreensão dos processos de osteointegração ocorridos, por exemplo, na medicina dentária (Periodontologia, Implantologia e Cirurgia Oral). Apesar da existência de muitos materiais já comercialmente disponíveis no mercado, o seu controlo e manipulação tem-se processado de uma forma empírica necessitando de uma validação mais rigorosa. Neste âmbito, muitos dos testes realizados *in vitro* e *in vivo* não se encontram ainda estandardizados, o que reflecte a dificuldade em organizar sistemas onde seja possível controlar um tão vasto número de variáveis.

Acresce-se ainda o recurso a diferentes superfícies, diferentes populações celulares e diferentes modelos animais, pelo que os seus resultados são difíceis de comparar e interpretar.

O futuro dos biomateriais de substituição óssea e da implantologia terá de passar obrigatoriamente pelo desenvolvimento e optimização de superfícies, com uma micro, sub-micro e nanotopografia controlada e estandardizada. Considerando toda esta problemática, pareceu-nos vantajoso proceder a uma descrição sucinta dos principais aspectos relacionados com a interface biomaterial/meio, dando particular ênfase aos mecanismos biológicos mais marcantes, a nível molecular e celular, bem como ao comportamento das superfícies nanoestruturadas.

2.1- COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Apesar de “bio” fazer parte do nome de quase todos os biomateriais de substituição óssea, na realidade estes materiais têm pouca (senão mesmo nenhuma) vitalidade, sendo a sua performance determinada maioritariamente pelas suas propriedades físico-químicas⁹. Atendendo aos recentes avanços no conhecimento da interface biomaterial-osso tem-se vindo a atribuir uma crescente relevância às características físicas dos materiais, levando a uma aparente desvalorização da composição química.

Porém, a composição química é uma das características do substrato que tem tido, até agora, uma grande influência nos processos de adesão e proliferação celulares. Neste âmbito, os fosfatos de cálcio têm sido considerados materiais de eleição no campo da substituição óssea devido à sua semelhança com a matriz mineral do tecido ósseo. De facto, esta matriz é formada por cristais à base de hidroxiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Estes cristais possuem uma estrutura cristalina hexagonal com dimensões na escala nanométrica: 30-50 nm (comprimento), 15-30 (largura), 2-10 nm (espessura) encontrando-se organizados segundo uma hierarquia bem definida^{10, 11}.

Na realidade, a composição química da hidroxiapatite biológica, ainda que variável ao longo da vida, difere da fórmula estequiométrica atrás referida. Trata-se de uma apatite deficiente em cálcio sendo geralmente enriquecida com outros iões, nomeadamente iões carbonato (CO_3^{2-}), que podem representar 3-8% da fase mineral da matriz óssea¹². A incorporação de outros elementos (Si, Mg, F, Cl) é também frequente.

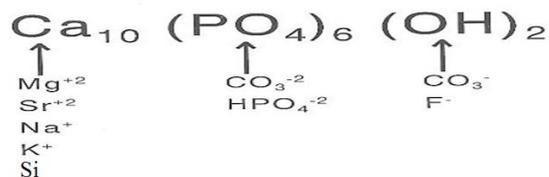


Fig. 1- Representação da fórmula química da hidroxiapatite biológica presente no tecido ósseo. Nesta hidroxiapatite podem ocorrer substituições do cálcio, fosfato e grupos hidróxilo por outros iões. Adaptado de¹³

Os efeitos dos substituintes podem, no entanto, ser contrários: enquanto a presença de carbonato ou silício causam um aumento na velocidade de degradação da hidroxiapatite, o flúor causa um efeito oposto. A incorporação de flúor na superfície de hidroxiapatite altera também a adesão e orientação de proteínas de ligação ao cálcio e a adesão celular¹⁴.

Em relação ao silício (Si) foram publicados recentemente alguns estudos que gostaríamos de referir com um pouco mais de pormenor. Este ião é o terceiro elemento residual no organismo. A sua presença é necessária tanto para um tecido ósseo saudável como para o tecido conjuntivo, possuindo um efeito directo no processo fisiológico do sistema osteoarticular. Acredita-se que a inclusão deste elemento químico na apatite melhora a sua bioactividade, tendo sido já demonstrado, *in vivo*, que a sua inclusão tem uma influência significativa na taxa e padrão de formação óssea^{11 15}.

Investigadores como Gao e colaboradores (2001) e Xynos e colaboradores (2001) confirmaram o papel do silício na promoção e indução óssea^{16 17}. Foi também já demonstrada a regulação de vários genes expressos pelos osteoblastos (incluindo o gene da BMP-2) aquando da sua exposição ao Si libertado de forma controlada. Reffit e colaboradores (2003), utilizando ácido ortosilícico em concentrações fisiológicas (5-20µM) assinalaram um aumento na síntese de colagénio tipo I em paralelo com um maior estímulo da diferenciação dos osteoblastos¹⁸.

Também Hing e colaboradores (2006) encontraram um efeito semelhante do Si na actividade das células envolvidas na formação e reabsorção ósseas¹⁹. Parece pois, que a inclusão de Si na estrutura cristalina da hidroxiapatite (HA) contribui para um desempenho biológico superior do que os seus homólogos estequiométricos. A inserção de Si aumenta a solubilidade do biomaterial, gerando uma superfície mais electronegativa e criando uma microestrutura melhorada. A presença de Si na

superfície de um biomaterial, bem como a sua libertação para o meio extracelular, parece induzir efeitos estimulantes adicionais, dose-dependentes, nas células ósseas e cartilagíneas²⁰. Estudos clínicos desenvolvidos a nível nacional, utilizando um material sintético (Bonelike®), demonstraram que a adição de Si à HA se traduz num aumento da sua bioactividade^{21, 22}.

Assim, pode afirmar-se que o Si modifica as propriedades dos biomateriais e afecta de forma directa os processos fisiológicos do tecido esquelético.

Ao longo da vida, a ocorrência de substituições na HA natural vai diminuindo e a sua estrutura vai-se aproximando cada vez mais da sua forma estequiométrica, ficando cada vez mais cristalina²³. Devido a esta alteração da cristalinidade da HA a remodelação do tecido ósseo não se processa à mesma velocidade ao longo da vida²⁴.

De um modo geral, pode afirmar-se que um menor grau de cristalinidade está associado a uma maior velocidade de degradação e, em consequência, a uma maior actividade de remodelação óssea.

A optimização de materiais com uma velocidade de degradação adequada impõe e justifica a tentativa de utilização de fosfatos de cálcio com diferentes composições e, conseqüentemente, distintas velocidades de degradação, nomeadamente variando as proporções entre cálcio e fósforo (Ca/P). Efectivamente, são já muitos os estudos^{4, 25-31} demonstram que a degradabilidade dos fosfatos de cálcio diminui à medida que a relação Ca/P aumenta. Deste modo, é de esperar que o fosfato di-cálcico (DCP; Ca/P=1) se degrade mais depressa do que o fosfato tri-cálcico (TCP; Ca/P=1,5), que a hidroxiapatite (HA; Ca/P=1.67) ou que o fosfato tetra-cálcico (Ca/P=2).

Por outro lado e de acordo com os efeitos anteriormente referidos no parágrafo precedente, podem também ser utilizados fosfatos de cálcio com diferentes graus de cristalinidade. Assim, uma hidroxiapatite amorfa apresenta uma maior degradabilidade do que uma hidroxiapatite cristalina, termodinamicamente mais estável^{23, 32}. A influência da estrutura do mineral é também observada na degradabilidade do fosfato tri-cálcio (TCP), sendo os cristais de estrutura romboédrica (beta-TCP) mais estáveis do que os monoclinicos (alfa-TCP).

Assim sendo, e fazendo uma análise que combina as diferentes composições e estruturas de alguns fosfatos de cálcio, obtém-se a seguinte ordenação relativamente à sua velocidade de degradação: HA amorfa > alfa-TCP (monoclínica) >

beta-TCP (romboédrica) > HA cristalina (hexagonal). A combinação de beta-TCP e HA (com diferentes proporções) constitui a variante bifásica mais estudada.

Quando consideramos materiais com composição química diversa, como sejam as biocerâmicas e os metais, encontramos diferenças no seu envolvimento com o meio. As biocerâmicas demonstraram um melhor desempenho do que os metais^{27, 33, 34}. Sabe-se que muitas cerâmicas estimulam a adsorção inicial de determinadas proteínas (p.ex. fibronectina e vitronectina) e, desta forma, promovem os fenómenos que conduzem à osteocondutividade e osteointegração³⁵.

Também o processo de adesão celular difere entre a HA e o titânio, sendo a adesão de osteoblastos à hidroxiapatite bastante maior quando comparada com o titânio^{36, 37}.

Por outro lado Di Silvio e colaboradores (2001), estudando um composto com proporções distintas de hidroxiapatite/polietileno (HA/PE) demonstraram que um aumento na proporção de HA conduzia a um aumento da adesão, da proliferação e da expressão de marcadores osteogénicos³⁸.

Ainda em relação à HA e apesar de haver alguma discordância quanto à sua capacidade osteoindutiva, a maioria dos investigadores acredita que este material é, pelo menos, osteocondutor. Com efeito, autores como Dalby³⁹ e Di Silvio³⁸ demonstraram que a presença de HA aumenta a proliferação e diferenciação de osteoblastos. Estes autores consideram que a hidroxiapatite actua como ponto de apoio (*stepping stone*) ao estabelecimento de contactos focais que potenciam a adesão dos osteoblastos. Por outro lado, diversos estudos⁴⁰⁻⁴⁴ demonstraram que a hidroxiapatite é integrada no organismo através de mecanismos idênticos aos envolvidos na remodelação óssea, exibindo assim um comportamento bioactivo. Embora os mecanismos precisos da sua interacção biológica com o meio não sejam ainda totalmente conhecidos, é, no entanto, reconhecida a influência de alguns factores nos processos envolvidos na osteointegração da hidroxiapatite, nomeadamente a sua composição química e características estruturais.

A biodegradação de um material está igualmente muito condicionado pela sua composição química estando já publicados alguns estudos *in vivo*^{45, 46}, e mais particularmente *in vitro*^{9, 47-51}, sobre a degradação dos fosfatos de cálcio.

O ambiente ácido causado, ou não, pela actividade celular provoca a dissolução parcial do fosfato de cálcio (CaP). Os iões Ca^{2-} e PO_4^{2-} libertados para o meio devido à dissolução da HA aumentam a já existente supersaturação dos fluidos

biológicos (contendo electrólitos e proteínas). Esta supersaturação leva à precipitação de uma apatite carbonatada, semelhante à do tecido ósseo. Esta apatite carbonatada, que se forma na superfície dos biomateriais à base de CaP, facilita a adesão de proteínas do meio, levando a uma maior adesão, proliferação e diferenciação por parte das células osteogénicas, que deste modo reconhecem um ambiente biologicamente mais natural. Posteriormente ocorrerá certamente com mais facilidade a produção de uma matriz extracelular biomineralizada (Fig 2). Esta camada de apatite carbonatada (que irá facilitar a adsorção proteica e posterior adesão celular) pode representar uma capacidade osteopromotora “intrínseca” do biomaterial ⁴.

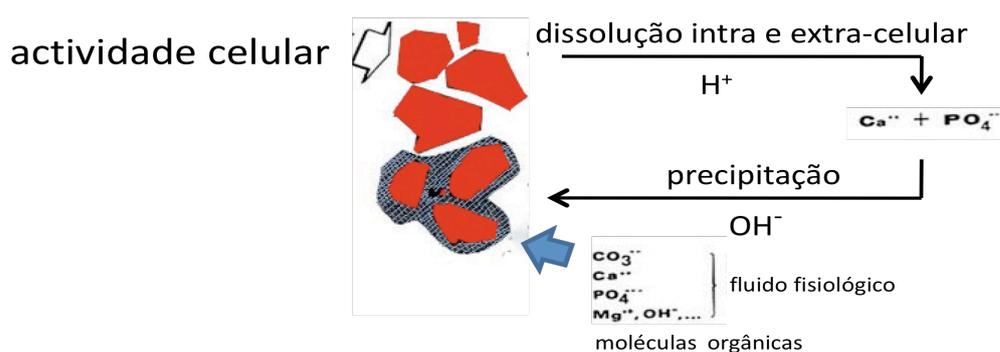


Fig 2: Representação esquemática do processo de dissolução/precipitação do fosfato de cálcio, envolvido na formação de uma apatite carbonatada na superfície de um biomaterial à base de CaP, *in vivo*. Adaptado de ⁴.

Em síntese, a composição química de um biomaterial à base de fosfato de cálcio ditará a sua biodegradação e posterior formação de uma apatite carbonatada na sua superfície. Esta camada de apatite carbonatada exerce uma importante actividade osteocondutora podendo contribuir melhor performance biológica do biomaterial⁴.

2.2- ENERGIA DE SUPERFÍCIE / MOLHABILIDADE

A molhabilidade de uma superfície constitui uma das propriedades utilizadas para caracterizar a interacção dos materiais com o meio envolvente e representa a sua capacidade em manter contacto com um líquido. Habitualmente, a molhabilidade é avaliada pelo ângulo de contacto entre uma gota de água e a superfície em estudo, derivando destes ensaios a sua classificação em superfície hidrofílica ou superfície hidrofóbica. O baixo ângulo de contacto (inferior a 90°) observado numa superfície hidrofílica reflecte o facto da gota se espalhar sobre esta (Fig 3a), ao passo que

adopta uma conformação mais esférica sobre uma superfície hidrofóbica, definindo um ângulo de contacto elevado (tipicamente superior a 90° ; Fig 3b). Saliente-se que é indiferente fazer referência ao ângulo de contacto ou à energia de superfície, tendo em atenção que são inversamente proporcionais. Com efeito, a energia de superfície é definida a partir do balanço das forças exercidas entre o líquido e a superfície e o ângulo de contacto faz parte dessa mesma equação. Resumindo, uma superfície hidrofílica é caracterizada por um pequeno ângulo de contacto (Fig. 3 a)), a que corresponde um elevado valor da energia de superfície. Ao invés, uma superfície hidrofóbica (Fig. 3 b)) é caracterizada por um elevado ângulo de contacto, traduzindo uma baixa energia de superfície.

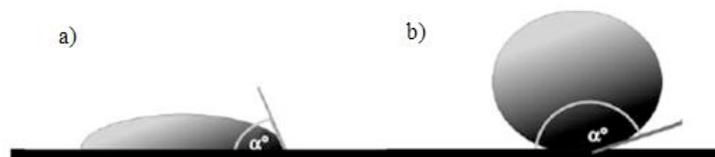


Fig. 3. Esquema representativo de dois tipos diferentes de molhabilidade de superfície: a) hidrofílica, b) hidrofóbica Adaptado de ⁵²

Numa fase inicial da interacção biomaterial/meio, quando o organismo interage com a superfície do biomaterial, a energia de superfície possui um papel essencial (ditada pela topografia e composição química do biomaterial), na determinação do tipo e conformação das proteínas adsorvidas à sua superfície ^{53, 54}. Este processo irá influenciar posteriormente os mecanismos de adesão e migração celulares. Saliente-se ainda que a energia de superfície de um biomaterial pode ser manipulada de modo a modular as suas interacções com as células⁵⁵.

Habitualmente, a quantidade de proteínas adsorvidas é maior nas superfícies hidrofóbicas do que nas hidrofílicas. Uma vez que as proteínas são moléculas com carga, a sua maior concentração/disponibilidade à superfície dos biomateriais contribui para alterar a sua energia de superfície. A adesão e migração celulares, por sua vez, são mais eficientes em superfícies hidrofílicas ^{56, 57}.

De um modo geral, a energia de superfície é proporcional à força de adesão celular. No entanto, deve salientar-se que a adesão celular é também afectada pelos

grupos funcionais (composição, polaridade e densidade) presentes à superfície do material, assim como pelo próprio tipo de células em questão.

A relevância destas propriedades de superfície nos sistemas biológicos pode ser demonstrada em diversas situações experimentais, como a seguir se exemplifica.

A albumina é uma proteína cuja concentração no soro é 100 a 1000 vezes superior à da fibronectina ou da vitronectina. Tendo em conta esta proporcionalidade, é expectável que esta proteína adira preferencialmente às superfícies dos biomateriais, relativamente a outras, nomeadamente fibronectina ou vitronectina, que têm maior importância na adesão celular⁵⁸. Verifica-se que, se a superfície do biomaterial apresentar uma predominância de grupos hidrofóbicos, a albumina liga-se de forma praticamente irreversível, não sendo substituída por outras proteínas, exercendo desta forma, um bloqueio à adesão celular. Pelo contrário, em superfícies hidrofílicas, ocorre um maior intercâmbio entre a albumina adsorvida e as outras proteínas^{58, 59}. Assim sendo, características hidrofóbicas ou hidrofílicas podem afectar de forma diferente os processos de adesão celular, sendo estes, como já foi referido, geralmente maiores nas superfícies hidrofílicas⁶⁰.

No mesmo sentido, os trabalhos de Buser e colaboradores (2004) e Zhao e colaboradores (2005) concluíram que, tendo em conta as suas interações com os fluidos biológicos, células e tecidos, as superfícies hidrofílicas são mais favoráveis do que as hidrofóbicas^{56, 57, 58}. Estes investigadores constataram, *in vitro*, que uma superfície hidrofílica apresentava uma maior área de contacto entre tecido ósseo e implante. No entanto, Wennerberg e colaboradores (1991), num estudo *in vivo*, não conseguiram demonstrar em implantes dentários uma osteointegração superior, utilizando superfícies hidrofílicas^{61, 62}.

Quando a dimensão das partículas é reduzida a uma nanoescala ocorre a alteração de diversas propriedades do material, incluindo as da sua superfície¹⁰. Destaca-se o facto das nanopartículas possuírem uma maior área de superfície por unidade de volume, bem como uma distribuição superficial de electrões alterada. Na nanodimensão, as propriedades físicas, químicas e biológicas dos biomateriais diferem de forma fundamental e significativa das propriedades da matéria em maior escala^{63, 64}. Muitos materiais, como já foi referido, deixam de ser inertes quando considerados nesta dimensão, passando a apresentar uma muito maior reactividade. Com efeito, materiais nano, comparativamente a materiais convencionais, possuem uma maior percentagem de átomos na sua superfície (Fig 4)., bem como uma maior

área de superfície. Este facto vai determinar a quantidade de proteínas adsorvidas e a subsequente adesão celular.

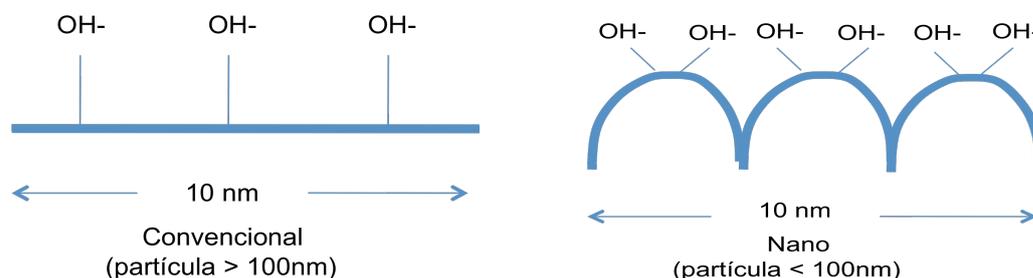


Fig 4. Grupos hidroxilo expostos em materiais convencionais e em materiais nano. Comparativamente com os materiais convencionais, os nanomateriais possuem uma percentagem superior de átomos na sua superfície, uma maior área de superfície e uma diferente distribuição electrónica. Adaptado de ⁶⁵.

Foram já efectuados vários trabalhos que visaram correlacionar a nanodimensão das partículas e a sua molhabilidade. Webster e colaboradores (1999), utilizando partículas de alumina com dimensões desde 167 a 24 nm, estudaram os ângulos de contacto que a água formava na superfície deste material ⁶⁶. Verificaram, então, que nas partículas de menores dimensões estes ângulos eram três vezes menores (quanto menor for este ângulo, maior a molhabilidade). Estes autores constataram, ainda, que a adesão de vitronectina era superior nas nanocerâmicas com maior molhabilidade⁶⁷. O mesmo grupo de investigação, recorrendo à utilização de osteoblastos, observou que estas células depositavam mais fosfato de cálcio em superfícies metálicas hidrofílicas, criadas através do uso de nanopartículas ⁶⁸. Assim, concluiu que a dimensão das partículas que constituem um biomaterial influencia a sua energia de superfície. Entre materiais com a mesma composição, os que se apresentam constituídos por partículas mais pequenas possuem uma maior energia de superfície relativamente aos constituídos por partículas maiores ⁵⁴.

Do mesmo modo Kay e colaboradores (2001) demonstraram que nanopartículas de titânio (<100nm) embebidas em PLGA (Ácido Poliglicólico) apresentavam uma maior adesão de osteoblastos quando comparada com partículas convencionais de titânio (>100nm) igualmente embebidas em PGLA ⁶⁹. As

nanopartículas (embebidas em PGLA) eram mais hidrofílicas do que as outras, conforme o esperado.

Um estudo mais recente⁷⁰, levado a cabo com células da linha osteoblástica, refere que tanto os osteoblastos como as células osteoprogenitoras respondem mais favoravelmente a superfícies hidrofílicas (com uma maior adesão celular e síntese de matriz) do que a superfícies hidrofóbicas.

Por outro lado, trabalhos experimentais com osteoblastos, provenientes da calote de rato, demonstraram que a sua morfologia era diferente se cultivadas num polímero com carga positiva ou negativa⁷¹. Neste trabalho, as células, quando colocadas sobre uma superfície com carga positiva, ficavam num contacto tão próximo com o substrato que apenas era possível distinguir a sua membrana celular através da utilização de um microscópio electrónico de transmissão. Numa superfície com carga negativa a membrana celular era muito mais visível e apenas se observavam escassos contactos focais. Neste caso, as forças de atracção entre os osteoblastos e as superfícies de carga negativa foram inferiores às verificadas quando em presença de carga positiva.

Num estudo desenvolvido por Healy e colaboradores (1996), aplicando células ósseas sobre materiais com energias padronizadas, verificou-se que em menos de trinta minutos, as células migravam especificamente para regiões com carga positiva, começando a alinhar-se e a espalhar-se exclusivamente nestas zonas⁷². Só quando deixou de haver área disponível é que as células começaram a estender-se das zonas com carga positiva para as zonas com carga negativa.

Uma nota final para referir que apesar de vários investigadores^{56, 73} sublinharem o papel da energia de superfície na interface biomaterial/meio, outros HA⁷⁴ que lhe retiram importância neste processo. Assim, de acordo com alguns destes trabalhos, a adsorção de proteínas à superfície de ligas metálicas parece estar mais dependente da sua composição química do que das alterações da sua energia de superfície⁷⁴. Da mesma forma Schweikl e colaboradores (2007) consideram que a proliferação celular na superfície de diferentes materiais depende mais da respectiva composição química do que da energia de superfície⁷⁰.

É importante recordar, no entanto, que em estudos de comportamento celular torna-se, por vezes, difícil discriminar os efeitos da energia de superfície dos efeitos atribuídos às restantes propriedades de superfície.

Em síntese, apesar de demonstrada a influência da molhabilidade nas interações biomaterial-célula (sendo vulgarmente utilizada para caracterizar e comparar as superfícies dos diferentes biomateriais), correlações conclusivas entre a molhabilidade, a adsorção proteica e a função celular não se encontram ainda suficientemente esclarecidas e confirmadas⁷⁵⁻⁷⁹.

2.3- ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS

O termo interface descreve a região de interação entre o biomaterial e o meio em que é colocado. Neste contexto, temos a considerar a “face biológica” desta interface, constituída pelos fluidos biológicos, que aderem ao biomaterial assim que ele é colocado, e a “face material” propriamente dita. A “face biológica” é de longe bem mais dinâmica, constituindo o principal objectivo desta descrição.

A colocação de qualquer material de substituição óssea num defeito ósseo, ou num meio de cultura, leva ao seu imediato envolvimento e revestimento por uma camada de proteínas (componentes do plasma sanguíneo, da medula óssea ou do soro) que ficam adsorvidas à sua superfície e que irão permitir e facilitar a adesão celular. Com efeito, como afirmaram Boyan e colaboradores (1996) “*cells do not interact with a naked material*”⁵³. Por outro lado, quer *in vitro* quer *in vivo*, as células nunca conseguirão “ver” a face original do material, encontrando já a sua superfície revestida por proteínas⁸⁰. As características de superfície dos diferentes materiais vão determinar o tipo de moléculas proteicas (natureza, quantidade e conformação) que serão adsorvidas. Esta “película” proteica irá mediar a interação entre o material implantado e as células. De facto, são estas proteínas que irão determinar a expressão de diferentes integrinas nas células presentes no microambiente, em redor do material e, assim, modular a resposta inicial dos tecidos ao biomaterial em questão.

A primeira fase, de adsorção de proteínas, regula uma segunda fase caracterizada pelos processos de adesão celular, condicionando esta, por sua vez, os mecanismos de migração, proliferação e diferenciação celulares subsequentes. A adesão celular requer, uma estreita interação entre o substrato, a célula e o seu citoesqueleto ocupando as integrinas um papel pivô na mediação deste sistema de coordenação e integração⁸⁰⁻⁸² (Fig. 5).

As integrinas são moléculas de adesão localizadas na membrana celular (proteínas transmembranares), necessárias para que as células se fixem à matriz/substrato e que regulam a passagem de informação do substrato para o interior da célula, bem como das células para o meio exterior. Através desta actividade, as integrinas exercem um papel essencial no controlo dos processos de adesão, migração, diferenciação e até apoptose das células, regulando a interacção entre os biomateriais implantados e as células e tecidos circundantes⁸³. De facto, as integrinas, quando estimuladas pela ligação à matriz/substrato, actuam como transdutores de sinais activando várias vias de sinalização intracelular, que conduzem frequentemente a mudanças na expressão génica condicionando assim o destino e comportamento celulares⁸⁴.

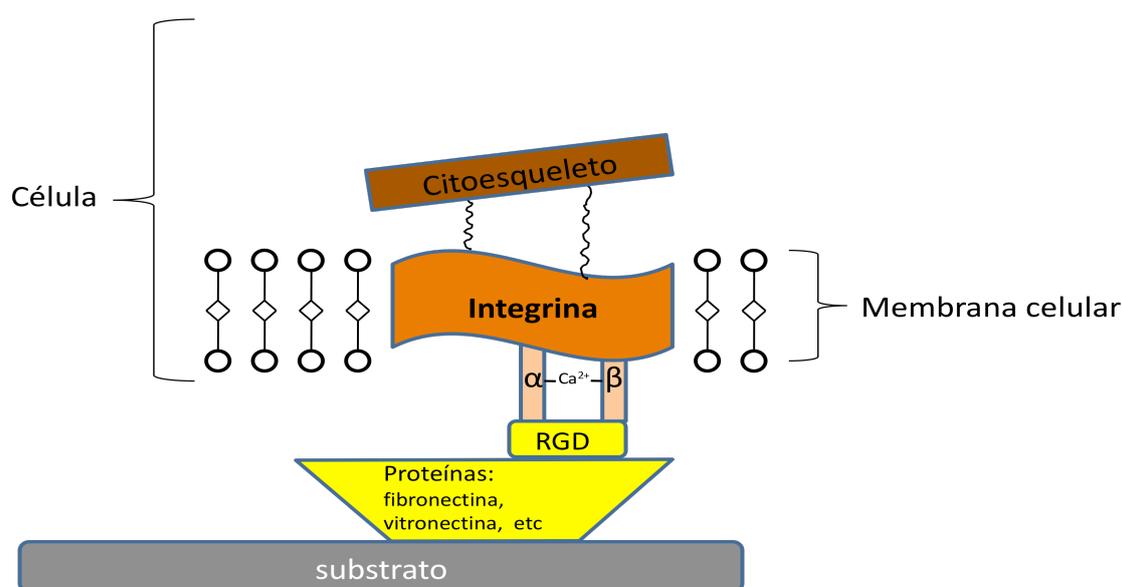


Fig 5 Esquema representativo do papel das integrinas mediando as interações entre a matriz extracelular (substrato revestido por proteínas com sequências RGDs) e o citoesqueleto celular. Adaptado de⁸⁴

Está hoje bem estabelecido que as proteínas séricas têm um importante papel nesta fase precoce de adesão. O soro é maioritariamente composto por albumina sérica e outras proteínas como a fibronectina e a vitronectina, que respondem de forma diferente em função da composição e estrutura de superfície do biomaterial. A fibronectina adere quase instantaneamente a uma grande variedade de biomateriais⁸² e, devido ao facto de possuir uma sequência de aminoácidos de adesão, arginina-glicina-ácido aspártico, vulgarmente conhecida por RGD, tem uma grande afinidade para processos de ligação e adesão celular. Com efeito, esta sequência actua como um receptor celular tendo grandes responsabilidades quimiotáticas e de adesão para

as células ósseas. Os osteoblastos humanos aderem facilmente à fibronectina, à vitronectina e à laminina, todas proteínas contendo RGDs^{80, 85}. A sequência RGD pode, no entanto, adotar várias conformações em diferentes proteínas. Esta flexibilidade conformacional pode estar na base da especificidade de ligação a diferentes integrinas, justificando diferentes destinos de diferenciação celular. Os biomateriais, mesmo os mais convencionais, se, antes da sua colocação no meio, forem sujeitos a uma adsorção prévia com oligopeptídeos de adesão celular, como RGDs, péptidos derivados da laminina (IKVAV), ou sequências presentes no colagénio I (P15⁸⁶), podem potencializar, em muito, a sua eficácia. Este aspecto pode ser ainda potenciado com recurso às nanotecnologias. Com efeito, estudos desenvolvidos com biomateriais cerâmicos revestidos por vitronectina mas fabricados à nanoescala¹⁰, demonstraram uma muito maior exposição de RGDs à sua superfície e, portanto uma capacidade reforçada de adesão e interação celulares

A fig 6 faz uma sinopse das fases de adsorção de moléculas à superfície de um biomaterial e dos fenómenos de união e adesão celulares. Este processo tem um início muito rápido, logo (segundos) após a colocação do material, ocorrendo uma adsorção inicial de proteínas inespecíficas de baixo peso molecular. Posteriormente (minutos) têm lugar os mecanismos de união com estabelecimento de pontos de ancoragem mediados por proteínas com maior peso molecular e maior afinidade para o substrato, como sejam a fibronectina e a vitronectina, todas proteínas com RGDs. A fase de adesão, da responsabilidade das integrinas, tem lugar um pouco mais tarde (horas) e envolve três tipos de proteínas localizadas a diferentes níveis: a) proteínas extracelulares (adsorvidas à superfície do biomaterial), b) integrinas (presentes na membrana celular) e c) proteínas do citoesqueleto (citoplasmáticas). As integrinas estabelecem uma transdução de forças citomecânicas do exterior para o interior da célula, o “*outside-in signaling*”. Posteriormente (dias-semanas) começam, então, a observar-se os fenómenos de migração, proliferação e diferenciação celular⁸⁰.

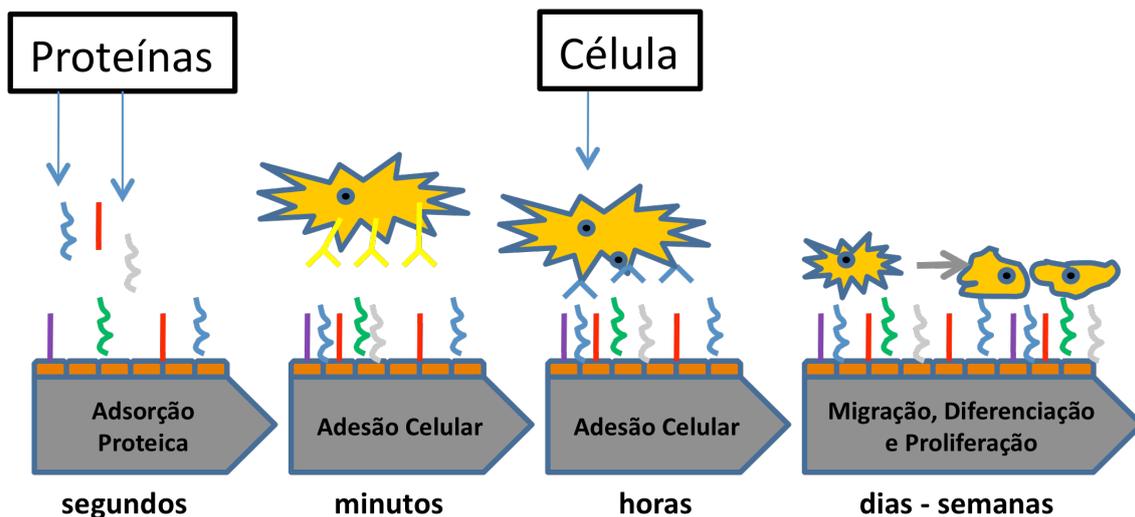


Fig. 6- Sequência de interacção proteica e celular com o biomaterial Adaptado de ⁸⁰.

É incontornável a importância desta fase acelular de adsorção proteica, actuando como um agente de atracção para a migração das células osteoprogenitoras para o local. Porém, esta adsorção de proteínas está condicionada pelas características físico-químicas do biomaterial, sendo determinante para a posterior modulação da resposta celular e dos processos de osteointegração^{10, 55}. De facto, a interacção células-biomateriais está muito ligada à natureza das proteínas previamente adsorvidas à superfície destes biomateriais estando estas, por sua vez e como já foi referido, dependentes da natureza química, física e estrutural da sua superfície.

Dependendo da composição química dos biomateriais os osteoblastos podem expressar diferentes sub-unidades de integrinas. As mesmas linhas osteoblásticas, se forem cultivadas numa liga de titânio, expressam sub-unidades de integrinas ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$, αv , $\beta 1$ e $\beta 3$) diferentes das cultivadas numa liga de crómio-cobalto-molibdénio (Cr-Co-Mo)⁸⁷. Este facto demonstra a influência da composição química na expressão de integrinas e o seu efeito no processo de adesão e proliferação celulares.

Comparando a performance biológica do titânio e da hidroxiapatite foram também efectuados vários estudos que demonstraram que o Ti e HA adsorvem selectivamente as mesmas proteínas do soro ⁸⁸. No entanto, a quantidade de proteínas adsorvidas difere entre ambos, com uma maior adsorção de albumina e proteínas séricas à HA do que ao titânio^{36, 89}. De facto, esta diferença na adsorção proteica deverá corresponder a uma maior quantidade de integrinas expressas pelas células e, logicamente, uma superior adesão celular.

Uma pequena nota para sublinhar a influência da macro e micro e nanotextura de superfície de um biomaterial. As características macro estão mais relacionadas com o stress biomecânico, enquanto as características micro e nano afectam mais directamente a interface biomaterial-moléculas-células permitindo uma mais perfeita interpretação e previsão das reacções celulares⁹⁰.

Neste âmbito, é cada vez maior a preocupação e necessidade de um profundo conhecimento e análise das características de superfície. Com efeito, a relevância dos estudos do comportamento biológico das células ósseas, baseados apenas na macroestrutura de superfície dos biomateriais é actualmente bastante questionável, uma vez que as estruturas celulares (membrana celular, membrana basal e citoesqueleto) e moléculas envolvidas nos processos de adesão celular têm uma dimensão muito pequena, estando ao nível de uma escala nanométrica.

O investimento nas nanotecnologias aplicadas aos materiais (e o melhor conhecimento das reacções celulares e moleculares envolvidas a este nível) é cada vez mais importante. Os materiais “nano” (quando comparados com os convencionais) apresentam uma maior área de superfície/unidade de volume. Este aspecto modifica de uma forma fundamental e significativa as suas propriedades biológicas, interagindo de modo muito mais eficaz com as proteínas do meio^{63, 91}. Com efeito, alguns biomateriais passam de inertes para bioactivos quando “manipulados” a uma escala nanométrica.

Em síntese, as características dos diferentes substratos podem influenciar desde cedo a adsorção de diferentes proteínas e a expressão de diferentes integrinas e, deste modo, as subseqüentes respostas celulares. A natureza, quantidade e conformação das proteínas adsorvidas podem condicionar a actividade celular à sua superfície. É, pois, grande a importância que se atribui ao revestimento dos biomateriais de substituição óssea, tendo havido um grande investimento nas estratégias de imobilização de certos componentes bioactivos, de natureza proteica (p.ex., RGDs, IKVAV e P15), de modo a controlar e direccionar a migração e adesão celulares, visando a optimização da performance biológica destes biomateriais. Porém, mais recentemente, estão a ser publicados alguns estudos^{68, 92, 93} que demonstram que a adesão das células osteoprogenitoras e osteoblásticas à superfície de um biomaterial, pode ser estimulada/induzida com base na utilização de partículas nanométricas, ou que possuam uma nanorrugosidade de superfície. Estas metodologias poderão dispensar a necessidade de recurso a complexas técnicas de funcionalização (referidas no parágrafo anterior), por imobilização de compostos à sua

superfície Esta mais valia parece ser tão grande que se afirma, por si só, sendo independente da constituição química do material em questão, podendo determinar processos selectivos de adesão celular, quer directamente, quer indirectamente através da adsorção de proteínas específicas^{55, 94}.

2.4- RUGOSIDADE DE SUPERFÍCIE

A influência das características de superfície de um biomaterial manifesta-se muito precocemente e tem uma importância crucial na evolução da resposta osteoblástica.

Para um determinado tipo celular existe uma estrutura de superfície adequada. São já vários os investigadores que chegam a afirmar que as células têm a capacidade de “sentir” e reagir a certas nanoestruturas, independentemente da composição química do biomaterial em questão, ou das proteínas adsorvidas à sua superfície^{10, 55}.

Está actualmente demonstrado que a microtopografia e mais recentemente a nanotopografia de superfície induz a formação de projecções citoplasmáticas (filipódia) e o aparecimento de zonas de contacto e de adesão celular. De facto, numa superfície rugosa as células parecem formar numerosas adesões focais que lhes permitem ocupar os espaços entre os “picos” da superfície⁹⁵. O rearranjo dos elementos do citoesqueleto, particularmente filamentos de actina e miosina, resultantes destas adesões está normalmente associado a posteriores fenómenos de migração e diferenciação celular. Por outro lado, a forma e orientação de uma célula parece também determinar a sua sensibilidade aos agentes mitogénicos, bem como a sua resposta aos factores de crescimento e diferenciação presentes no meio.

Com efeito, esta capacidade das células explorarem e responderem ao microambiente em que se encontram pode condicionar a sua expressão génica e, deste modo, a sua funcionalidade⁹⁶. Testes de migração celular realizados com vários tipos de biomateriais demonstraram uma migração celular mais rápida em materiais que apresentam na sua superfície sulcos mais profundos⁹⁷. Por outro lado a microtextura de superfície a uma escala nano (<100 nm) induz uma melhor resposta osteoblástica (proliferação e diferenciação celulares) do que propriamente uma rugosidade a uma escala superior (>100nm), promovendo um melhor ambiente para o crescimento e desenvolvimento celular. As células respondem de forma diferente a uma diferente escala (micro, submicro e nano) de rugosidade⁵⁵.

Os materiais convencionais utilizados até hoje com o objectivo de promover os mecanismos de regeneração óssea, apresentam sempre uma rugosidade de superfície geralmente considerada a nível de uma escala micro sendo, no entanto, normalmente lisos quando considerados a uma escala nano. Assim estes materiais convencionais não conseguem apresentar uma superfície que seja *“biologically inspired”*.

A nanotecnologia envolve uma nova maneira de controlar ou manipular a matéria a uma escala molecular e atómica que pode alterar a interactividade da sua superfície e as respostas celulares, abrindo uma janela de oportunidades relativamente aos materiais aplicados em ortopedia e medicina dentária. A modificação da superfície de um biomaterial a uma escala nano poderá contribuir para mimetizar um ambiente molecular mais próximo do habitualmente encontrado pelas células, ou seja *“biologically inspired”*. A este propósito parece-nos pertinente lembrar que a matriz óssea é um biomaterial nanoestruturado, possuindo uma fase orgânica e uma fase mineral com dimensões nanométricas e que grande parte dos processos biológicos ocorrem a uma escala nano. De facto, os cristais de fosfato de cálcio (30-50 nm de comprimento, 15-30 nm de largura e 2-10 nm de espessura) e as moléculas de tropocolagénio, (300 nm de comprimento por 1,5 nm de espessura) são considerados, do ponto de vista estrutural e de composição, como nanomateriais ^{10, 11}. Assim, as células ósseas quando postas em contacto com nanomateriais (reconhecendo um ambiente biologicamente mais natural), interagem mais fácil e rapidamente. Superfícies nanomodificadas possuem propriedades únicas que alteram os processos de adesão celular de forma a criarem uma afinidade directa das células para certas nanocaracterísticas de superfície, promovendo uma precoce aposição de tecido ósseo ⁵⁵.

Estudos de Davies e colaboradores (1990) e de Martin e colaboradores (1995) sugerem, ainda, que a resposta celular a diferentes rugosidades de superfície depende do estado de maturação celular ^{98 99}. Este conceito não deixa de ser interessante e importante uma vez que as primeiras células que interagem com o biomaterial são muito provavelmente células mesenquimatosas relativamente indiferenciadas e não células já maduras. Sabe-se hoje que as células mais indiferenciadas da medula óssea (células osteoprogenitoras) são extremamente sensíveis e apresentam uma grande capacidade de resposta às características nanotopográficas dos materiais onde se encontram, desencadeando mais rapidamente processos de diferenciação osteoblástica, traduzidos pela expressão génica e síntese

de osteopontina e osteocalcina^{96, 100}. Ainda neste âmbito da diferenciação celular, Isa e colaboradores (2006), utilizando culturas de células mesenquimatosas provenientes do palato, encontraram uma muito maior expressão de Runx2 (factor de transcrição chave no processo de diferenciação dos osteoblastos) em superfície nanomodificadas¹⁰¹. Do mesmo modo Meireles e colaboradores (2007), utilizando neste caso células pré-osteoblásticas, demonstraram o aparecimento de tecido ósseo de forma mais precoce e em maior quantidade quando cultivadas em nanosuperfícies¹⁰².

A selectividade com que estes materiais promovem os fenómenos de adesão celular envolvendo células favoráveis (osteoblastos) e células não-favoráveis (fibroblastos) aos processos de osteogénese foi também alvo de estudos revelando resultados notáveis^{63, 103, 104}. De facto, em materiais nano a afinidade entre osteoblastos/fibroblastos era de 3:1. Foram também observados resultados semelhantes em relação a outras populações celulares, como os condrócitos e células musculares¹⁰⁵. Estes resultados têm particular relevância em implantes dentários, nomeadamente na interface implante/tecido ósseo e implante/mucosa oral. Por outro lado, verificou-se também nestas superfícies uma notável baixa de adesão e proliferação de bactérias, ainda que estes materiais mantenham a capacidade de promover a adesão e diferenciação dos osteoblastos. Esta actividade antibacteriana é de manifesta importância quando em presença de patologia infecciosa tal como situações de peri-implantites. Um aspecto interessante a considerar ainda foi a intensa actividade osteoclástica, observada à superfície destes biomateriais, sendo duas vezes maior na nanohidroxiapatite do que na hidroxiapatite convencional⁵⁵.

Da análise da literatura mais recente torna-se evidente a importância da nanotopografia no desencadear dos mecanismos de diferenciação osteoblástica e na estabilidade e osteointegração mais precoce deste tipo de materiais de substituição óssea (maior número de áreas de contacto/aposição entre material e tecido ósseo)⁵⁵. Porém, esta rápida resposta inicial não dispensa uma topografia favorável considerada a uma escala micro. Com efeito, a nanoestrutura de superfície de um implante, ainda que muito promissora no desencadear dos mecanismos de adesão celular, não parece, por si só, suficiente para assegurar, manter e apoiar uma osteointegração robusta, requerendo uma microrrugosidade que contribua e reforce o sucesso da sua bioactividade⁵⁵. As elevadas expectativas das nanotecnologias terão que ser talvez encaradas com uma certa moderação, tentando integrar vários níveis de influência, da micro à nanotopografia, que não se excluem entre si, devendo mesmo complementar-se e potencializar-se

Está já estabelecido que a micro-arquitectura de certas superfícies e sobretudo uma geometria de concavidade favorece a formação e diferenciação do tecido ósseo. De facto, parece perceptível pelos trabalhos de Habibovic e colaboradores (2004), Kaiser e colaboradores (2004) e de Navarro e colaboradores (2004) o aparecimento mais precoce de tecido ósseo em locais formados, maioritariamente, por superfícies concavas, em vez de superfícies planas ou convexas^{44 106 107}

Trabalhos do grupo de investigação de Ripamonti demonstraram que a osteoindutividade da hidroxiapatite estava relacionada com a presença de concavidades na sua superfície¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Recorrendo a estudos de imunolocalização estes autores demonstraram que esta osteoindutividade se deveria, sobretudo, à concentração de BMP-3 e BMP-7 nestas áreas geometricamente favoráveis.

A este respeito é impossível deixar de referir a conformação das lacunas de Howship, lacunas de reabsorção provocadas pelos osteoclastos nas superfícies ósseas. Estas concavidades, escavadas pelos osteoclastos, constituem locais estratégicos e privilegiados para a formação de matriz osteóide e sua posterior mineralização, associando estruturas com uma dimensão micro, sub-micro e nano que actuam em sinergia. A geometria conformacional, dimensão, composição, microarquitectura e ainda a nanoestrutura de superfície destas cavidades criam um microambiente propício que favorece o aparecimento de um fenótipo osteoblástico. Estas lacunas parecem favorecer, ou mesmo contribuir, para uma sequestração de iões e de factores de crescimento ou outras proteínas com efeitos osteoindutores, estimulando ao mesmo tempo o processo de angiogénese, pré-requisito essencial para a osteogénese^{44, 106}. Compreende-se facilmente que os osteoclastos, na sua actividade de reabsorção de matriz mineralizada (de origem natural ou sintética), para além do seu directo envolvimento na reparação de áreas ósseas danificadas e no equilíbrio homeostático do cálcio, estejam também e sobretudo a preparar estas superfícies e a criar condições para uma posterior e eficaz colonização pelas células da linha osteoblástica. Esta dinâmica osteoclástica está na base dos tão característicos processos de *creeping substitution* dos materiais de enxerto ósseo.

O *footprint* deixado pela actividade osteoclástica, terá uma micro, sub-micro e nanotopografia de excelência para a indução de um fenótipo osteoblástico. Esta marca estrutural na superfície óssea será sempre de considerar nos processos biomiméticos de fabricação de materiais de substituição óssea, seguindo, deste modo, os ensinamentos da natureza.

Está hoje em desenvolvimento o fabrico de uma nova geração de biomateriais com uma nanotopografia estrategicamente pensada e desenhada, de forma a

estimular e modular a resposta celular e molecular no sentido pretendido. As nanocaracterísticas de superfície parecem, como já foi descrito, sobrepôr-se à composição química do biomaterial, controlando, por si só, muitas das funções celulares,⁵⁵ reforçando a estreita correlação entre as características físicas da superfície e o respectivo desempenho biológico^{55, 111}. Deste modo, com recurso à nanotecnologia, mas tendo sempre em consideração a importância da microrrugosidade, parece ser possível promover as capacidades osteoindutoras intrínsecas da superfície de um biomaterial⁵⁵

Uma nota final para sublinhar que apesar das potenciais vantagens dos materiais nanomodificados ainda estamos muito no início da arte, sendo ainda desconhecida a influência das nanopartículas na saúde humana. As nanopartículas podem soltar-se da superfície dos implantes (desgaste, degradação, delaminação, corrosão) e contribuir para um aumento dos processos de toxicidade local e sistémica, com repercussões ainda difíceis de avaliar. É pois sempre necessária uma apreciação fundamentada e um cada vez maior entendimento das vantagens/desvantagens da nanotecnologia aplicada aos biomateriais de substituição óssea.

3- BIOLOGIA DO OSTEOCLASTO

A principal preocupação e atenção na colocação de um material de substituição óssea é quase sempre dirigida, para as células da linha osteogénica, maioritariamente envolvidas no processo de osteointegração. Contudo, os osteoclastos são, inúmeras vezes, as células ósseas que primeiro contactam com o biomaterial, sendo responsáveis pelos mecanismos de *creeping substitution* e determinando, muitas vezes, a estabilidade e sucesso clínico do biomaterial. O osteoclasto poderá ter, ainda, um papel importante na fase inicial da colocação de um biomaterial, na preparação da sua superfície para a adesão e actividade dos osteoblastos, da mesma forma que o faz durante o ciclo normal de remodelação óssea.

Porém, os osteoclastos são geralmente células com uma má “reputação” estando, quase sempre, associadas a desequilíbrios e situações patológicas⁷. Schilling et al (2006)⁷, num artigo muito original e interessante a propósito de osteoclastos e biomateriais, coloca a seguinte questão: “*Why does bone in contrast to all other tissues entertain a cell to destruct itself ?*”, respondendo logo a seguir que “*the reason may be that the osteoclast is not a true bone cell, but rather a highly specialized blood cell*”. A

este respeito referem ainda que, “bone resorption can be viewed as a fight between bone marrow and bone for the bone marrow space”. Assim, considerando toda esta problemática, pareceu-nos pertinente traçar algumas considerações sobre a biologia do osteoclasto.

Os osteoclastos são células altamente especializadas nos processos de reabsorção da matriz óssea através da secreção de hidrogeniões, responsáveis pela dissolução da fase mineral, e de enzimas proteolíticas, responsáveis pela degradação da fase orgânica. Para este fim desenvolveram uma eficaz e complexa maquinaria que lhe confere características e capacidades únicas.

Os osteoclastos são células grandes, podendo possuir um diâmetro até 100 µm, multinucleadas, podendo apresentar 30 ou mais núcleos, facilmente identificadas em cortes histológicos por se localizarem em concavidades ou lacunas (lacunas de Howship) nas superfícies ósseas (Fig. 7). De facto, despendem a maior parte da sua vida no processo de reabsorção (levado a cabo nas lacunas de Howship), sendo as fases pré e pós-reabsorção relativamente curtas ¹¹².

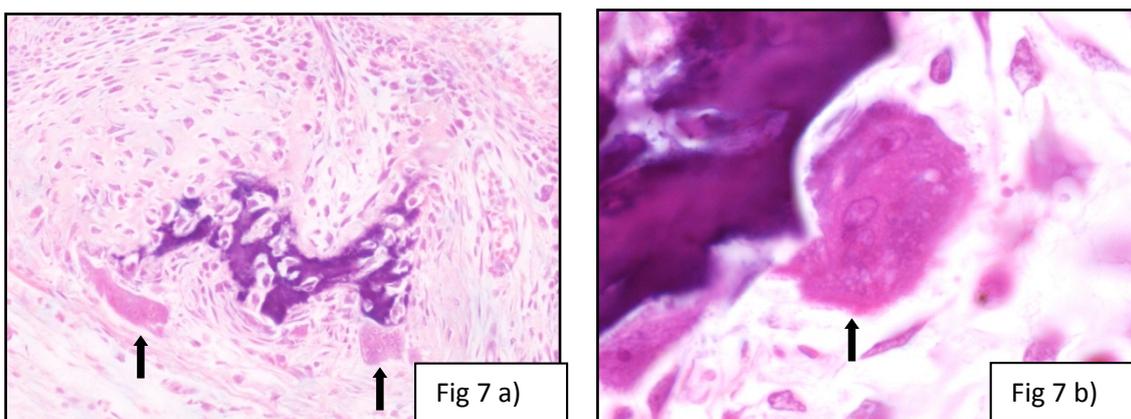


Fig 7 a) Aspecto histológico de osteoclastos (↑) à superfície de uma trabécula óssea. 200x no original.

b) Osteoclasto numa lacuna de Howship. 1000x no original. Coloração: H.E.

Os osteoclastos são membros da linha celular dos monócitos-macrófagos, podendo a sua diferenciação resultar de precursores mielóides (medula óssea – série hematopoética) mas também de células já bem diferenciadas. Com efeito, os osteoclastos partilham uma origem hematopoética comum com os monócitos presentes na medula óssea e na corrente sanguínea, mas também com as células dendríticas apresentadoras de antígenos, bem como com diferentes espécies de

macrófagos tissulares, como os macrófagos alveolares, as células de Kupffer do fígado ou as células da micróglia do tecido nervoso. Foi já demonstrada a possibilidade de formação de osteoclastos a partir de macrófagos alveolares bem diferenciados. Não é sabido, no entanto, se todos os monócitos circulantes são capazes de se diferenciarem na linha osteoclástica. Por outro lado, podemos afirmar que nem todas as células multinucleares com fenótipo da linha macrofágica são capazes de reabsorver matriz óssea. Enquanto a multinuclearidade é comum a outras células do tipo macrofágico, a reabsorção óssea é uma característica apenas dos osteoclastos maduros ¹¹².

3.1-Osteoclastogénese

O processo de formação e desenvolvimento dos osteoclastos engloba múltiplas etapas incluindo a fusão celular de precursores mononucleares. Para que possam levar a cabo o processo de diferenciação e maturação, os osteoclastos necessitam da presença de células osteoblásticas ou de células mesenquimatosas do estroma da medula óssea capazes de produzir factores de diferenciação e activação dos osteoclastos, que incluem, entre outros, o factor estimulador de colónias de macrófagos (*macrophage colony stimulating factor* – M-CSF). Consequentemente, as culturas celulares apropriadas ao desenvolvimento de osteoclastos têm de incluir obrigatoriamente, para além de células precursoras de osteoclastos, células da linha osteoblástica/células do estroma. De facto os osteoclastos apenas podem sofrer diferenciação e activação quando em co-cultura. Está hoje bem estabelecido que o contacto célula-a-célula entre osteoblastos/células do estroma e osteoclastos constitui um pré-requisito necessário e, até HA bem pouco tempo essencial, para a maturação e activação dos osteoclastos. Porém, trabalhos mais recentes ¹¹³ demonstraram que algumas citocinas inflamatórias e lipopolissacarídeos da parede bacteriana (Gram negativos) podem estar envolvidos na diferenciação terminal dos osteoclastos de uma forma independente dos osteoblastos: Tanto a Interleucina-1 (IL-1), Interleucina-6 (IL-6) como o factor de necrose tumoral α (*tumoral necrose factor* α - TNF- α) podem estimular directamente a osteoclastogénese. No entanto, a presença de M-CSF no meio, ainda que não seja suficiente, é sempre imprescindível.

Na ausência de actividade osteoclástica os ossos tornam-se anormalmente densos, situação designada por osteopetrose (do grego, *osteon*, osso; *petra*, pedra; *osis*, doença) Esta patologia, caracterizada por uma elevada densidade óssea, deve-se, maioritariamente, à ausência de M-CSF que, como foi referido, é necessária para a proliferação dos precursores dos osteoclastos. Nestas situações, o tecido ósseo perde

a capacidade de remodelação resultando no aparecimento de muitos distúrbios, traduzidos por inúmeras fracturas que se manifestam logo aos 5 anos de idade, demonstrando a importância dos osteoclastos na manutenção de um esqueleto saudável⁷.

A diferenciação dos osteoclastos, tal como mostra a figura 8, é um processo sequencial regulado a vários níveis e por vários factores. Em condições fisiológicas este processo está, principalmente, controlado por duas moléculas, ambas produzidas pelos osteoblastos/células do estroma: 1) o factor estimulador de colónias de macrófagos: (M-CSF), já referido e 2) o ligando para o receptor de activação do factor nuclear κB (*nuclear factor kappa B (NF- κB) ligand* - ; RANKL)

As células precursoras dos osteoclastos (monócitos), ao chegarem a uma área de formação e remodelação óssea, desenvolvem um receptor para o M-CSF. A ligação deste receptor ao seu ligando promove a transformação do monócito em macrófago, bem como a expressão de um outro receptor de superfície, o receptor de activação do factor nuclear kappa B (*receptor activator of nuclear factor κB - RANK*). Ao mesmo tempo os osteoblastos/célula do estroma expressam, na sua superfície, a proteína referida no parágrafo anterior e conhecida por RANKL. A ligação do RANKL (presente nos osteoblastos), com o RANK (presente nos pré-osteoclastos) leva à maturação dos osteoclastos, sendo um dos principais “motores de arranque” da osteoclastogénese. Este processo só pode ser levado a cabo através de um contacto directo célula-a-célula, ou seja, osteoblasto-osteoclasto, uma vez que tanto o RANKL como o RANK não são proteínas solúveis mas sim transmembranares. Todavia, o RANKL pode também ser sintetizado pelas células dendríticas e pelos linfócitos T e B, (todas células de natureza inflamatória) apresentando-se neste caso, muitas vezes, como uma proteína solúvel^{114, 115}.

No meio ambiente ósseo, a ligação RANK/RANKL leva à diferenciação dos pré-osteoclastos, à expressão de proteínas de fusão na sua superfície (necessárias à fusão dos precursores mononucleares) e à maturação final dos osteoclastos, constituindo uma etapa fundamental da osteoclastogénese¹⁰⁰. Convém ressaltar que estes osteoclastos ainda não se encontram numa fase activa, isto é, funcional. A maturação dos osteoclastos só ficará completa quando se desenvolverem as estruturas responsáveis pela sua forte ligação à matriz mineralizada.

Ainda que os osteoblastos possam ser considerados como um dos principais indutores da osteoclastogénese, são também responsáveis pela síntese de uma outra proteína, neste caso solúvel, a osteoprotegerina (OPG), que impede/bloqueia a ligação do RANKL ao RANK (todos membros da superfamília do factor de necrose tumoral) A OPG tem uma alta afinidade para o RANKL, actuando localmente como um travão à activação dos osteoclastos. Deste modo, representa um forte inibidor da osteoclastogénese. De notar, porém, que o RANKL e a OPG são expressos pelos osteoblastos/células do estroma em diferentes estádios do seu desenvolvimento (o RANKL numa fase mais precoce e a OPG mais tardiamente), o que permite um “*timing*” de funcionalidade apropriado a estas células.

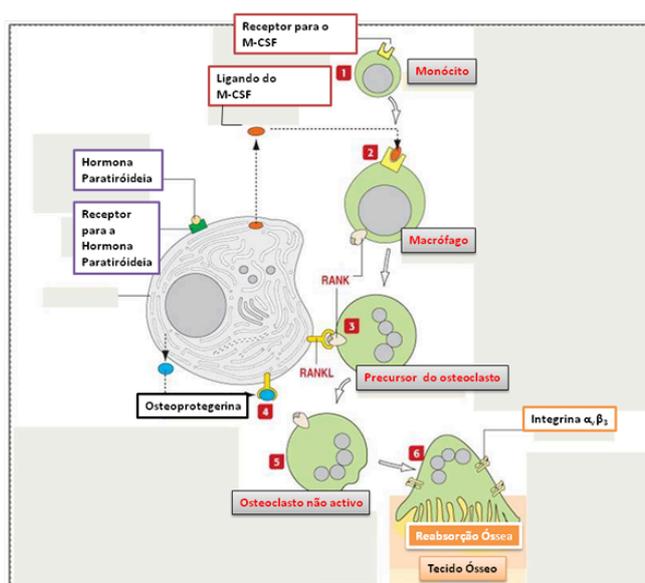


Fig. 8 Representação esquemática das etapas mais importantes do processo fisiológico de osteoclastogénese (descrição mais pormenorizada no texto). Adaptado de¹¹⁵

As situações patológicas, de origem inflamatória, são quase sempre acompanhadas de uma estimulação da reabsorção osteoclástica. As citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, a IL-6 e o TNF- α activam directamente a osteoclastogénese e a reabsorção óssea¹¹⁴. De salientar, mais uma vez, que este mecanismo actua de forma semelhante mas independente do sistema RANK/RANKL. Estes processos (de natureza óssea e de natureza inflamatória) estão intimamente relacionados, podendo ser desencadeados e regulados por factores bastante semelhantes ou mesmo comuns.

Em síntese, pode afirmar-se que o processo de diferenciação das células da linha osteoclástica está muito controlado pelas células da linha osteoblástica, através

de um eixo de regulação comum, vulgarmente conhecido por RANKL/RANK/OPG. Porém esta via não é de sentido único e, como veremos posteriormente, também os osteoclastos condicionam muitas das actividades osteoblásticas.

3.2-Actividade

Os osteoclastos maduros são células bastante móveis que migram para as áreas que irão sofrer reabsorção, definindo zonas de actividade, constituindo as lacunas de Howship e os cones de reabsorção.

Para dar início ao processo de reabsorção o osteoclasto une-se à matriz óssea através de uma ligação entre integrinas, expressas e localizadas na sua membrana celular, e sequências RGDs, presentes em certas proteínas da matriz¹¹⁶. Está já demonstrado o importante papel das integrinas e a sua ligação a sequências RGDs, nas fases iniciais do ciclo de reabsorção exercido pelas células osteoclásticas. Há, pelo menos, quatro tipos diferentes de integrinas ($\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, $\alpha2\beta1$, $\alpha\beta1$) envolvidas na interacção osteoclasto/matriz óssea. Entre estas, a $\alpha\beta3$ tem merecido especial atenção devido ao efeito inibitório na reabsorção óssea¹¹⁷, levado a cabo pela actividade de anticorpos anti- $\alpha\beta3$. Assim, as zonas do osteoclasto que expressam integrinas $\alpha\beta3$ ligam-se a RGDs existentes em proteínas como a vitronectina, a osteopontina, a sialoproteína óssea II e a fibronectina^{118, 119}. Estas proteínas foram previamente sintetizadas e estrategicamente incorporadas na matriz pelos osteoblastos, durante o processo de formação óssea. Pode, por isso, afirmar-se que os osteoblastos ao regularem a quantidade de proteínas, e o seu teor em RGDs, estão (mais uma vez) ainda que de forma indirecta, a condicionar e a controlar a capacidade de adesão dos osteoclastos e a sua actividade.

A membrana plasmática do osteoclasto, unindo-se fortemente à matriz óssea, isola o local de reabsorção criando, ao mesmo tempo, uma Zona de Vedação ("Sealing Zone - SZ"), de forma a definir um compartimento independente e estanque. O osteoclasto apenas se tornará funcional depois de estabelecidas estas ligações.

No decurso deste processo (Fig. 9) ocorre inicialmente o aparecimento de numerosas e pequenas adesões focais, de contacto, com a matriz (podósomas)^{112, 120, 121}. que posteriormente se organizam numa disposição circular, contribuindo para a formação da SZ. Esta zona estabelece, então, em todo o perímetro celular, uma forte união com a matriz óssea ocorrendo, em paralelo a este nível, um rearranjo dos componentes do seu citoesqueleto, particularmente dos filamentos de actina, mas

também de vinculina e talina, formando um anel denso vulgarmente conhecido por “*actin ring*”. Deste modo, o complexo osteopontina / $\alpha\beta3$ / F-actina, forma no seu conjunto a SZ, garantindo o completo isolamento do compartimento de reabsorção¹²²⁻¹²⁴ Esta SZ é, histologicamente, também chamada “Zona Clara” devido à ausência de organelos, o que vai facilitar a motilidade do osteoclasto durante a reabsorção óssea¹¹⁵. É nesta fase que se estabelece no osteoclasto uma forte polarização, com o pólo apical voltado para a matriz óssea e a superfície basolateral orientada para o micro-ambiente medular.

A superfície basolateral está especializada na interação com o microambiente adjacente de tecido conjuntivo/medula óssea, possuindo para tal receptores para hormonas (Calcitonina, Vit.D3), citocinas e outros factores (RANKL) que actuam sobre os osteoclastos¹²⁵. É igualmente o local onde se encontram múltiplos transportadores transmembranares essenciais para o equilíbrio electrolítico dentro da célula. Os núcleos estão também situados na porção basal da célula ficando, assim, mais distantes da superfície óssea.

No pólo apical ocorre, entretanto, a formação de numerosas projecções digitiformes, semelhantes a microvilosidades, que se estendem até à superfície óssea e através das quais são lançados vários produtos que degradam a matriz adjacente, originando progressivamente uma lacuna de reabsorção^{125 8}.

Tendo por base critérios morfológicos e marcadores moleculares podemos considerar nos osteoclastos polarizados a existencia de três domínios (Fig.9): a Zona de Vedação (SZ), a Bordadura em Escova (*Ruffled Border* - RB) e o Domínio Basolateral (*Basolateral Domain*- BD) Este último está subdividido em duas zonas distintas: uma zona localizada na região central designada por Domínio Secretor Funcional (*Functional Secretary Domain* – FSD) e a zona basolateral propriamente dita (BL)

A RB está, também, dividida numa zona periférica (RL), onde se processa a fusão das vesículas acídicas, e numa zona central onde ocorre a endocitose dos produtos resultantes da degradação da matriz óssea¹¹². A Zona da Bordadura em Escova ao apresentar uma membrana celular altamente especializada, possui características únicas que a distinguem de qualquer outro tipo de membrana.

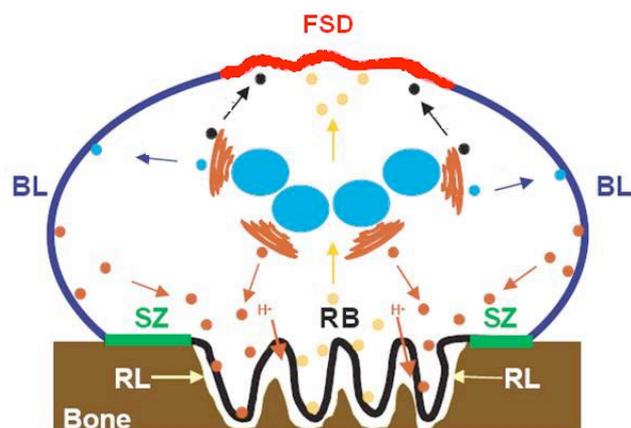


Fig. 9- Visão esquemática de um osteoclasto em processo de reabsorção, mostrando os diferentes domínios da sua membrana celular: BL – Basolateral (azul escuro); Sz- Zona de Vedação (verde); RB – Bordadura em Escova (preto); FSD – Domínio Secretor Funcional (vermelho); RL (preto) – zona periférica da RB. Adaptado de ¹¹²

A reabsorção propriamente dita é um processo altamente organizado e sequencial constituído por duas fases consecutivas^{112, 121}. A primeira fase consiste num processo de acidificação através da produção de protões (H^+) e aniões (Cl^-), provocando a dissolução dos cristais de hidroxapatite presentes na matriz óssea adjacente. Numa segunda fase tem lugar a degradação da matriz orgânica por acção de enzimas proteolíticas lisossómicas.

Na etapa inicial ocorre uma contínua secreção ácida directamente do citoplasma para a lacuna de reabsorção¹¹². Para a formação deste ambiente ácido são essenciais a existência de: 1) uma bomba de protões, constituída por uma H^+ -ATPase, bem como 2) uma fonte de hidrogeniões (H^+). Numa primeira fase, a H^+ -ATPase está presente apenas na membrana de numerosas vesículas ácidas intracitoplasmáticas. Estas vesículas dirigem-se e fundem-se gradualmente com a membrana plasmática da RB, permitindo a inserção das H^+ -ATPases nesta membrana, possibilitando assim a passagem de grande quantidade de H^+ para a lacuna, iniciando a dissolução da fase mineral da matriz óssea. Desta forma, o número de compartimentos ácidos intracelulares vai diminuindo à medida que as vesículas que contêm as bombas de protões são transportadas para a RB ¹²⁶

É a Anidrase Carbónica II que, a nível citoplasmático e a partir do CO_2 mitocondrial e da H_2O , gera protões (H^+) bem como bicarbonato (HCO_3^{2-}). Os protões são, como já foi referido, transportados para a lacuna de Howship através de uma

bomba H^+ -ATPase de forma a criar um meio ácido (pH aproximadamente 4,5) na zona de reabsorção.

Por sua vez, o HCO_3^- produzido e ainda presente no interior da célula é libertado para o meio extracelular através de canais existentes na membrana basolateral. É também através destes canais que entra Cl^- para a célula (por troca com o HCO_3^{2-}), sendo por isso mesmo designados por Canais $Cl^-HCO_3^-$. Em simultâneo, com a entrada para a célula de Cl^- ocorre o aparecimento de canais de cloreto na Bordadura em Escova, de forma a orientar este Cl^- para a lacuna de Howship (para a formação de HCl) e ao mesmo tempo manter a electroneutralidade intracelular¹²⁷.

Em síntese, para acidificar a zona de reabsorção, a Bordadura em Escova possui bombas de prótons (H^+) consumidoras de ATP e canais de aniões (Cl^-)^{112, 128, 129} cooperando na secreção de HCl para o compartimento de reabsorção para posterior dissolução da HA. Toda esta actividade metabólica requer muita energia, sendo apoiada por um grande número de mitocôndrias. O osteoclasto é geralmente considerado como uma das células com maior quantidade de mitocôndrias.

O equilíbrio ácido-básico do osteoclasto é mantido com recurso a diversos mecanismos moleculares situados, maioritariamente na membrana basolateral. De facto, a nível da membrana basolateral, para além das trocas de Cl^- por HCO_3^{2-} (entrada de Cl^- e saída de HCO_3^{2-}) existe também a troca de Na^+ por H^+ (entrada de H^+ e saída de Na^+), que, no seu todo, ajudam a manter o pH interno da célula em níveis fisiológicos durante a reabsorção¹³⁰.

Por outro lado, na lacuna de reabsorção a dissolução dos cristais de HA leva à libertação de grande quantidade de Ca^{2+} e PO_4^{2-} que, de alguma forma, devem ser removidos. Porém, não é apenas o Ca^{2+} e o PO_4^{2-} que devem ser eliminados da lacuna, também o bicarbonato resultante da dissolução da HA deve ser removido. Só deste modo é possível impedir que as grandes quantidades de bicarbonato libertadas (pelo processo de dissolução da HA) neutralizem a acidez do meio e impeçam a continuação da actividade de desmineralização.

Por sua vez, a acumulação de Ca^{2+} no osteoclasto e no microambiente em seu redor conduz ao desprendimento do osteoclasto e à inibição do processo de reabsorção. De facto, grande parte do cálcio resultante da actividade de reabsorção vai entrar no citoplasma da célula através de um sensor de cálcio localizado na sua superfície apical. Os elevados níveis de Ca^{2+} intracitoplasmático desactivam a capacidade de reabsorção do osteoclasto. O alto teor de Ca^{2+} intracitoplasmático

exerce uma influência inibitória no citoesqueleto, desencadeando, não só a desunião entre a célula e a matriz óssea como o desaparecimento da RB ¹³¹.

Em teoria há, pelo menos, três mecanismos diferentes para remover o cálcio e o fosfato para fora da lacuna de reabsorção: a) o seu transporte transcelular em vesículas membranares desde a bordadura em escova até ao FSD, b) a libertação transiente de iões sob a SZ e, c) o transporte destes iões através da célula utilizando proteínas de adesão cálcio/fosfato e canais iónicos ou bombas presentes na membrana plasmática¹¹².

Só após a degradação da parte inorgânica fica exposta uma matriz rica em colagénio que será alvo da actividade de enzimas proteolíticas, também produzidas pelo osteoclasto.

Dois grupos de enzimas lisosómicas, denominadas por catepsinas (K, B e L) e não-lisosómicas (denominadas por metaloproteinases da matriz – MMPs) , têm um papel fundamental na degradação da fase orgânica da matriz óssea. Como já foi referido, a dissolução da fase mineral expõe as fibras de colagénio ao ataque enzimático levado a cabo pelas catepsinas K, B e L.^{132, 133}. A catepsina K, aparentemente específica dos osteoclastos e concentrando-se na RB,¹³⁴ é uma enzima chave neste processo. A sua inibição, em estudos *in vivo* e *in vitro*, previne de forma efectiva a degradação da matriz.^{135, 136}. Para além da catepsina K, a lacuna de reabsorção apresenta igualmente níveis altos de MMP-9 (gelatinase B) ¹³³. Apesar da existência de várias MMPs, apenas a MMP-1, MMP-3, MMP-9 e MMP-14 são produzidas pelos osteoclastos ^{137, 138} 8.

De acordo com trabalhos mais recentes¹³⁹, a degradação da matriz orgânica é iniciada pelas MMPs e continua com as catepsinas. No entanto, *Everts et al* (1998) afirma que as catepsinas actuam primeiro, pois necessitam de um pH baixo (beneficiando da acidificação prévia pelo HCl), e que só depois entram em actividade as MMPs ¹⁴⁰.

Para além das MMPs e catepsinas, os osteoclastos secretam também: outras proteínas como a arilsulfatase, a β -glucuronidase¹⁴¹, o factor activador do plasminogénio tecidual, a lizozima¹²⁰, a sialoproteína óssea, a osteopontina, a fibronectina, o TGF- β e a IL-6 ¹⁴².

Outra das enzimas lisossomais, secretada pelos osteoclastos, que não pode deixar de ser referida, é a fosfatase ácida tartrato-resistente (*tartrate-resistant acid phosphatase* – TRAP), a qual é utilizada como um marcador citoquímico para os osteoclastos¹⁴³. Apesar de a TRAP não ser inteiramente específica dos osteoclastos é

um marcador bastante útil para a sua identificação nos cortes histológicas, tendo em conta que as células da linha osteogénica não exprimem TRAP¹⁴⁴. Alguns dos produtos de degradação da matriz orgânica podem ser detectados e quantificados no soro, constituindo um parâmetro utilizado na quantificação da reabsorção óssea.

Na prática clínica a acção das MMPs é bloqueada pelas tetraciclina, bloqueando desta forma a reabsorção óssea. Este facto está na base da utilização da doxiciclina em doses subantimicrobiana na Medicina Dentária, mais especificamente no combate á reabsorção óssea que ocorre nas Periodontites.^{145 146-148}

3.3- Regulação da actividade

A actividade concertada das células da linha osteoclástica e osteoblástica (actividades opostas mas complementares intimamente associadas no tempo e no espaço) está sujeita à acção de numerosos factores de regulação, quer situados a nível sistémico quer a nível local¹³⁴.

Os níveis séricos de determinadas hormonas, particularmente a paratormona, a vitamina D3 e a calcitonina, podem influenciar, quer directa quer indirectamente, mas de uma forma determinante, a actividade osteoclástica. São, contudo, as moléculas produzidas ou libertadas localmente no microambiente ósseo que constituem os principais agentes moduladores da actividade celular do ciclo da remodelação óssea. Neste âmbito, temos a considerar as moléculas presentes na matriz extracelular (TGF- β , BMPs, PDGF e FGF) sob uma forma inactiva mas que, uma vez expostas, se tornam activas^{149, 150 114, 151}. Não menos importantes são, ainda, certos factores de crescimento, citoquinas e proataglandinas sintetizados tanto pelas próprias células ósseas como pelas células da linha hematopoética e pelas células do sistema imunitário (IL-1, IL-6, TNF- α)^{150, 152-154}. Estes factores medeiam no seu conjunto, pelo menos parcialmente, os efeitos dos estímulos hormonais e influenciando um eixo de regulação (mais importante) vulgarmente conhecido por RANKL/RANK/OPG, que constitui uma ponte molecular entre osteoclastos e osteoblastos.

3.4- Biodegradação/Reabsorção de cerâmicos de fosfato de cálcio

A reabsorção de cerâmicos de fosfato de cálcio é, ainda hoje, um tema de alguma controvérsia, não havendo na comunidade científica uma opinião unânime sobre esta problemática. Numa revisão do estado da arte por nós efectuada é possível recolher estudos muito díspares, apontando uns para um nítido processo de reabsorção da HA sintética por parte dos osteoclastos, que é todavia negada por outros.

A degradação de biomateriais de enxerto ósseo, nomeadamente com base em cerâmicos de fosfato de cálcio, pode realizar-se através de um processo químico de dissolução ou surgir como consequência da actividade celular.

A dissolução química, não associada a osteoclastos, parece assentar no facto dos líquidos biológicos, presentes em redor do biomaterial atingirem, com frequência, um pH ácido resultante dos produtos de degradação metabólica provenientes das muitas populações celulares que normalmente colonizam o local. Uma vascularização pouco desenvolvida, frequentemente associada à intervenção cirúrgica, agrava esta situação, contribuindo para uma ainda mais acentuada diminuição do pH, facilitando o processo de dissolução e conseqüente degradação do biomaterial¹⁵⁵.

Por outro lado, a participação celular na biodegradação pode envolver: a) monócitos, macrófagos e células gigantes multinucleadas, com capacidades macrofágicas (que podem ser consideradas verdadeiros osteoclastos ou apenas macrófagos polinucleares) e b) os típicos osteoclastos normalmente implicados nos mecanismos de reabsorção de matriz óssea^{156, 157}. Os monócitos e os macrófagos estão entre as primeiras células que ocorrem ao local de cicatrização, podendo participar nos processos de degradação de biomaterial através da libertação de proteases, prostaglandinas, citoquinas. Os macrófagos e as células gigantes multinucleadas parecem estar maioritariamente envolvidos na “limpeza” de pequenas partículas que se libertam da superfície da HA densa, através de um processo de fagocitose⁴⁵, sem uma interacção directa com o biomaterial. A degradação, levada a cabo pelos osteoclastos, é nitidamente favorável pois mimetiza o processo fisiológico da reabsorção da matriz óssea, criando superfícies com características ideais para o desenvolvimento e diferenciação das células osteoblásticas e estruturas vasculares

Há, no entanto, vários estudos, quer *in vivo*^{45, 46} quer *in vitro*^{9, 47-51}, que demonstraram a possibilidade dos osteoclastos apresentarem processos activos de

fagocitose, em paralelo com a sua tradicional capacidade e actividade de reabsorção. De facto, a linhagem das células osteoclásticas parece apresentar funções bem mais complexas do que inicialmente se suponha.

Os osteoclastos, mesmo apresentando as especializações morfológicas que os caracterizam (nítida polarização, anel de actina, zona de vedação e bordadura em escova) e sendo TRAP positivos, podem mostrar também a presença no seu citoplasma de endofagossomas contendo partículas minerais fagocitadas das lacunas de reabsorção. Estas partículas constituídas por cristais de CaP, resultaram da fragmentação do material cerâmico, sendo posteriormente transferidas para o interior das células e integradas em vacúolos citoplasmáticos ou fagossomas¹⁵⁸. Estes cristais, depois de sofrerem uma transcitose, durante a qual são degradados em partículas mais pequenas, são finalmente libertados para o meio extracelular (através da superfície citoplasmática oposta à bordadura em escova, conhecida por FSD) sendo posteriormente fagocitados por macrófagos mononucleares. Com efeito, foi possível demonstrar a presença de partículas de HA não apenas no citoplasma de osteoclastos, mas também no interior de macrófagos⁴⁵.

Em síntese, os osteoclastos parecem, pois, capazes de, em simultâneo, reabsorver materiais cerâmicos de fosfato de cálcio através da criação de lacunas acídicas de reabsorção (com recurso a bomba de prótons) ou através de um processo de fragmentação/fagocitose^{45, 156, 158}. Este aspecto vem mais uma vez sublinhar a origem comum do osteoclasto com as células da linha monócito/macrófago, conservando as capacidades de fagocitose, que tão bem caracterizam estas populações celulares.

É interessante verificar que, no caso destes materiais de substituição óssea, os osteoclastos aderem a áreas desprovidas de proteínas como a osteopontina ou osteocalcina, que em situações fisiológicas são essenciais para a formação de uma zona de vedação. Será que as proteínas adsorvidas (contendo RGDs) à superfície destes materiais são responsáveis pela formação de uma zona de vedação, conseguindo substituir, de alguma forma, as proteínas existentes na matriz óssea? Relativamente à qualidade desta zona de vedação, será que esta garante a hermeticidade da lacuna de reabsorção, mantendo os níveis de pH baixos?

Por outro lado, a actividade dos osteoclastos sobre a HA sintética parece estar muito dependente das características intrínsecas do biomaterial (aspecto directamente relacionado com as proteínas adsorvidas à sua superfície), entre as quais citamos o tamanho e forma dos cristais^{159, 160} (a micro e a nanocristalinidade, bem como a sua fraca organização, promovem o processo de reabsorção) e ainda a “molhabilidade” e

rugosidade da sua superfície¹⁶¹. Também nestes casos as superfícies rugosas parecem mais favoráveis à interacção com os osteoclastos do que as superfícies lisas. Para além disso, também o método e temperatura de sinterização³⁰ e os mecanismos de esterilização a que foram sujeitos os biomateriais podem influenciar a sua biodegradação/reabsorção.

Não menos importantes são as propriedades biofuncionais e biomecânicas do local de implantação¹⁶². A este respeito não poderão deixar de ser mencionados os trabalhos de Rumpel e colaboradores (2006) e de Merckx e colaboradores (1999) que, utilizando o cão como modelo animal, demonstraram que um mesmo biomaterial, colocado em zonas sujeitas à acção de diferentes forças mecânicas, tem comportamentos diferentes^{158 163}. De facto, nas áreas sujeitas a maiores forças mecânicas houve maior, e mais rápida, reabsorção, a par de uma extensa remodelação óssea. O local de implantação tem seguramente, também, um contributo para a biodegradação do material, sabendo-se que o tecido ósseo esponjoso apresenta uma capacidade de reabsorção maior que o tecido ósseo cortical¹⁶².

A capacidade de reabsorção dos materiais à base de fosfato de cálcio parece estar relacionada, ainda, com a solubilidade do material em questão¹⁶⁴. Estudos *in vivo*¹⁶⁵ e *in vitro*⁴⁷, compararam o processo e velocidade de biodegradação de cerâmicas formadas por TCP (fosfato tricálcico) ou por HA. O principal mecanismo de degradação do TCP assenta num processo de dissolução química e não numa actividade osteoclástica⁴⁷, enquanto que a HA mostrava um maior número de lacunas de reabsorção osteoclástica. A justificação desta disparidade de resultados parece residir na diferente solubilidade do TCP e da HA. A alta solubilidade do TCP, libertando uma grande concentração de Ca^{2+} para o meio extracelular, ou para o meio de cultura, não é favorável a uma reabsorção osteoclástica. De facto, esta grande concentração de Ca^{2+} , para além de inibir a migração dos osteoclastos inibe igualmente a sua adesão ao dificultar a formação do anel de actina e, deste modo, a criação de uma eficaz zona de vedação⁴⁷. Como já foi referido os osteoclastos são células muito sensíveis às concentrações de Ca^{2+} (intra e extracelular), sabendo-se que o aumento deste ião inibe a adesão osteoclástica e a actividade de reabsorção. A relação directa entre o Ca^{2+} e a actividade osteoclástica deverá ser tida em consideração aquando da síntese e optimização de novos biomateriais à base de fosfato de cálcio.

Para finalizar, parece-nos oportuno deixar em aberto a seguinte questão: qual ou quais, de entre todos os factores atrás descritos, irá condicionar o diferente perfil de

degradação de um biomaterial, direccionando-o no sentido dos processos de dissolução e fagocitose ou, pelo contrário, a sua reabsorção pela clássica via osteoclástica?

Capítulo II

II-ESTUDO EXPERIMENTAL EM MODELO ANIMAL

1-OBJECTIVOS

2-MATERIAL E MÉTODO

2.1-AMOSTRA

2.2-MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

2.3- MATERIAIS

2.3.1- Osso autógeno

2.3.2- Xenoenxerto de origem bovina

2.3.3- HA teste

2.4- DISTRIBUIÇÃO DOS MATERIAIS PELOS ANIMAIS DA AMOSTRA

2.5- VOLUME DE MATERIAL COLOCADO

2.6- MEDIDAS PRÉ-ANESTÉSICAS

2.7- ANESTESIA

2.8- PREPARAÇÃO LOCAL CIRURGICO

2.9- CIRÚGIA

2.10- MEDICAÇÃO PÓS-OPERATÓRIA

2.11- RECUPERAÇÃO DA ANESTESIA

2.12- EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

2.13- COLHEITA DO MATERIAL

2.14- NECROPSIA DOS ANIMAIS

2.15- MÉTODOS DE ANÁLISE

2.15.1-Radiografia Digital Directa

2.15.2-Análise Histológica

2.15.3- Análise em Microscopia de Luz

3-RESULTADOS

4-DISCUSSÃO

5-CONCLUSÕES

6-RESUMO

1- OBJECTIVOS

O trabalho experimental apresentado neste estudo propõe-se avaliar *in vivo*, o processo de osteointegração e o potencial de regeneração óssea de uma hidroxiapatite sintética nanocristalina, recorrendo essencialmente a estudos de índole histológica efectuados em microscopia de luz.

Este trabalho foi concebido com o objectivo de analisar o comportamento biológico desta hidroxiapatite (utilizando um modelo de cicatrização óssea retardada com defeitos ósseos cranianos) tendo como referência um defeito ósseo preenchido com osso autógeno (controlo positivo) e um defeito ósseo sem preenchimento (controlo negativo). Em paralelo foi ainda avaliada uma hidroxiapatite natural – xenoenxerto - obtida a partir de osso de origem bovina (Bio-Oss®), utilizado como o xenoenxerto *standard* nos processos de regeneração óssea.

Como animal experimental foi utilizado o coelho. Esta escolha baseou-se na facilidade de manuseamento e num metabolismo ósseo aproximado a animais de maior porte e ao homem¹⁶⁶. Optámos pelo modelo de dimensão crítica retardada com defeitos de 8 mm nos ossos parietais do coelho, originalmente criado por Kramer *et al* (1968a)¹⁶⁷ e posteriormente desenvolvido por outros¹⁶⁸⁻¹⁷¹ e, em particular, no nosso Departamento de Medicina Dentária da FMUC, por Guerra (2003)¹⁷² e Matos (2008)¹⁷³. Até às 16 semanas estes defeitos comportam-se como verdadeiros defeitos críticos, havendo evidência de cicatrização dos defeitos apenas após este período. Assim este modelo torna-se apropriado para estudos de curta duração, o que aliás é o pretendido.

2- MATERIAL E MÉTODO

2.1-AMOSTRA

Neste protocolo experimental foram utilizados coelhos machos adultos. A necessidade de incluir apenas coelhos do sexo masculino pretende evitar influências hormonais no processo de cicatrização. A utilização de animais adultos deve-se ao facto de os coelhos jovens, ainda sem uma maturação esquelética completa, apresentarem um processo de cicatrização óssea mais rápido e que pode ser influenciado pelos mecanismos de ossificação ainda em curso. A maturação esquelética foi confirmada radiograficamente através do encerramento do disco epifisário dos ossos longos ^{170, 174}

O presente trabalho experimental foi desenvolvido com base uma amostra de 20 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*, n=20), da estirpe “*New Zealand White*”, machos, adultos, com um peso de 3,4+/- 0,5Kg. Estes coelhos foram divididos em duas séries de 10 coelhos, correspondentes aos dois períodos de tempo de experiência, isto é, duas e quatro semanas.

2.2-MANUTENÇÃO, MANIPULAÇÃO E BEM-ESTAR ANIMAL

A selecção dos animais, manipulação, manutenção e garantia de bem-estar foram avaliados por membros qualificados do Departamento Zootécnico da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, respeitando o protocolo aprovado na instituição e de acordo com a legislação em vigor. Após uma avaliação inicial, para confirmação da inexistência de qualquer tipo patologia, por um técnico qualificado, os animais entraram num período de quarentena, com vigilância diária, nunca inferior a duas semanas.

Os animais foram mantidos em condições padronizadas de climatização (temperatura, humidade e renovação de ar) e de luminosidade (12h de luz e 12h de escuro) Os animais foram igualmente alojados em gaiolas metálicas individuais, adequadas à sua espécie, com espaço suficiente para se movimentarem. Todas as gaiolas foram identificadas com as seguintes características: responsável pelo projecto, estudo em causa, número do animal, peso, sexo, data de intervenção e alguma indicação especial, caso necessário. Estas condições estão de acordo com a legislação em vigor (Portaria nº 1005/92 de 23 de Outubro; Portaria nº1131/97 de 7 de Novembro).

A dieta foi providenciada com ração seca, de origem comercial, com concentrações controladas e analisadas pelo fabricante. A água fornecida *ad libitum*, teve origem no sistema de abastecimento municipal. Não se supõe que quer a ração quer a água possuam qualquer risco de interferência nos resultados do presente estudo.

2.3- MATERIAIS

2.3.1-Hidroxiapatite sintética (teste)

A hidroxiapatite (HA) é o principal componente inorgânico da matriz óssea, sendo o primeiro material especificamente sintetizado e processado para ser utilizado como material de substituição óssea.

A HA utilizada no presente estudo experimental resultou da junção, em partes iguais, de dois tipos de grãos de HA. Uns foram sinterizados a 500°C e os outros a 800°C. Trata-se de uma HA nanocrystalina (cristais <100nm), com uma orientação irregular dos cristais.

O tamanho dos cristais foi determinado com recurso à difracção de raios X. Esta HA pura apresenta uma correcta proporção molar entre o cálcio (Ca) e o fósforo (P) que é de 1,67 (Ca/P=1,67). Esta proporcionalidade é importante pois mimetiza o *ratio* Ca/P da matriz óssea. As suas características e processo de fabricação encontram-se detalhadamente descritas no trabalho de Gomes, J.F. (2008)¹⁷⁵

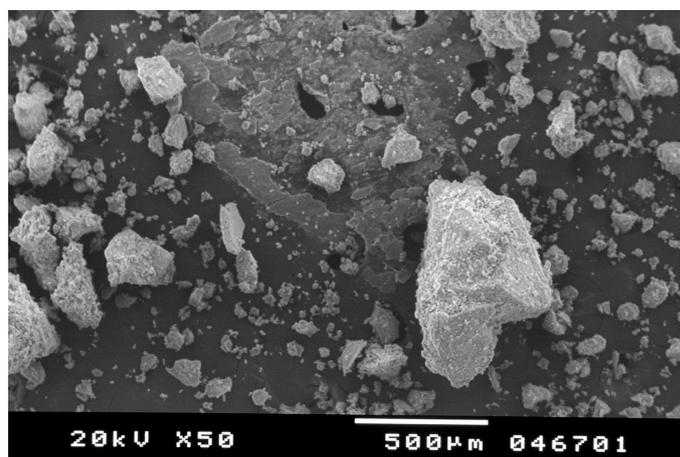


Fig 10. Imagem de Microscópio Electrónico de Varrimento (MEV) da hidroxiapatite teste. Gentilmente cedida pela Sr^a Prof^a Dr^a Teresa Vieira.

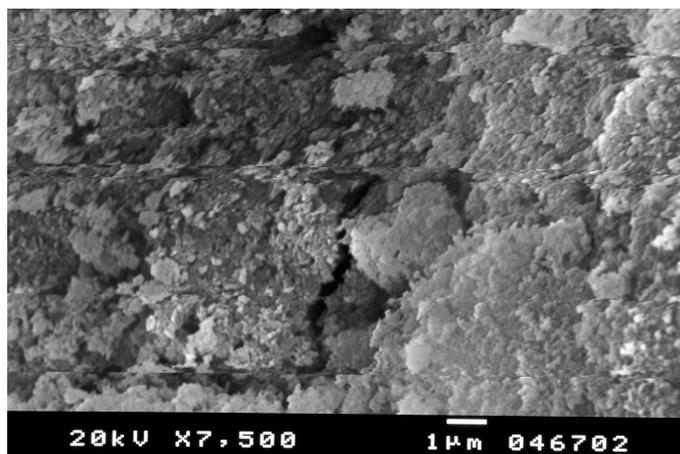


Fig. 11: Maior ampliação de uma zona apresentada na figura anterior representando a superfície de uma partícula. Gentilmente cedida pela Sr^a Prof^a Dr^a Teresa Vieira.

2.3.2- Xenoenxerto de origem bovina – Bio-Oss® *Spongiosa-Granules* (Lote 080307)

O xenoenxerto é formado por uma matriz mineral anorgânica de origem bovina.

A formulação utilizada no presente estudo apresentou-se sob a forma de grânulos, de natureza esponjosa, com tamanhos entre 250 a 1000 µm. As figuras 11 e 12 representam o aspecto em microscopia electrónica de varrimento (MEV) de uma amostra deste material constituído por uma grande variedade de grânulos de diversos tamanhos e de contornos irregulares.

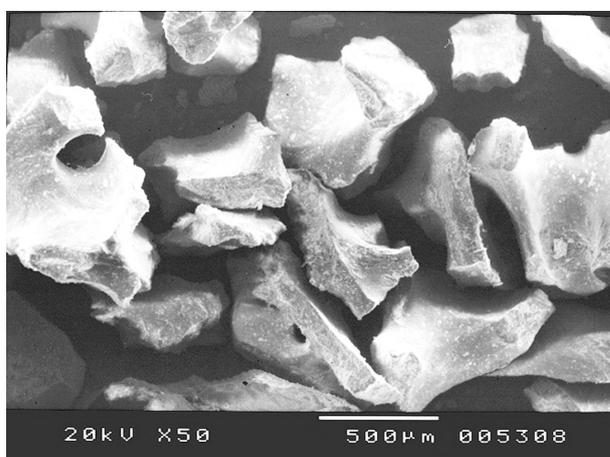


Fig 12 Imagem de MEV duma amostra de grânulos do xenoenxerto de origem bovina.

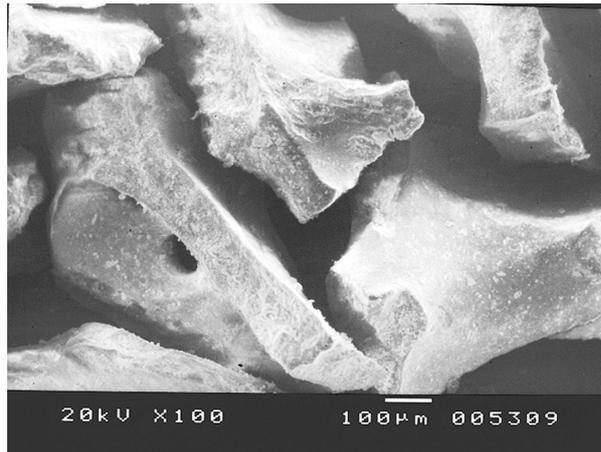


Fig.13: Maior ampliação de uma zona representada na figura anterior mostrando a existência de alguns poros.

No seu processamento são, de acordo com o fabricante, completamente removidos, os componentes orgânicos através de processos físico-químicos realizados a baixa temperatura (300°C)¹⁷⁶.

O componente inorgânico apresenta-se quimicamente como uma apatite biológica típica dos tecidos ósseos, com uma proporção Ca/P de 2/1¹⁷⁷. Na sua composição química importa referir que contém menos grupos hidroxilo e mais iões carbonato do que a maioria das hidroxiapatites sintéticas. Assim, esta hidroxiapatite natural (hidroxiapatite carbonatada) mantém a sua grande semelhança à fase mineral da matriz óssea. Este facto resulta do seu processo de sinterização a baixa temperatura, evitando uma fase de calcinação a altas temperaturas.

O seu componente mineral, de pequenos cristais de hidroxiapatite (40x10 nm), facilita o processo de reabsorção sendo remodelado gradualmente e de forma fisiológica. Para além disso, mantém uma arquitectura altamente estruturada (acompanhando de perto a disposição e arranjo característico do molde de colagénio) capaz de assegurar e manter a sua estrutura, mesmo depois de destruído o suporte proteico. Esta organização (mantida devida à sinterização a baixa temperatura) deverá representar, por si só, uma mais-valia importante na performance biológica e mecânica deste material de enxerto de origem natural, constituindo uma excelente alternativa ao osso autógeno

2.3.3-Osso autógeno

Os fragmentos de osso autógeno tiveram origem nos discos ósseos retirados após craniotomia bilateral do osso parietal. Na trepanação foi utilizado um instrumento rotativo, com irrigação permanente de soro fisiológico. Com recurso a uma pinça goiva os fragmentos ósseos cortical e esponjoso foram reduzidos a um granulado de tamanho, tanto quanto possível, uniforme e semelhante aos grânulos de BioOss®. Após a sua preparação foram colocados em soro fisiológico estéril, de forma a manter a sua viabilidade.

Tendo em conta que o osso autógeno é considerado o “gold-standard” em técnicas de enxerto, sendo como tal a primeira escolha, os defeitos preenchidos com este material funcionam como controlo positivo.

2.3.4-Defeito não preenchido

Os defeitos não preenchidos com qualquer tipo de material de substituição são utilizados para demonstrar, durante os intervalos de tempo estipulados para a experimentação, uma incipiente formação de tecido ósseo. Funcionam, pois, como controlo negativo.

2.4- ESTUDO EXPERIMENTAL NO CRÂNIO

O protocolo experimental utilizado nesse estudo foi aprovado pela Direcção Geral de Veterinária – Direcção de Serviços de Saúde e Protecção Animal, conforme previsto na alínea b) do nº 49 da Portaria nº 1005/92 de 23 de Outubro.

A amostra (n=20) foi dividida por dois grupos, com 10 coelhos cada, que foram sacrificados respectivamente às duas e às quatro semanas (Diagrama 1)

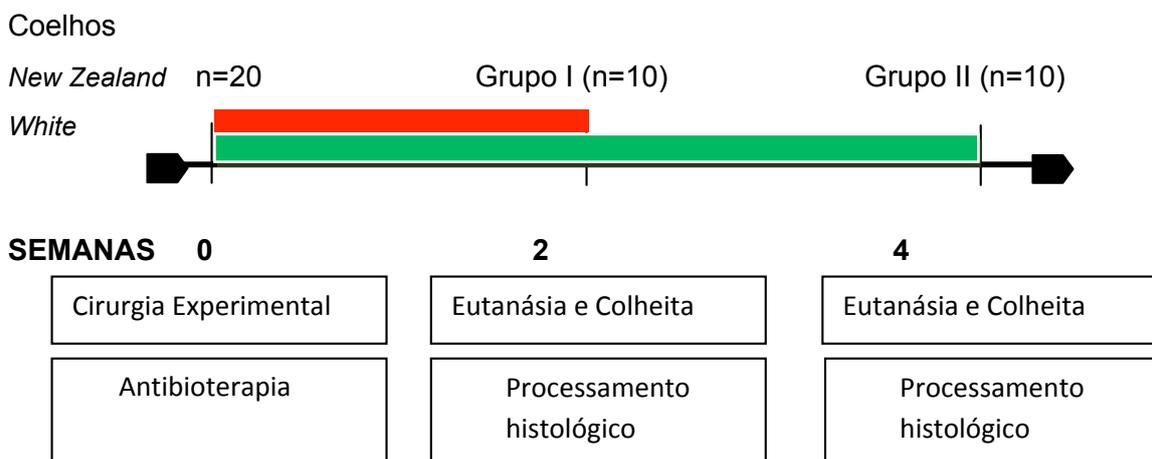


Diagrama 1. Esquema do desenho experimental.

Foi executado o denominado modelo de cicatrização óssea retardada, durante o qual se evita que a regeneração espontânea ocorra durante períodos experimentais de média duração. Procedeu-se à criação de dois defeitos circulares transcorticais bilaterais, com 8mm de diâmetro, um em cada osso parietal^{167, 168, 172, 173, 178} (Fig. 14).

Ao realizarmos dois defeitos por animal estamos a conferir valorização estatística ao procedimento experimental, uma vez que cada animal funciona como controlo do próprio. Com este procedimento também diminuámos a amostra. Foram utilizados apenas dois controlos negativos por grupo, uma vez que este modelo se encontra bem estudado e bem estabelecidos controlos históricos com uma regeneração óssea muito limitada.

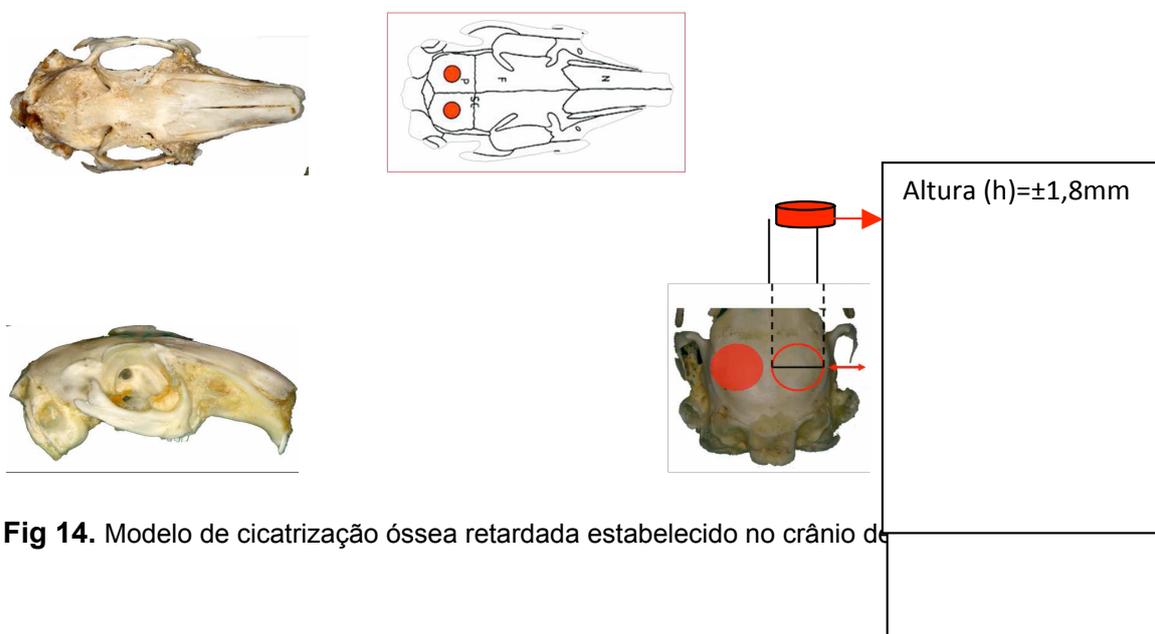


Fig 14. Modelo de cicatrização óssea retardada estabelecido no crânio de

2.5- DISTRIBUIÇÃO DOS MATERIAIS PELOS ANIMAIS DA AMOSTRA

A distribuição dos materiais teve por finalidade minimizar o tamanho da amostra. Optou-se por uma distribuição aleatória, pelo método de sorteio, dos materiais nos animais envolvidos, tendo sido excluída a repetição do material no mesmo animal. Para cada tempo experimental foram assegurados seis locais para cada material (Hidroxiapatite sintética (HA). Xenoenxerto, Autoenxerto), perfazendo um total de dezoito e dois defeitos foram deixados não preenchidos (controlo negativo). Com este desenho da distribuição dos materiais pretendeu-se reduzir o número de animais a utilizar, mas obtendo um estudo com possibilidade de efectuar uma análise estatística credível.

O volume de material colocado em cada defeito foi aproximadamente de 0,15cc ($V=\pi r^2 h$).

Grupo 1 – 2 semanas

Grupo 2 – 4 semanas

Nº Coelho	Defeito Esquerdo	Defeito Direito		Nº Coelho	Defeito Esquerdo	Defeito Direito
1	Xenoenxerto	Auto-enxerto		19	Xenoenxerto	Auto-enxerto
2	Auto-enxerto	Negativo		15	Auto-enxerto	Negativo
3	Xenoenxerto	Hidroxiapatite		13	Xenoenxerto	Hidroxiapatite
4	Auto-enxerto	Negativo		16	Auto-enxerto	Negativo
18	Hidroxiapatite	Auto-enxerto		5	Hidroxiapatite	Auto-enxerto
6	Xenoenxerto	Auto-enxerto		12	Xenoenxerto	Auto-enxerto
7	Auto-enxerto	Hidroxiapatite		14	Auto-enxerto	Hidroxiapatite
8	Hidroxiapatite	Xenoenxerto		17	Hidroxiapatite	Xenoenxerto
9	Hidroxiapatite	Xenoenxerto		20	Hidroxiapatite	Xenoenxerto
10	Hidroxiapatite	Xenoenxerto		11	Hidroxiapatite	Xenoenxerto

Tabela 1: Esquema de distribuição aleatória dos materiais no modelo experimental.

2.6- MEDIDAS PRÉ-ANESTÉSICAS

A manipulação destes animais para administração de drogas anestésicas pode apresentar dificuldades, mesmo para profissionais com bastante experiência. O coelho é um animal de experiência que necessita de particular atenção pois assusta-se com facilidade, segregando uma grande quantidade de catecolaminas quando em stress, podendo fazer uma paragem cardíaca. Da mesma forma podem ocorrer movimentos violentos dos membros posteriores que, devido à sua grande potência muscular, podem originar fracturas nos membros ou mesmo na coluna vertebral. Assim torna-se importante providenciar um ambiente tranquilo bem como uma manipulação adequada^{179, 180}.

Está aconselhado efectuar um jejum durante as 12 h que antecedem a anestesia, de forma a reduzir a massa alimentar e a produção de gases no ceco. Com esta medida pretende-se minimizar a interferência das vísceras na respiração e facilitar o retorno venoso ao coração. A possibilidade de regurgitação nesta espécie é mínima, no entanto, deve igualmente merecer a nossa atenção^{181, 182}.

2.7- ANESTESIA

A anestesia foi induzida utilizando a medetomidina (0,15mg/Kg SC) e butorfanol (0,1mg/Kg IM). Quinze minutos após esta administração foi administrada uma injeção lenta de ketamina (5 mg/Kg IM ou EV na veia marginal da orelha). O estado anestésico foi mantido, após entubação oral com um pequeno tubo endotraqueal, através da inalação de isoflurano (0,25% a 2%) num fluxo de oxigénio de 0,5 a 2L/min/Kg utilizando para tal um sistema de respiração de Mapleson A Magill®.

O *status* anestésico de cada coelho foi monitorizado durante todo o procedimento cirúrgico através de um oxímetro não-invasivo (frequência respiratória e a saturação de oxigénio da hemoglobina), um capnógrafo e auscultação cardíaca (frequência cardíaca).

2.8- PREPARAÇÃO LOCAL CIRÚRGICO

O instrumental cirúrgico foi esterilizado em autoclave de acordo com o protocolo hospitalar vigente.

A preparação da área anatómica envolvida na intervenção foi efectuada através de tricotomia da mesma, seguida da desinfecção do local com solução de iodopovidona (Betadine®, Mundipharma AG, Basileia, Suíça).

Os coelhos foram colocados, de forma atraumática, sobre uma mesa operatória previamente aquecida e mantida a temperatura adequada durante o acto cirúrgico.

2.9- CIRURGIA

Após a tricotomia foi realizada uma incisão sagital da pele, de espessura total, coincidindo com a sutura mediana do crânio. Esta incisão teve aproximadamente 5 cm de comprimento, iniciando-se ligeiramente anterior à sutura coronal e indo até à sutura parieto-ocipital (Fig. 15 B).

Inicialmente descolou-se o plano cutâneo e em seguida o perióstio até à exposição do osso (Fig. 15 C)..

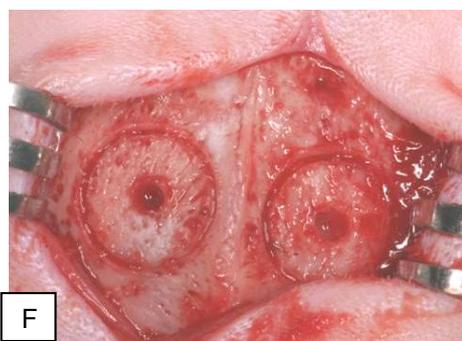
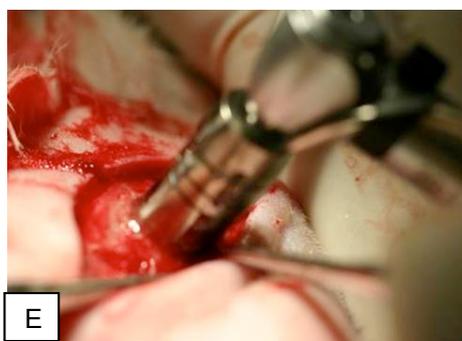
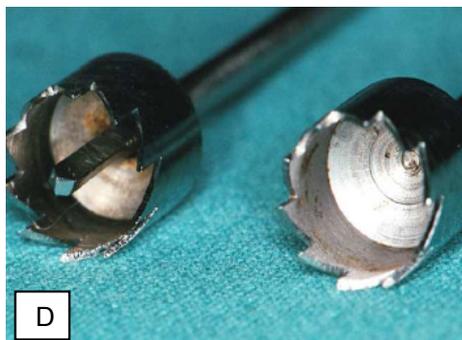
Exposta a área desejada da calote craniana efectuou-se a trepanação bilateral nos osso parietais, produzindo-se desta forma um defeito circular de 8mm de diâmetro em cada osso parietal, ao lado da linha média. Não houve interferência destes defeitos com as suturas coronal, parieto-parietal e parieto-ocipital. A criação destes defeitos foi realizada em duas fases cronológicas distintas, utilizando-se para tal um instrumento rotativo montado em micromotor e contra-ângulo (800 rotações por minuto – r.p.m.) e irrigação permanente com soro fisiológico estéril. Na primeira fase, utilizou-se um trépano guia de superfície (Fig. 15 D), com 8mm de diâmetro e um pino central, tendo por objectivo marcar o local onde se iria criar o defeito. Numa segunda fase, recorreu-se a um trépano de profundidade (Fig. 15 E), com o mesmo diâmetro e sem o pino central, de forma a remover as tábuas ósseas externa e interna. Durante este procedimento é essencial que a dura-máter não seja lesada e se evite o seio sagital. Ambas as tábuas ósseas são removidas recorrendo-se a uma pinça e espátula (Fig. 15 G). As espículas e irregularidades remanescentes são removidas com uma pinça goiva e procede-se à irrigação com soro fisiológico para remoção de qualquer resíduo.

Os materiais em estudo foram colocados nos defeitos seguindo o padrão de distribuição atrás mencionado (Fig. 15 J). Os defeitos designados por controlo negativo permaneceram sem qualquer tipo de material.

Efectuou-se o encerramento dos tecidos em dois planos: primeiro o perióstio foi suturado com pontos descontínuos utilizando-se fio reabsorvível quatro zeros (Coated Vicryl®, 4/0, Ethicon, Edimburgo, Reino Unido) (Fig. 15 L) e posteriormente a

pele foi suturado com pontos simples descontínuos com fio não reabsorvível três zeros (Perma Sharp™, 3/0 silk, black braided, Hu-Friedy Co., Chicago, E.U.A.). (Fig. 15 M)

Na Fig. 15 ilustra-se a sequência do procedimento cirúrgico



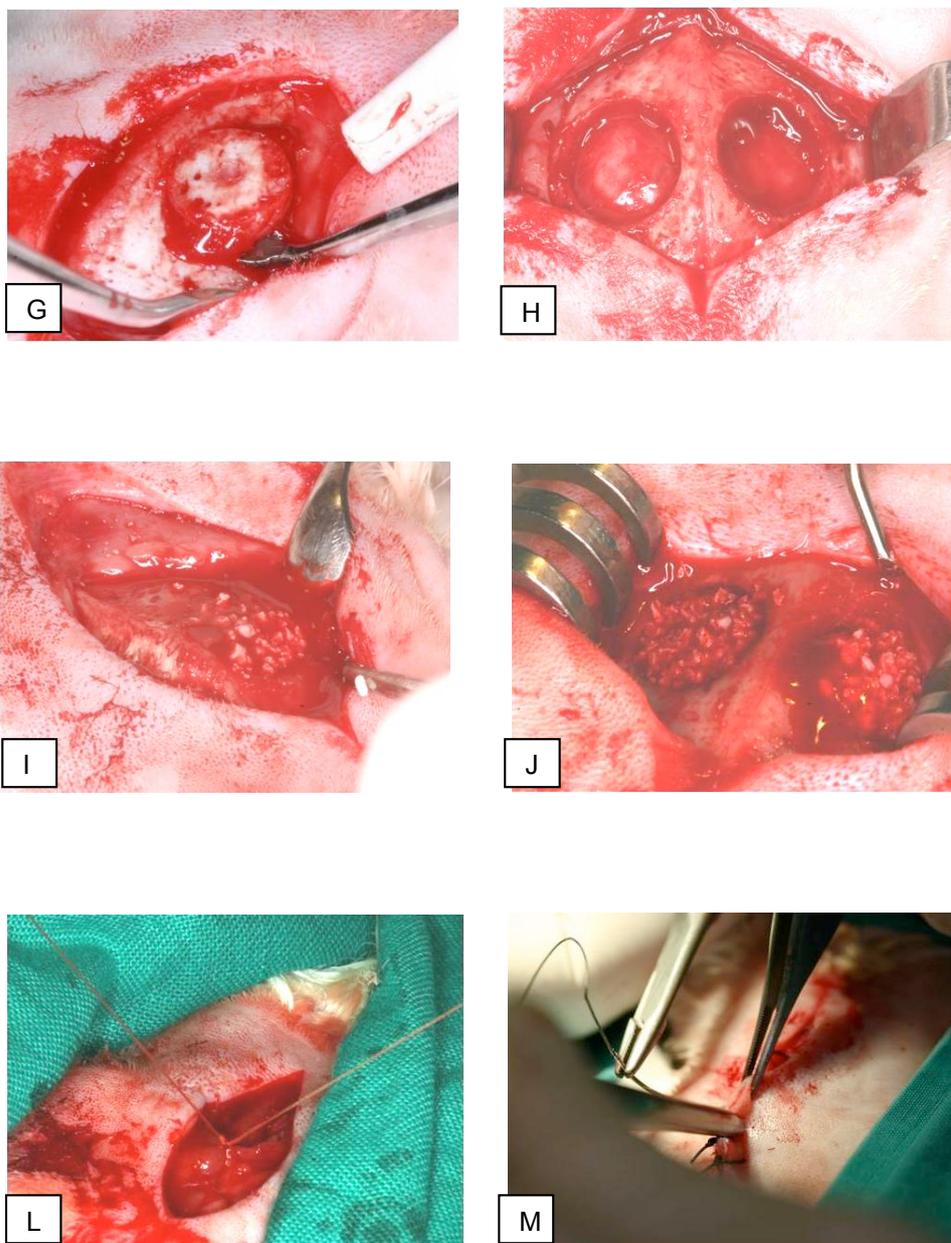


Fig. 15 A): Instrumental Cirúrgico; B) Incisão Sagital; C) Descolamento do Perióstio; D) Trépano Guia (esquerda) e Trépano de Profundidade (direita); E) Trepanação com instrumento rotativo com irrigação; F) Corte de ambos defeitos parietais G) Remoção fragmento ósseo; H) Defeitos ósseos bilaterais, transcorticais, sem lesão da dura-máter; I) Colocação material; J) Defeitos bilaterais preenchidos com diferentes materiais; L) Sutura do perióstio com fio reabsorvível; M) Sutura pele com fio não-reabsorvível.

2.10- MEDICAÇÃO PÓS-OPERATÓRIA

No período pós-operatório cada animal foi medicado com metilprednisolona (8mg/Kg IM, dose única), para prevenir o edema laríngeo e traqueíte iatrogénica, bem como com antibioticoterapia com enrofloxacina (5mg/Kg SC, BID), durante a primeira semana após a cirurgia.

2.11- RECUPERAÇÃO DA ANESTESIA

O pós-operatório é um período fundamental para permitir o conforto e o bem-estar dos animais, reduzindo desta forma a magnitude das respostas metabólicas à cirurgia. Após a cirurgia, os animais foram colocados durante 12h, numa sala de recobro, escura, silenciosa, confortável. Foram constantemente vigiados em relação à hipotermia e à aspiração de água ou comida, sendo mantido um animal em cada gaiola de forma a evitar agressões. As gaiolas estavam limpas de qualquer material de forragem que pudesse interferir com as vias respiratórias e isentas de qualquer material que pudesse ser responsável por eventuais traumatismos no início da recuperação da locomoção. Foi mantida uma temperatura adequada recorrendo, se necessário, a materiais envolventes termo-isolantes.

Após este período, foram levados para as respectivas gaiolas padrão. Foi-lhes feito o controlo da dor pós-operatória através de uma monitorização diária de eventuais alterações aos hábitos normais de ingestão de comida ou água, do peso corporal, dos padrões de comportamento considerados próprios da espécie e em relação à presença de sinais clínicos ou reacções anómalas à espécie.

2.12- EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Os animais foram sujeitos a eutanásia separadamente, nos dias correspondentes ao final de cada período de estudo, recorrendo-se à administração de Pentobarbital de Sódio na Veia Marginal da Orelha (1ml/Kg).

Os cadáveres e resíduos provenientes da eutanásia foram posteriormente incinerados.

2.13- COLHEITA DO MATERIAL

Após dissecação meticulosa dos tecidos moles foi efectuada a colheita *en bloc* do material em estudo (Fig. 16). Para o corte do crânio utilizou-se uma serra mecanizada com refrigeração, tendo-se o cuidado de garantir que as margens da peça ficassem a uma distância segura dos defeitos a estudar. De seguida, as peças obtidas foram preparadas para processamento histológico.

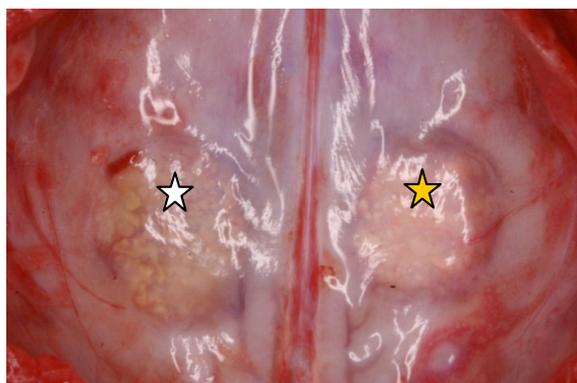


Fig. 16. Vista inferior endocraniana com defeito preenchido com o material a testar (☆) e o xenoenxerto de origem bovina (Bio-Oss®) (★)

2.14 -NECROPSIA DOS ANIMAIS

A sua realização pretendeu avaliar o eventual impacto sistémico dos materiais em estudo. Após exame macroscópico dos cadáveres foram colhidos fragmentos do coração, fígado, rins, pulmões, gânglios linfáticos e baço para análise histológica.

2.15-MÉTODOS DE ANÁLISE

2.15.1 – RADIOGRAFIA DIGITAL DIRECTA

Imediatamente após a eutanásia, os defeitos ósseos foram radiografados através de uma técnica radiográfica convencional com uma incidência ortogonal nas calotes cranianas

Este procedimento foi efectuado de uma forma padronizada, com uma distancia constante entre o objecto e o filme. Utilizaram-se filmes radiográficos de elevado contraste com 5 x 7 cm (Kodak Ektaspeed Intraoral film, Eastman Kodak, Rochester, NY). O aparelho radiográfico utilizado (Orix AET IM 82, Ardet, Italia) produzia ate 65 kV, para uma intensidade de corrente de 8 mA e dispunha de um cone com 20 cm de comprimento. Foi utilizado um tempo de exposição de 0,2 segundos. As imagens assim obtidas foram analisadas qualitativamente.

2.15.2 – ANÁLISE HISTOLÓGICA QUALITATIVA

A análise qualitativa baseou-se na avaliação do processo de cicatrização óssea, dos perfis morfológicos dos elementos celulares, nas características da interface osso/materiais implantados e da resposta inflamatória. Foi efectuada em microscopia óptica, através de um estereomicroscopio (NikonR SMZ 1500, Japao) com dispositivo de reforço de luz por fibra (IntraluxR 5000-I, Volpi, Suica), e num microscopio óptico de campo claro (NikonR Eclipse 600, Japao). Ambos com capacidade de conexão a equipamento fotográfico convencional (NikonR FDX-35, com sensor multiponto NikonR U-III) e digital (NikonR Coolpix 4500), bem como a câmara de vídeo digital (OptronicsR DEI 750D CE, Goleta, California, Estados Unidos da America), com sinal NTSC, ligada a um monitor (SonyR Trinitron, Japao).

A preparação das amostras para estudo histológico foi efectuada recorrendo-se à técnica não-descalcificada.

Esta preparação foi efectuada no Laboratório de Histologia de Tecidos Duros, do Departamento de Medicina Dentária, Estomatologia e Cirurgia Maxilo-Facial da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, de acordo com o protocolo desenvolvido pelo Professor Doutor Karl Donath do Instituto de Patologia da Universidade de Hamburgo, Alemanha^{183, 184}. O desenvolvimento desta técnica foi baseado no sistema de alta precisão Exakt® (Exakt® - Apparatebau, GmbH&CO, Norderstedt, Hamburgo, Alemanha). Este procedimento desenvolve-se ao longo das seguintes etapas: fixação e desidratação; infiltração e polimerização; corte inicial da amostra; montagem da amostra; polimento inicial da amostra (*facing*); montagem do slide final (técnica da sanduíche); corte e polimento final da amostra e coloração.

2.15.2.1- FIXAÇÃO E DESIDRATAÇÃO

Após colhidas e radiografadas as amostras foram fixadas através de imersão numa solução de formaldeído a 10% em tampão fosfato (FNT), durante 48h, num pH 7,4 (Fig.17). Terminada a fixação procedeu-se à desidratação, com agitação contínua, numa unidade de agitação e infiltração (Exact® 510), com passagem por uma série crescente de concentrações de etanol (60%, 80%, 96% e duas vezes a 100%), durante o período recomendado.

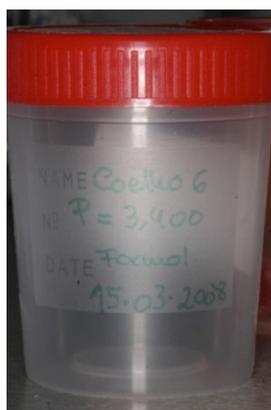


Fig. 17. Fixação dos tecidos com FNT

2.15.2.2- INFILTRAÇÃO E POLIMERIZAÇÃO

Após fixação e desidratação procedeu-se à infiltração, igualmente com agitação contínua, em soluções crescentes de resina de metilmetacrilato em etanol (resina/álcool: 30/70%, 50/50%, 70/30%) terminando com duas passagens em 100% de resina. Nesta fase é importante que a maior superfície possível da amostra esteja em contacto com o meio infiltrativo. Para este procedimento utilizou-se a unidade anteriormente mencionada.

Seguiu-se a embebição, utilizando para tal a mesma resina de metilmetacrilato (Technovit® 7200 VLC, Kulzer) e subsequente fotopolimerização na respectiva unidade de polimerização (Exact® 520), com sistema de arrefecimento e em moldes de plástico. A polimerização foi efectuada de forma controlada, durante 8h, em 2 fases sequenciais de luz branca e luz azul, tentando, assim, minimizar os eventuais artefactos decorrentes desta etapa.

2.15.2.3- CORTE INICIAL DA AMOSTRA

As amostras incluídas nos blocos de resina foram cortadas recorrendo à respectiva unidade do sistema Exakt® (Exakt® 310 CP). Este corte foi efectuado de acordo com a orientação desejada para preparação da lâmina.



Fig 18. Corte coronal do bloco de resina contendo a amostra. **Fig. 19.** Lâmina de corte coronal craniano contendo a amostra.

Da amostra inicial obtiveram-se, de cada defeito ósseo, dois corte: um coronal e outro transversal. (Figs 18 e 19).

2.15.2.4- MONTAGEM DA AMOSTRA

Os cortes efectuados a partir da amostra inicial foram preparados e montados numa primeira lâmina acrílica (slide A) (50x100x1,5mm) (Fig. 19), em prensa com fixação a vácuo. Para tal utilizou-se outro metilmetacrilato específico (Technovit® 4000 VLC, Kulzer).

2.15.2.5- POLIMENTO INICIAL DA AMOSTRA (*facing*)

Esta etapa foi executada na polidora do sistema Exakt® (Exakt® 400 CS).

Tem por objectivo obter superfícies paralelas das áreas em estudo, de forma a facilitar a posterior execução das técnicas de corte e polimento final

2.15.2.6- MONTAGEM DO SLIDE FINAL (Técnica de Sanduíche)

As lâminas finais foram preparadas pela técnica de sanduíche. Nesta técnica o lado livre da amostra que contém a área de estudo e oposto ao slide A, foi colado a uma segunda lâmina acrílica (slide B) (25x75x1,5 mm), recorrendo-se a uma resina fotopolimerizável específica (Technovit® 7210 VLC, Kulzer). Este conjunto foi montado em prensa com vácuo e lâmpada polimerizadora (Fig.20).

2.15.2.7- CORTE E POLIMENTO FINAL

Para esta etapa utilizou-se um sistema de corte de precisão com dispositivo de irrigação.

Este sistema é constituído por uma unidade de corte de precisão, com regulação de velocidade e dispositivo de irrigação, baseado no princípio de corte por ponto de contacto com serra de banda de 100 µm (Exakt® 310 CP), e por uma polidora de prato rotativo de velocidade regulável com irrigação (Exakt® 400 CS); ambos com fixadores por vácuo dos blocos e laminas. A unidade de corte dispõe de um sistema de paralelismo, onde se fixam as laminas, com plataforma móvel e de oscilação em arco pré-fixada e controlada eletronicamente (14°, 28° e 56°), bem como de um ponteiro laser de orientação para assegurar o correcto paralelismo de cortes sucessivos e uma adequada espessura. Os cortes são feitos pela acção de um peso de 50 gr. aplicado de forma constante a referida plataforma. Por sua vez, a polidora regula a uniformização da espessura final das amostras através de um sensor electrónico (AW 100 Electronic Measuring System). O polimento é executado com a aplicação de pesos, entre os 100 e os 200 gr., na coluna de fixação da amostra, que se move em vaivém em veios de rosca sem fim.



Fig.20- Prensa fotopolimerizadora para montagem da segunda lâmina pela técnica de sanduíche.



Fig. 21- Corte de precisão por ponto de contacto da sanduíche com serra de de banda diamantada.

Nesta etapa cortou-se a sanduíche com uma espessura fina no lado da amostra mais próximo do slide B. A espessura final de 50 μ m foi obtida através de polimento calibrado com discos de diamante de granulometria decrescente (800, 1000, 1200, 2500 e 4000; Hermes®, Alemanha) (Fig. 22). Todas as medições de controlo foram realizadas com micrómetro digital (Mitutoyo® 2093, Digimatic Micrometer, Japao) (Fig.23).



Fig.22-Polimento final da segunda lâmina.



Fig. 23- Micrómetro digital para controlo da espessura final da lâmina.

2 15.2.8- COLORAÇÃO

Foi executada a coloração com azul de Toluidina dos tecidos duros representados na lâmina final. Esta técnica recorre a um corante básico e cora os componentes ácidos com distintas gradações de azul. Assim, é possível

distinguir entre tecido osteóide e tecido ósseo mineralizado bem como o componente celular.

Devido à sua metacromasia permite estabelecer conclusões sobre aposição e reabsorção óssea.

Trata-se de uma técnica simples e rápida que se baseia nas seguintes etapas: agitação das amostras em 10% de água oxigenada durante 5 minutos; seguida de lavagem com água; secagem; coloração com solução de azul e Toluidina durante 20 minutos; nova lavagem com água e, finalmente, uma cuidadosa secagem final.

Durante a execução desta etapa é assegurada uma correcta identificação da amostra compreendendo o número do animal, a localização do defeito, a designação do estudo e o número do corte.

2.15.3- ANÁLISE EM MICROSCOPIA DE LUZ

A análise qualitativa baseou-se na avaliação do processo de cicatrização óssea, dos perfis morfológicos dos elementos celulares, nas características da interface osso/materiais implantados e da resposta inflamatória. Foi efectuada em microscopia óptica, através de um estereomicroscópio (NikonR SMZ 1500, Japão) com dispositivo de reforço de luz por fibra (IntraluxR 5000-I, Volpi, Suíça), e num microscópio óptico de campo claro (NikonR Eclipse 600, Japão). Ambos com capacidade de conexão a equipamento fotográfico convencional (NikonR FDX-35, com sensor multiponto NikonR U-III) e digital (NikonR Coolpix 4500), bem como a câmara de vídeo digital (OptronicsR DEI 750D CE, Goleta, Califórnia, Estados Unidos da América), com sinal NTSC, ligada a um monitor (SonyR Trinitron, Japão).



Fig. 24 - Equipamento de microscopia de luz e análise de imagem do Departamento de Medicina Dentária da FMUC.

3-RESULTADOS

3.1- OBSERVAÇÕES CLÍNICAS

3.2- ASPECTOS MACROSCÓPICOS

3.3- VARIAÇÃO NO PESO CORPORAL

3.4- NECRPSIA

3.5- RADIOGRAFIA CONVENCIONAL

3.6- RESULTADOS COM MICROSCOPIA DE LUZ

3.1- OBSERVAÇÕES CLÍNICAS

Todos os animais apresentaram uma adequada recuperação anestésica e mantiveram-se saudáveis ao longo de todo o período experimental, sem evidência de sinais de complicações pós-operatórias. No controlo diário efectuado pelo técnico de manutenção animal não foi detectada qualquer situação de sofrimento, dor, infecção, convulsão, alteração respiratória, paralisia ou qualquer outro tipo de patologia durante o restante período de experimentação.

3.2- ASPECTOS MACROSCÓPICOS

No local cirúrgico não foram detectados, macroscopicamente, quaisquer sinais de inflamação ou infecção ao longo de todo o período experimental. Nenhum dos coelhos apresentava a zona da sutura com deiscência, constatando-se também uma evolução normal do processo cicatricial, com uma boa tolerância dos tecidos em redor dos defeitos.

A colheita dos crânios foi executada *en bloc* sendo removida a pele e tecidos moles, não sendo visíveis quaisquer processos inflamatório ou infecciosos.

3.3- VARIAÇÃO PESO CORPORAL

As variações de peso dos animais durante o período de estudo e a rápida recuperação dos comportamentos etológicos desta espécie, revelaram uma correcta recuperação pós-operatória e um reduzido impacto do protocolo experimental na saúde e bem-estar dos animais.

3.4- NECROPSIA

Macroscopicamente os órgãos alvo observados (fígado, coração, rins, pulmões, baço e gânglios linfáticos da cadeia loco-regional) não apresentaram nenhuma alteração. O exame histopatológico efectuado não revelou a existência de quaisquer alterações anátomo-patológicas.

3.5- RADIOGRAFIA CONVENCIONAL

A radiografia convencional não teve por objectivo obter resultados quantitativos, mas antes avaliar qualitativamente se houve, ou não, o uniforme preenchimento dos defeitos. Todos os defeitos apresentavam um preenchimento uniforme não se tendo verificado o extravasamento de nenhum dos biomateriais utilizados.

3.6- RESULTADOS EM MICROSCOPIA DE LUZ

Como o objectivo primário deste estudo visava a avaliação do comportamento biológico de diferentes materiais de regeneração óssea, julgou-se conveniente passar a fase de hemorragia e inflamação, comum a todos os processos de cicatrização e iniciar os estudos histológicos apenas a partir dos quinze dias pós-operatórios.

As imagens histológicas apresentadas demonstraram que a metodologia seguida na preparação do material foi bem sucedida, proporcionando a obtenção de cortes de material bem preservado e de boa qualidade.

De forma a dar uma sequência de continuidade aos trabalhos experimentais e, ao mesmo tempo, uma perspectiva lógica dos fenómenos biológicos associados a cada variante em estudo, pareceu-nos mais indicado iniciar a apresentação dos resultados pelos defeitos sem preenchimento e em seguida pelos preenchidos com osso autólogo. Os defeitos sem preenchimento - controlo negativo – estão essencialmente relacionados com as reacções atribuídas particularmente ao traumatismo cirúrgico. Os defeitos preenchidos com o osso autólogo – controlo positivo – atestam a validação da técnica utilizada.

Posteriormente apresentam-se os defeitos preenchidos com um xenoenxerto de origem bovina (BioOss®), funcionando como uma hidroxiapatite natural bastante próxima ao osso autógeno, ainda que sem o seu componente osteogénico e osteoindutivo, e que permite estabelecer uma ponte com um material quimicamente semelhante, mas de origem sintética. Finalmente serão descritos os resultados obtidos

com as partículas de hidroxiapatite sintética, que constituem a principal finalidade do presente trabalho experimental.

Procederemos inicialmente à descrição das secções coronais e posteriormente das horizontais. As secções coronais permitem-nos ver os limites superior (*pericranium*) e inferior (*endocranium*) do defeito, bem como as suas margens sagital ou mediana e externa. Nas secções horizontais, devido à acentuada convexidade do crânio, por vezes, não nos foi possível avaliar a totalidade do semicírculo do defeito.

Optámos por documentar este trabalho com numerosas imagens microfotográficas, em vez de uma extensa descrição, acreditando que a imagem nos transmite uma informação mais completa e pormenorizada do que uma vasta exposição, que poderia tornar a leitura de presente trabalho mais fastidiosa.

3.6.1 – Defeitos ósseos sem preenchimento (Controlo Negativo)

Na análise histológica das **secções coronais** dos defeitos sem preenchimento verificou-se um colapso dos tecidos moles no espaço do defeito, mais acentuado na área central. O tecido conjuntivo presente no defeito é mais denso junto ao *endocranium*, assumindo uma aparência mais laxa junto ao *pericranium*.

Dois semanas: Aos quinze dias (Fig.1) constata-se a presença de algumas áreas marginais de tecido ósseo imaturo, formadas certamente como resposta ao traumatismo cirúrgico, sendo porém, a presença de tecido conjuntivo fibroso o aspecto mais saliente. Nas zonas mais periféricas dos defeitos é notória a existência de algumas estruturas ósseas projectando-se em cone com a base assente no osso marginal, pressupondo um crescimento centrípeto. Junto à margem externa do defeito há maior densidade de formações ósseas do que junto à margem sagital ou mediana (figs. 2a e 2b).

As trabéculas ósseas existentes neste período, formadas por um processo de ossificação intramembranoso (figs. 3, 4 e 5), ainda que constituídas maioritariamente por áreas de tecido ósseo imaturo, apresentam, no entanto, algumas zonas de tecido lamelar. O tecido ósseo imaturo (fig.4) é caracterizado por uma grande densidade de osteócitos arredondados e por uma disposição bastante anárquica das fibras de colagénio. Esta matriz óssea, por ser muito rica em glicosaminoglicanos, apresenta

uma afinidade tintorial diferente. O tecido ósseo lamelar (fig.4), quando existente, localiza-se à periferia do tecido imaturo.

Foi ainda possível observar a existência de alguns centros de ossificação localizados na zona mais central do defeito, com uma forma circular ou ovóide (figs 1 e 6). Estas pequenas “ilhas” não parecem possuir qualquer relação com o crescimento ósseo observado na periferia dos defeitos, localizando-se preferencialmente mais próximos do *endocranium*.

Neste período é nítida a existência de uma linha de demarcação entre o tecido ósseo do hospedeiro e o tecido ósseo de formação recente (fig.5), sendo possível notar as suas diferentes características histológicas.

Nas **secções horizontais** verificámos, também, a presença de algumas trabéculas ósseas de neoformação e a nítida transição entre o tecido ósseo original e o novo tecido ósseo (fig.7). É importante assinalar na parede do defeito a existência de numerosos cones de reabsorção (figs 7 e 8) traduzindo um intenso processo de remodelação óssea. Foi também possível identificar populações celulares com perfil de células osteoprogenitoras, bem como osteoblastos (fig 8) em activo processo de formação de osteóide. Este conjunto de imagens demonstra uma intensa actividade de reabsorção/formação de tecido ósseo na parede do defeito.

De notar a presença de espaços (fig.8) de dimensões consideráveis entre as trabéculas de novo tecido ósseo, ocupados por tecido conjuntivo laxo, nos quais encontramos vasos sanguíneos.

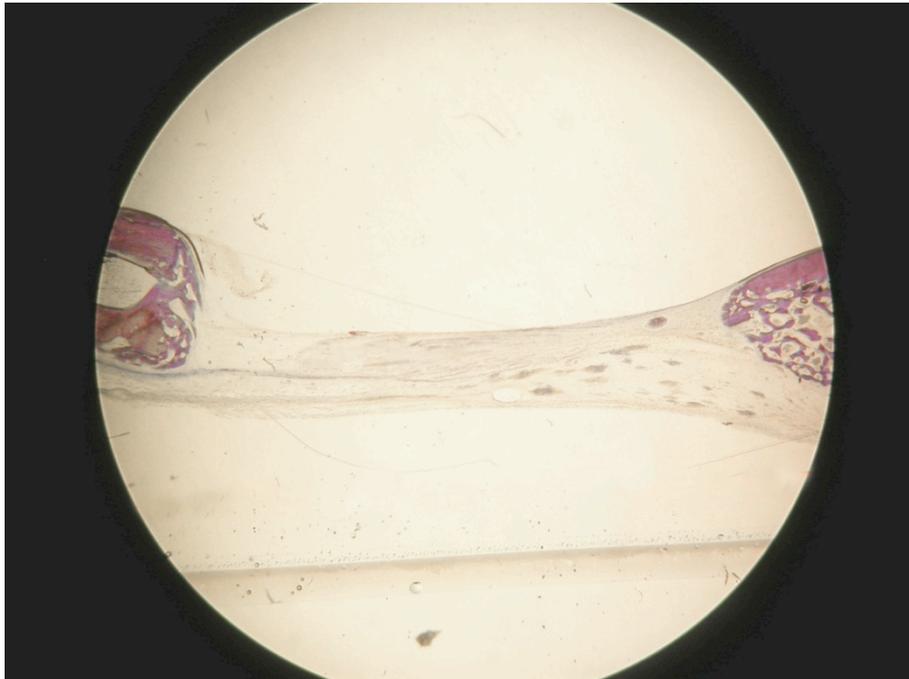


Figura 1- Corte histológico coronal do defeito ósseo sem preenchimento mostrando, aos quinze dias, para além de um pequeno reforço ósseo marginal a presença de alguns pequenos centros de ossificação no seio de tecido conjuntivo. 20 x no original

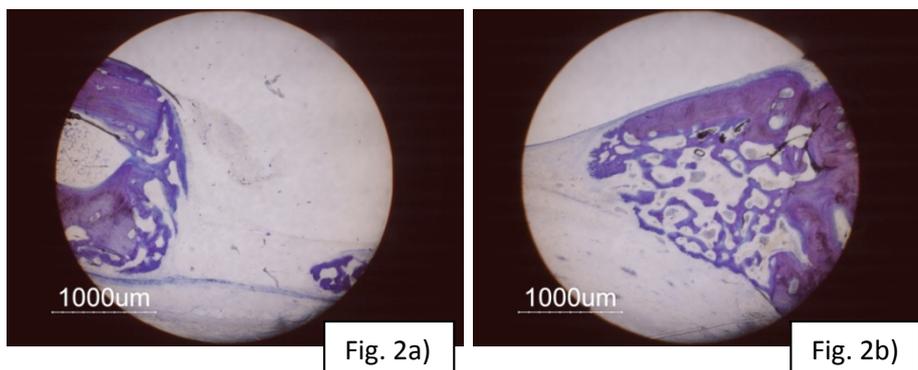


Figura 2) Maior ampliação da imagem anterior

Figura 2 a) – Aspecto da margem mediana mostrando uma menor formação de tecido ósseo, quando comparado com a margem externa.

Figura 2 b) -Aspecto da margem externa apresentando uma razoável densidade de trabéculas ósseas.

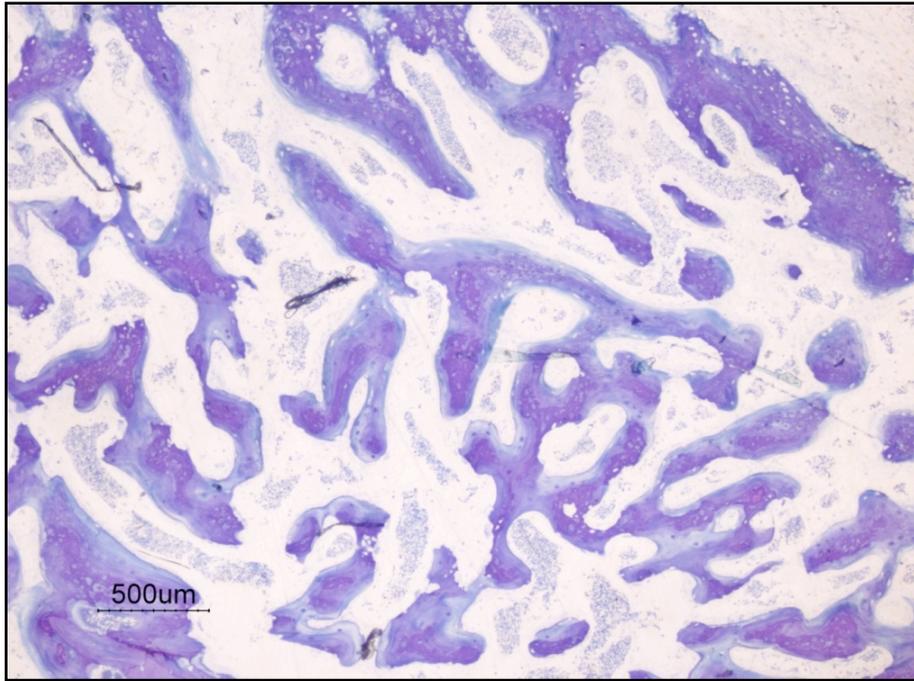


Figura 3 - Trabéculas ósseas formadas no seio de um tecido conjuntivo laxo muito vascularizado, num defeito ósseo sem preenchimento com quinze dias de evolução.

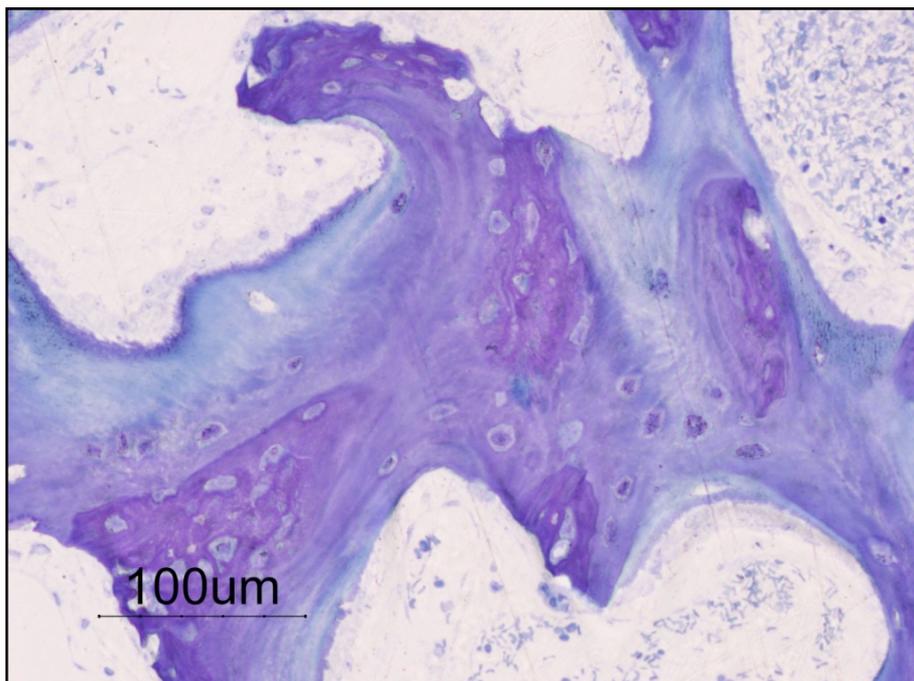


Figura 4 - Áreas de tecido ósseo imaturo, caracterizado por uma grande densidade celular e diferente afinidade tintorial rodeado por um tecido lamelar. É também visível a presença de osteóide e de osteoblastos.

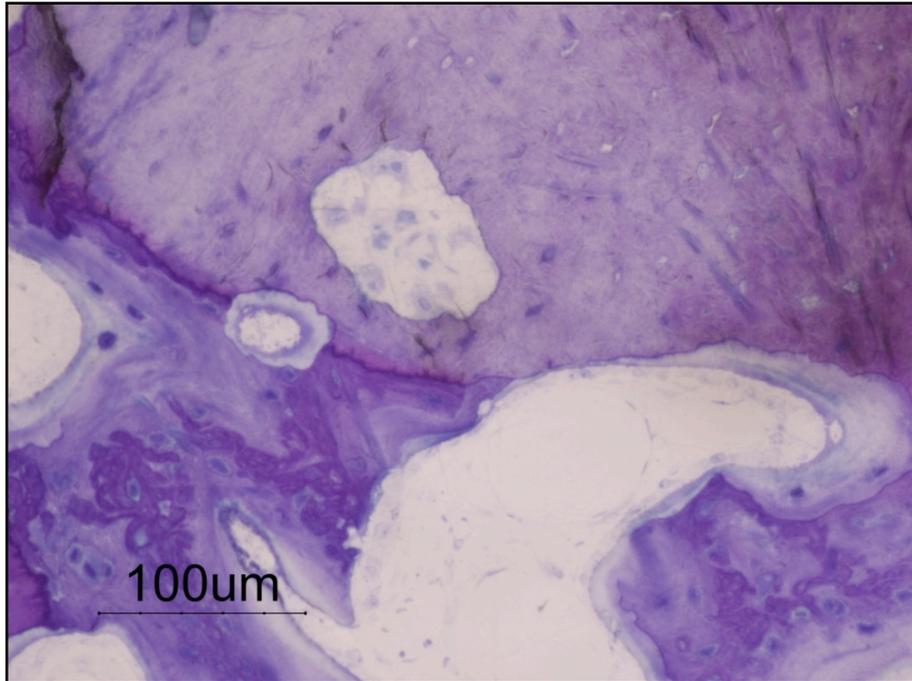


Figura 5 - Aspecto da margem de um defeito sem preenchimento, com quinze dias de evolução, mostrando uma nítida demarcação histológica entre o tecido ósseo que constitui a parede do defeito e o tecido ósseo de formação recente. É ainda possível observar a presença de um cone de reabsorção óssea.

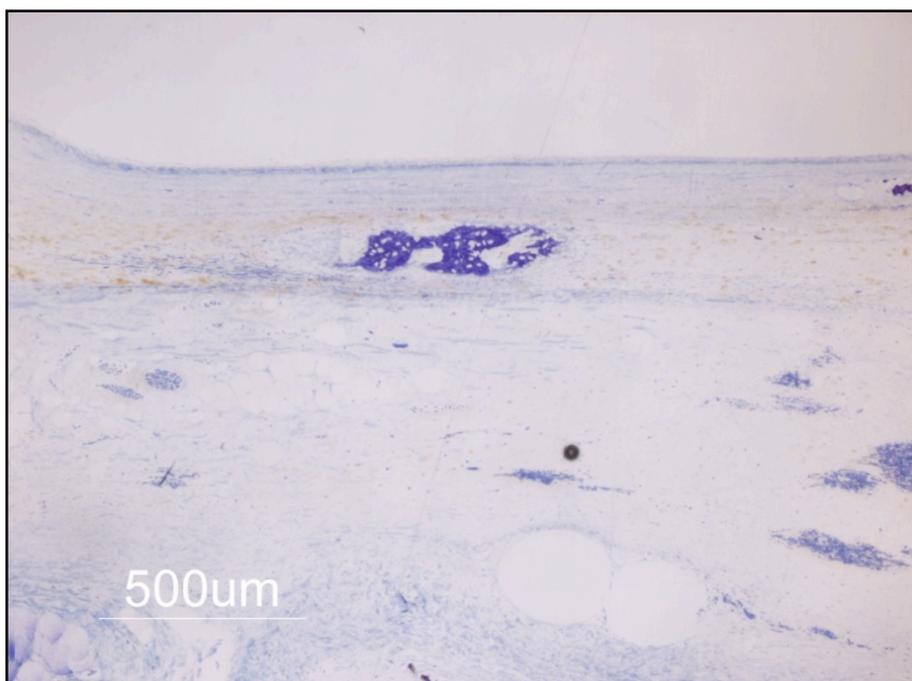


Figura 6 – Presença de pequenos centros de ossificação (“ilhas”) situadas no centro de um defeito sem preenchimento aos quinze dias.

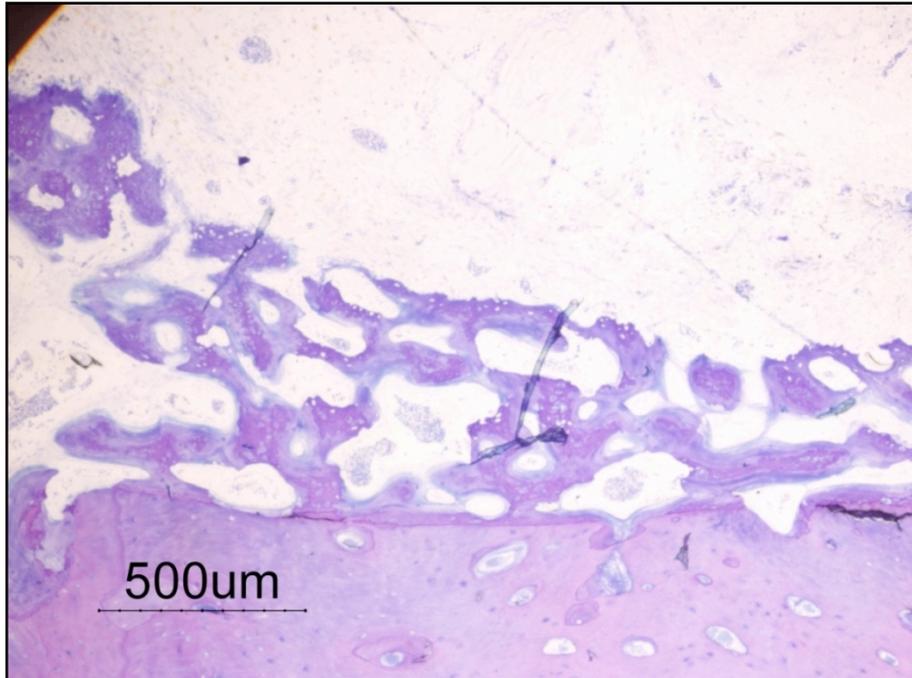


Figura 7 – Corte horizontal de um defeito ósseo sem preenchimento, evidenciando uma certa formação de trabéculas de tecido ósseo bastante distintas da parede óssea original

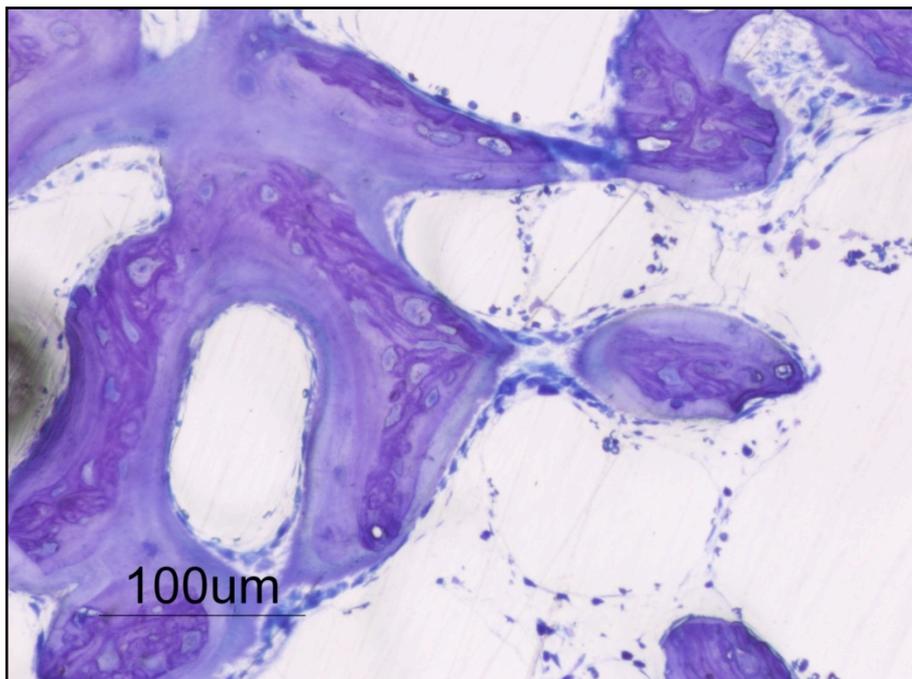


Figura 8- Presença de algumas trabéculas ósseas constituídas por tecido imaturo e lamelar, rodeadas por células da linha osteoblástica e separadas por tecido conjuntivo laxo.

Quatro semanas: De acordo com o que era expectável, não se verificou o encerramento de nenhum dos defeitos, ficando muito longe disso. Com efeito, observa-se sempre a existência de uma grande quantidade de tecido fibroso, particularmente evidente na zona central do defeito.

Nas **secções coronais**, relativamente ao período anterior, verificamos a presença de uma maior quantidade de tecido ósseo. De facto, parece notar-se um aumento do cone de crescimento no sentido central do defeito e alguma maturação deste tecido. Este cone (fig. 9 e 10), com base para a margem do defeito e vértice no sentido interno, parece ter aumentado tanto em espessura como em comprimento, quando comparado com os quinze dias. Na zona periférica do defeito as trabéculas ósseas apresentam já uma menor quantidade de tecido ósseo imaturo e maior deposição de tecido ósseo lamelar (fig. 11)

Em comparação ao que foi observado às duas semanas, constatámos um incremento das “ilhas” de tecido ósseo, localizadas em zonas afastadas da periferia do defeito. A formação de tecido ósseo continuou a ser mais notória na margem externa, relativamente à margem sagital, verificando-se o aparecimento de medula óssea (fig 11) localizada no espaço entre as trabéculas ósseas.

Nas **secções horizontais** confirma-se o crescimento de trabéculas ósseas, projectando-se sempre em direcção centrípeta ficando, porém, bem perto da margem do defeito (fig.12). Na zona mais central é já bem evidente a presença de grandes áreas de medula óssea.

Em síntese, nos defeitos sem preenchimento não se verificou em nenhum dos casos estudados, um completo e adequado encerramento, nem mesmo a sua iminência. Na verdade constatou-se sempre a persistência de uma grande quantidade de tecido fibroso apresentando apenas um pequeno reforço ósseo nas margens dos defeitos. A maioria dos defeitos apresentam-se constituídos por uma fina ponte fibrótica originando o colapso dos tecidos moles.



Figura 9 - Aspecto de um cone de crescimento ósseo na margem externa do defeito sem preenchimento com quatro semanas de evolução.

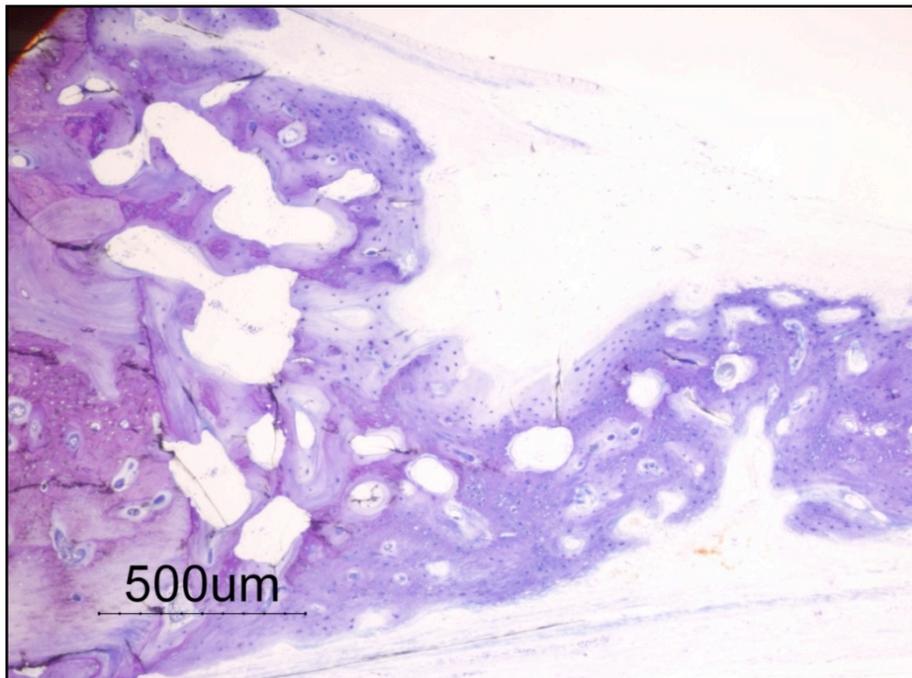


Figura 10 – Imagem da margem mediana de um defeito sem preenchimento ósseo, com quatro semanas de evolução, mostrando uma razoável formação de tecido ósseo, com maior desenvolvimento próximo ao *endocranium*.

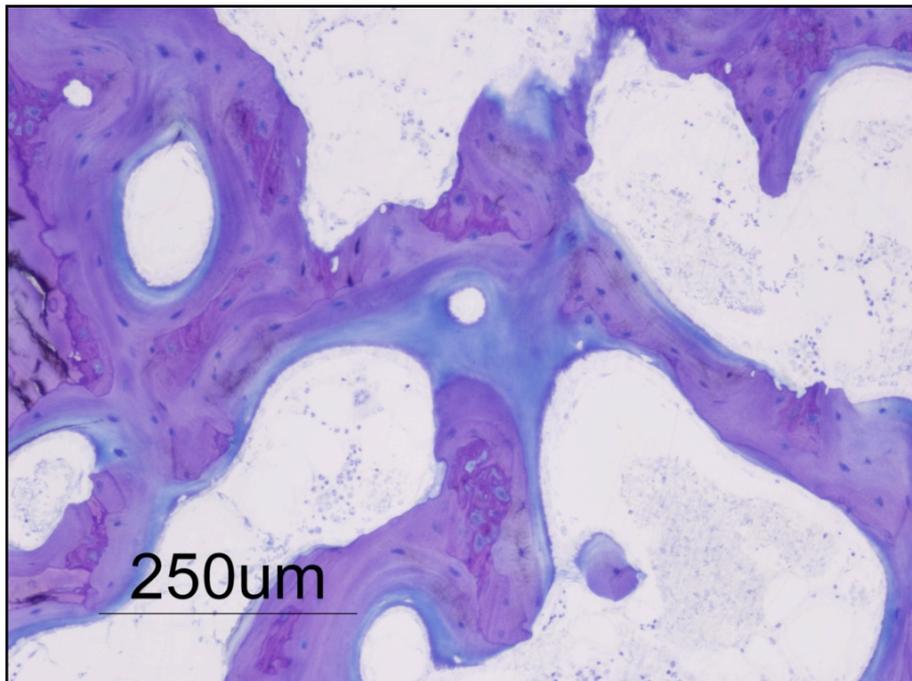


Figura 11- Rede de trabéculas ósseas constituídas por áreas de tecido imaturo e áreas de tecido lamelar. É visível a existência de medula óssea ocupando o espaço entre as trabéculas.

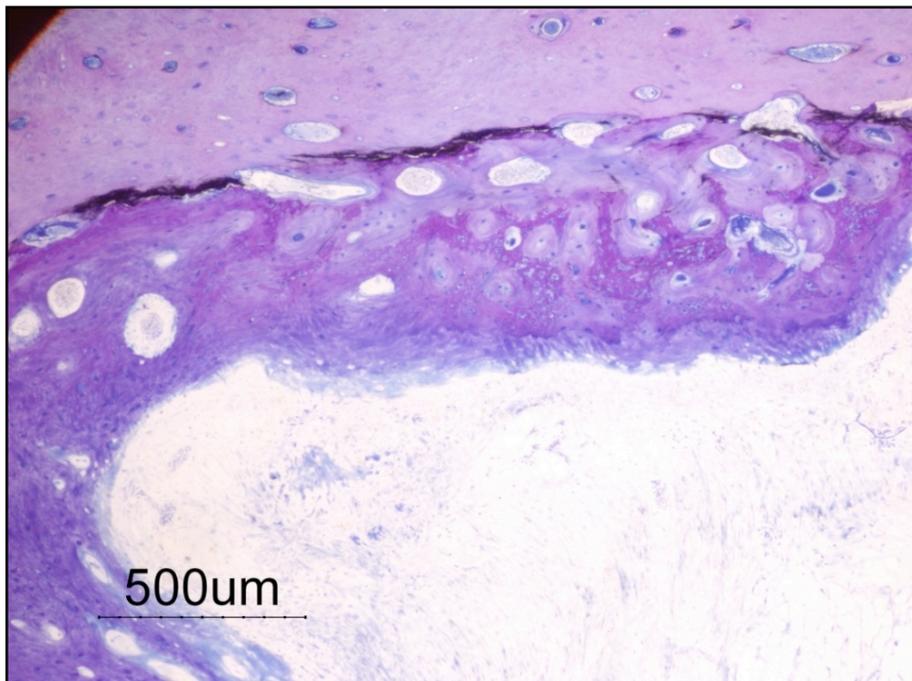


Figura 12- Corte horizontal de um defeito sem preenchimento, com quatro semanas de evolução, evidenciando a limitada espessura do novo tecido ósseo formado.

1.6.2 – Defeitos ósseos preenchidos com fragmentos de osso autógeno (controlo positivo)

Os fragmentos de osso autógeno presentes nos defeitos ósseos apresentam uma distribuição bastante uniforme e um adequado espaçamento entre si. É, no entanto, visível alguma disparidade no tamanho das partículas, apresentando algumas delas uma dimensão superior à das partículas utilizadas nas outras variantes.

Dois semanas: As **secções coronais** (fig. 13) apresentam inúmeras trabéculas ósseas contendo fragmentos de enxerto autógeno perfeitamente osteointegrados, formadas por um processo de ossificação intramembranosa. A existência de osteócitos no interior dos fragmentos é demonstrativa da viabilidade do enxerto. É frequente a aposição de tecido ósseo imaturo em contacto directo com estes fragmentos ósseos e ainda a presença de algumas áreas de tecido ósseo lamelar (figs.14 e 15). Por outro lado observa-se também um aspecto festoneado da superfície de alguns fragmentos de enxerto ósseo (figs.14 e 15), possivelmente devido a uma acção osteoclástica prévia. Verifica-se igualmente o aparecimento de muitas trabéculas ósseas (fig.16) formando pontes de união entre vários fragmentos ósseos, em fases diferentes do processo de formação de novo tecido ósseo, ocorrendo, por vezes, a ligação (“*bridging*”) entre as margens do defeito.

Os centros de ossificação são mais evidentes e em maior número no lado da dura-máter (*endocranium*). Entre as trabéculas ósseas encontra-se muito tecido conjuntivo laxo, bastante vascularizado (fig.14), observando-se já algumas áreas de medula óssea. É notória a existência de uma linha de demarcação entre o osso original e o novo osso.

As **secções horizontais** põe em evidência a formação de novo tecido ósseo progredindo numa orientação centrípeta (fig.17) a partir das margens do defeito. Os fragmentos de osso autógeno encontram-se envolvidos e integrados por novo tecido ósseo (fig.18), formando no seu conjunto uma rede de trabéculas separadas entre si por espaços ocupados por tecido conjuntivo.

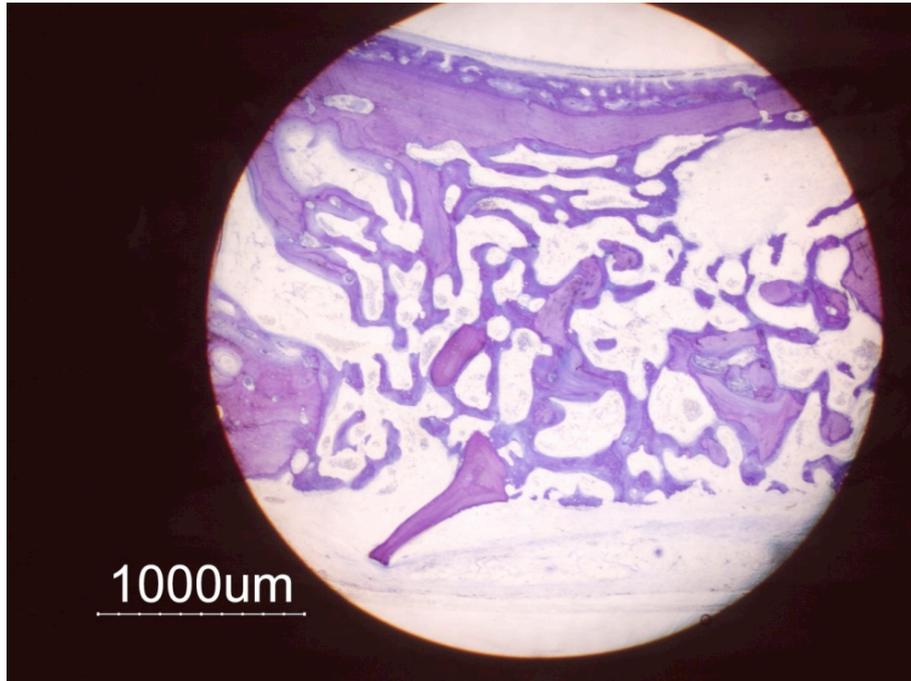


Figura 13 – Corte histológico coronal de um defeito ósseo preenchido com osso autogeno aos quinze dias de evolução. É visível uma grande profusão de tabéculas ósseas envolvendo e ligando os fragmentos constituintes do enxerto.

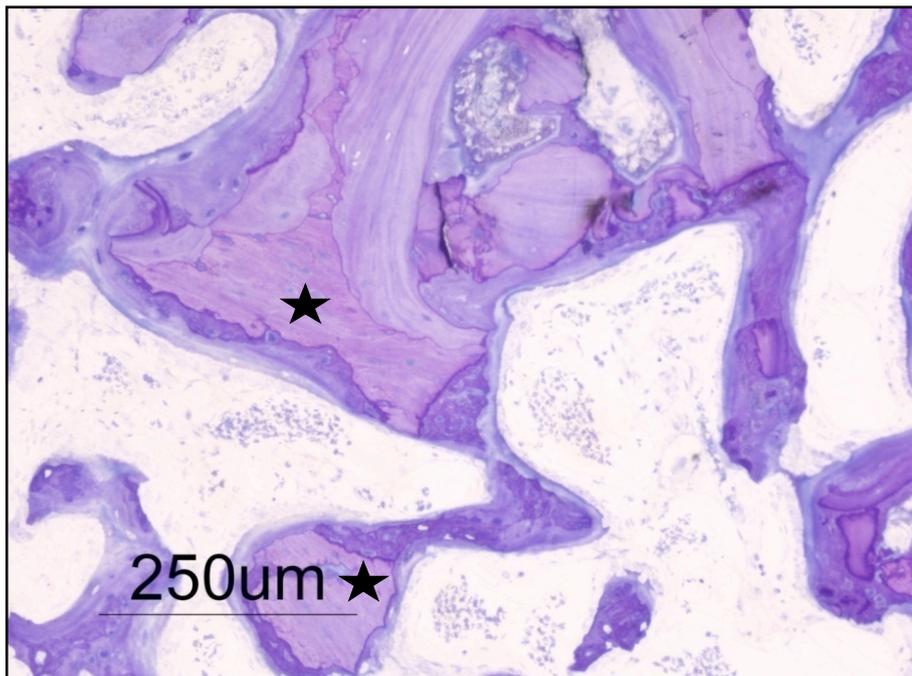


Figura 14 – Aspecto da nítida aposição de tecido ósseo imaturo em contacto directo com alguns fragmentos de enxerto (★), sendo possível observar a existência de osteócitos viáveis no seu interior. É também visível a presença de inúmeras linhas de reversão e o aparecimento de tecido ósseo lamelar.

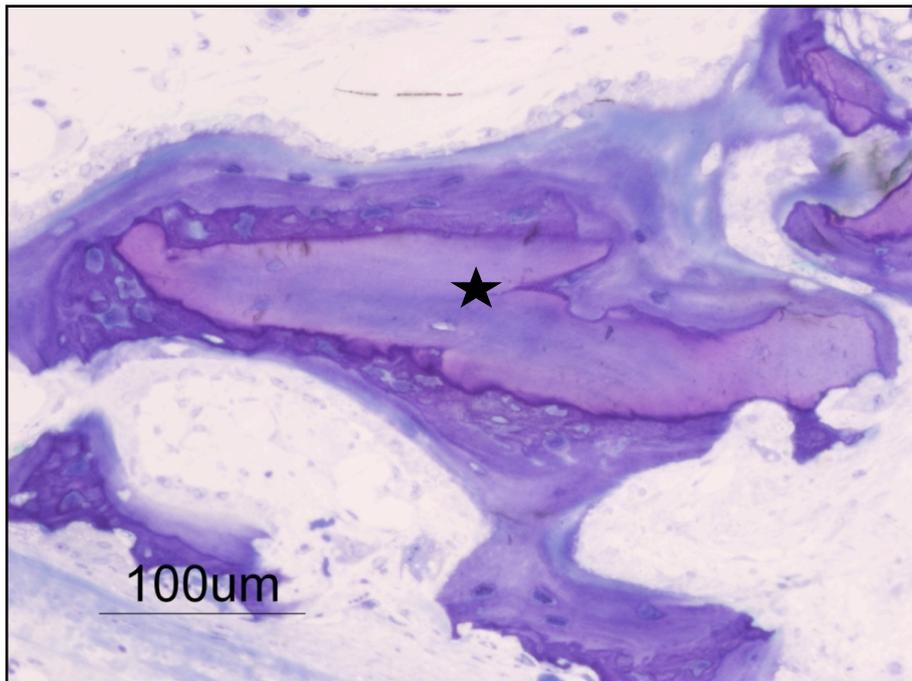


Figura 15- Aspecto das diferentes características histológicas do autoenxerto (★), aos quinze dias de evolução, do tecido ósseo imaturo e do tecido ósseo lamelar em fase de formação com osteoblastos e osteóide.

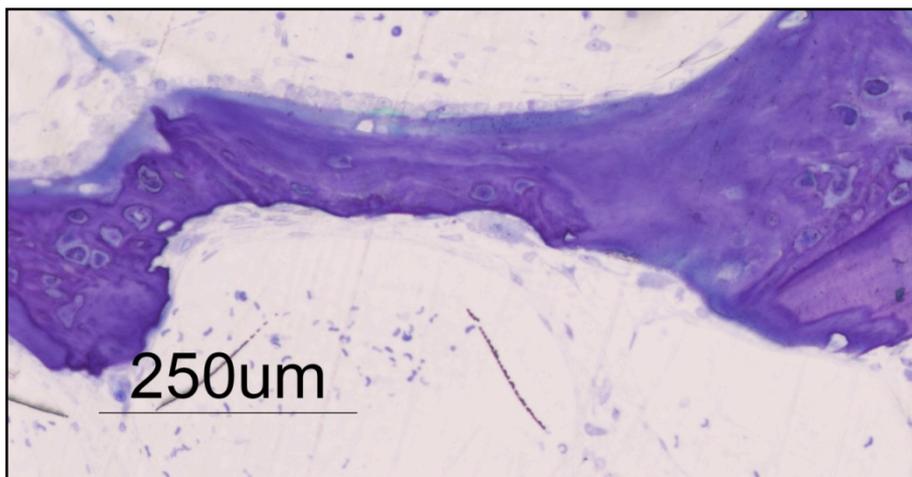


Figura 16 – Trabécula óssea mostrando simultâneamente um claro processo de osteogênese, com osteoblastos e osteóide, bem como numerosas lacunas de Howship, algumas ainda com a presença de osteoclastos, reflectindo um nítido processo de reabsorção.

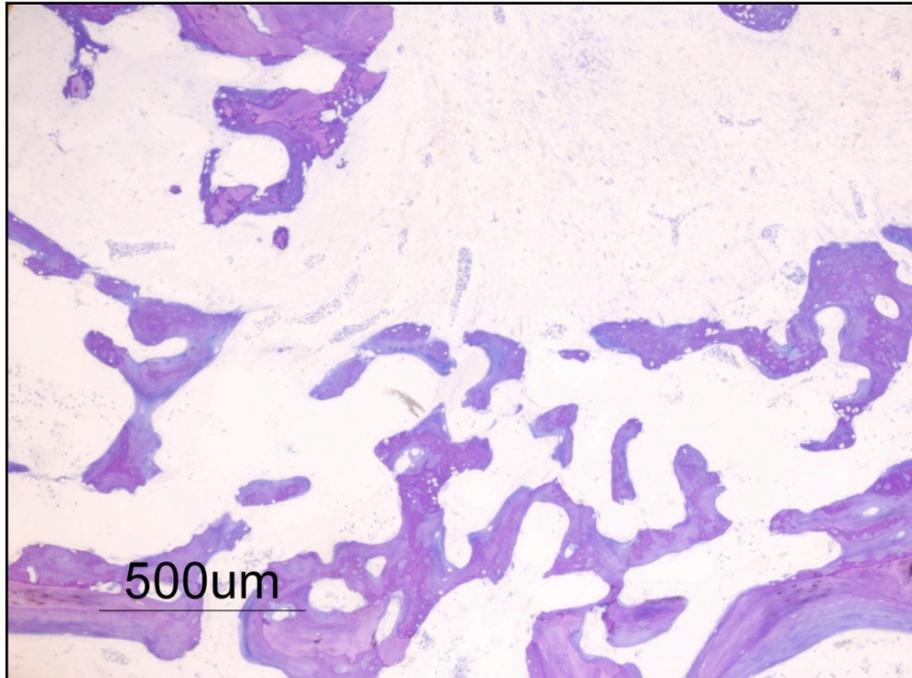


Figura 17 – Secção horizontal de um defeito preenchido por autoenxerto, aos quinze dias de evolução, mostrando a presença de inúmeras trabéculas ósseas com uma orientação centrípeta.

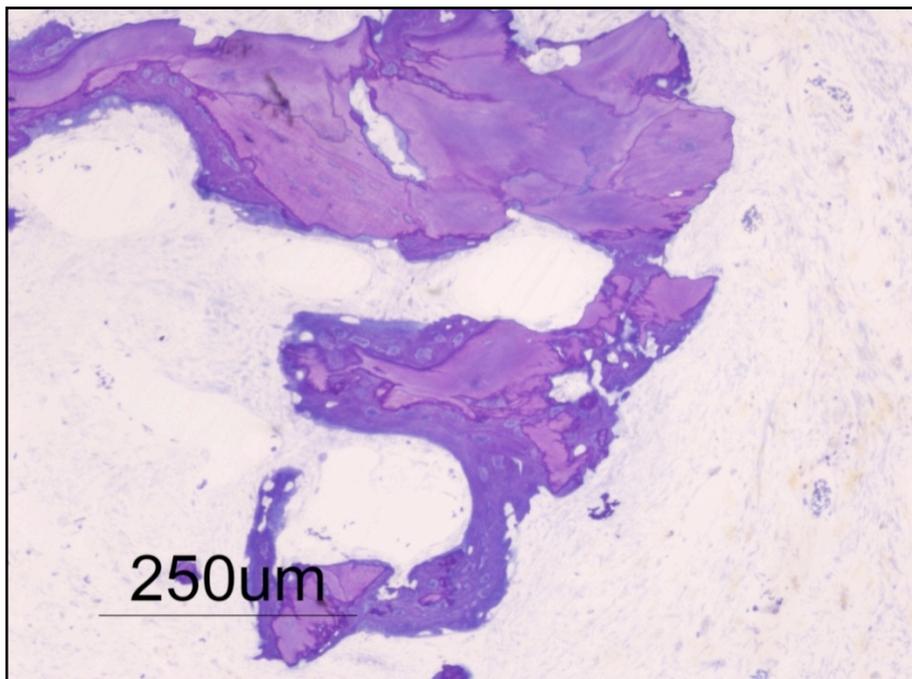


Figura 18 – Maior ampliação de uma zona representada na figura anterior pondo em evidência áreas de tecido ósseo imaturo envolvendo e ligando vários fragmentos do autoenxerto.

Quatro semanas: As **secções coronais**, em relação ao que foi observado às duas semanas, mostram uma maior quantidade de trabéculas de novo tecido ósseo (fig. 19). Verifica-se também uma maior e melhor osteointegração dos fragmentos do enxerto, bastante evidente ao longo de todo o defeito, com grandes áreas de tecido ósseo lamelar e apenas alguns vestígios de tecido ósseo imaturo (figs 19 e 20). Foi possível observar a presença de numerosas trabéculas ósseas já com uma arquitetura bastante semelhante a qualquer tecido ósseo maturo (fig. 21), apresentando acentuados processos de remodelação (fig. 22). Muitas trabéculas formam pontes de ligação entre os diferentes fragmentos de enxerto. É visível e nítido o aparecimento e desenvolvimento de áreas de medula óssea. Mantém-se a viabilidade dos fragmentos de autoenxerto, traduzida pela existência de osteócitos nas lacunas.

A reorganização do pericranium e do endocranium foi notória (fig.19).

Nas **secções horizontais** é, mais uma vez, visível um intenso processo de formação óssea (fig. 24) resultando no aparecimento de trabéculas contendo cada vez mais tecido lamelar. Estas estruturas encontram-se separadas por abundante medula óssea (figs. 23 e 24). Não foram detectadas diferenças entre ambas as margens ou entre ambos os limites do defeito ósseo.

No final deste período já não se consegue verificar uma nítida linha de demarcação entre a parede do defeito e o novo tecido ósseo

Em **síntese**, os defeitos preenchidos com fragmentos de autoenxerto apresentam um desenvolvido processo de osteointegração. O conjunto de imagens apresentadas ilustra um processo sequencial e centrípeto, em que os defeitos ósseos foram sendo progressivamente ocupados por uma notável quantidade de tecido ósseo. Estas áreas estão constituídas por numerosas trabéculas de novo osso revestindo, integrando e ligando os fragmentos de autoenxerto entre si e às paredes do defeito. A actividade osteoclástica é bastante intensa levando à reabsorção das áreas de tecido imaturo, em paralelo com a formação de tecido lamelar.

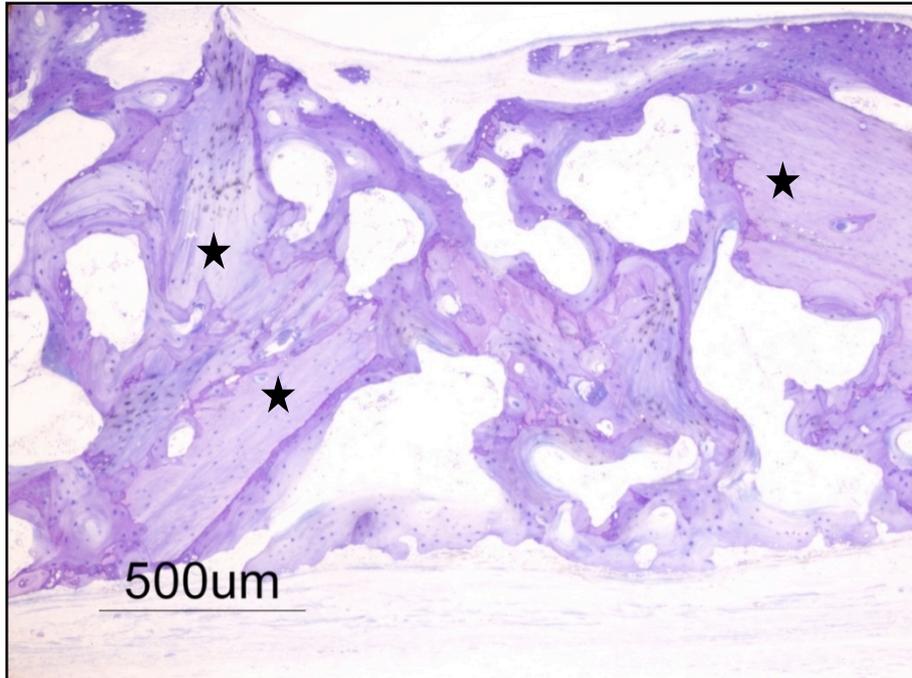


Figura 19 Imagem de um defeito ósseo preenchido com fragmentos de autoenxerto (★), aos trinta dias de evolução, mostrando uma grande densidade de trabéculas ósseas que incorporam no seu interior fragmentos do enxerto.

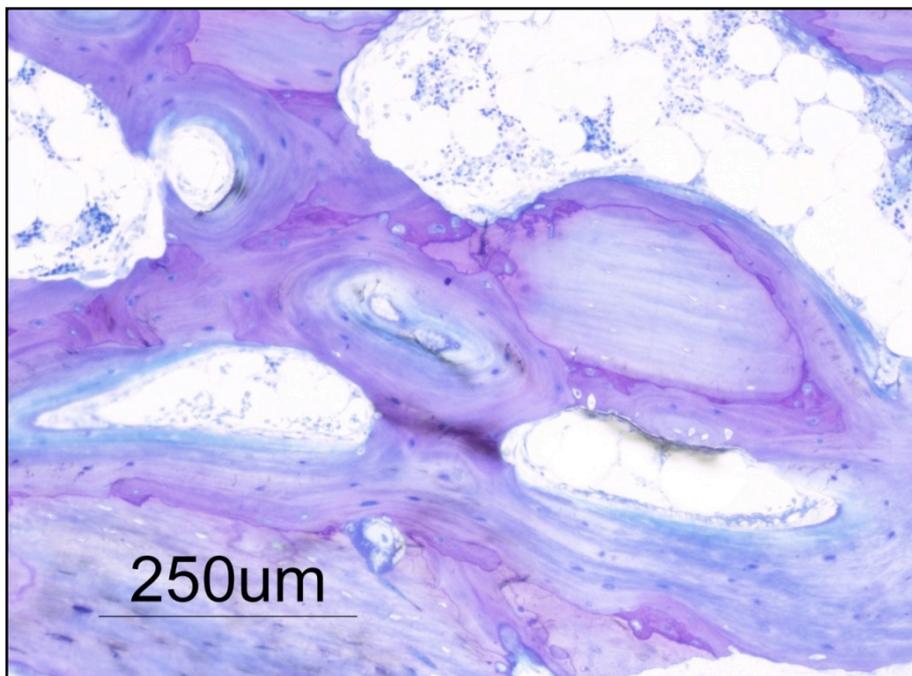


Figura 20- Secção coronal de um defeito preenchido com fragmentos de autoenxerto, com trinta dias de evolução. É notória a grande actividade de formação de tecido ósseo lamelar, preenchendo os espaços ocupados por tecido conjuntivo. É também visível a presença de medula óssea.

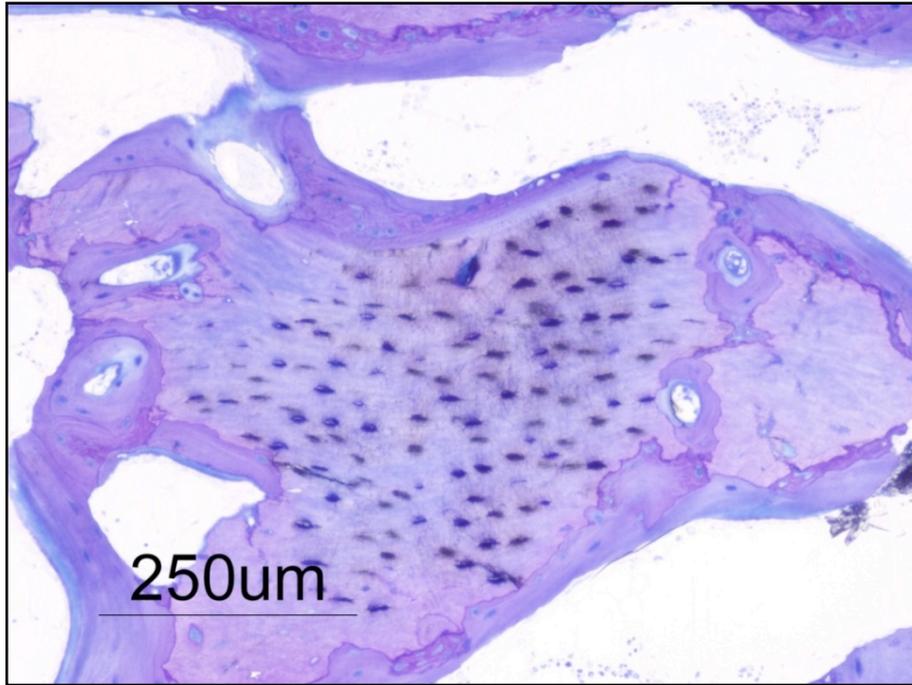


Figura 21- Imagem de uma trabécula óssea contendo uma partícula de autoenxerto, com trinta dias de evolução, apresentando um aspecto muito próximo da normal e vital arquitectura óssea.

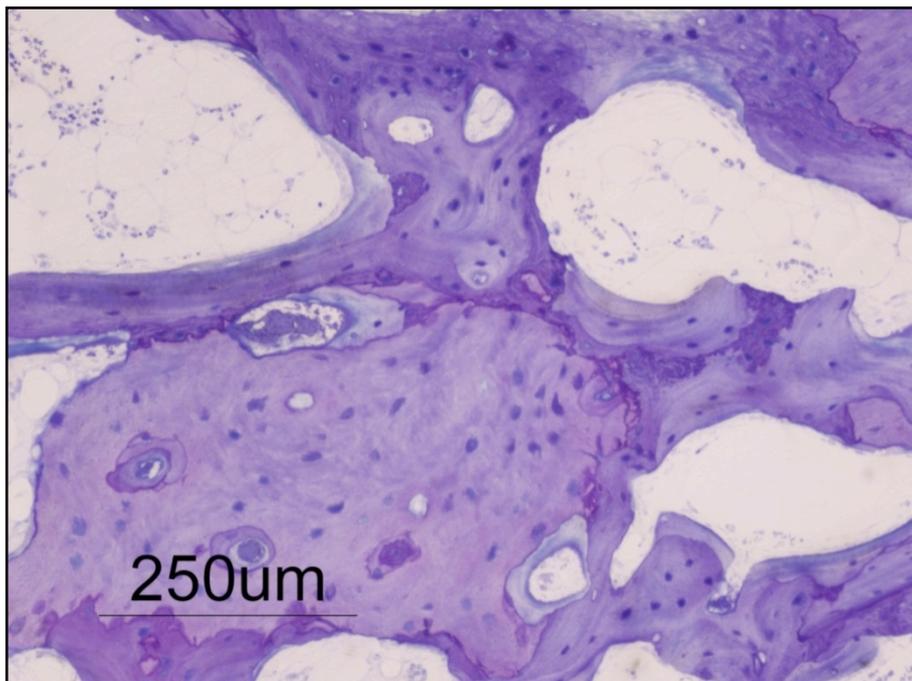


Figura 22- Aspecto do processo de remodelação óssea, com cones de reabsorção, numa partícula de autoenxerto envolvida por trabéculas ósseas de formação recente.

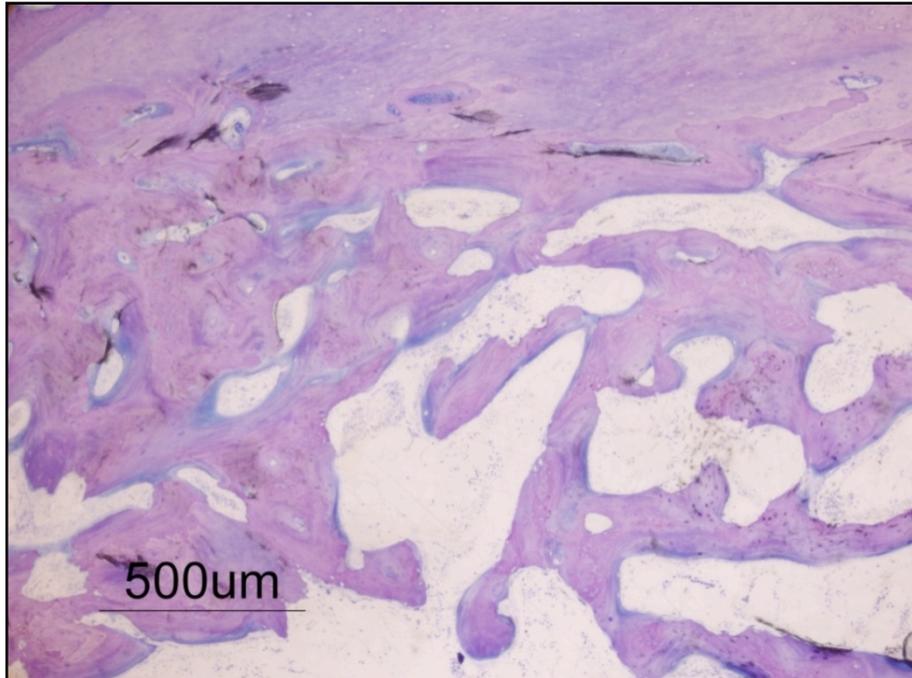


Figura 23 – Corte horizontal de um defeito aos trinta dias de evolução, realçando a grande densidade de trabéculas ósseas entre e em redor dos fragmentos de autoenxerto. Não é visível uma linha de demarcação nítida com a parede do defeito.

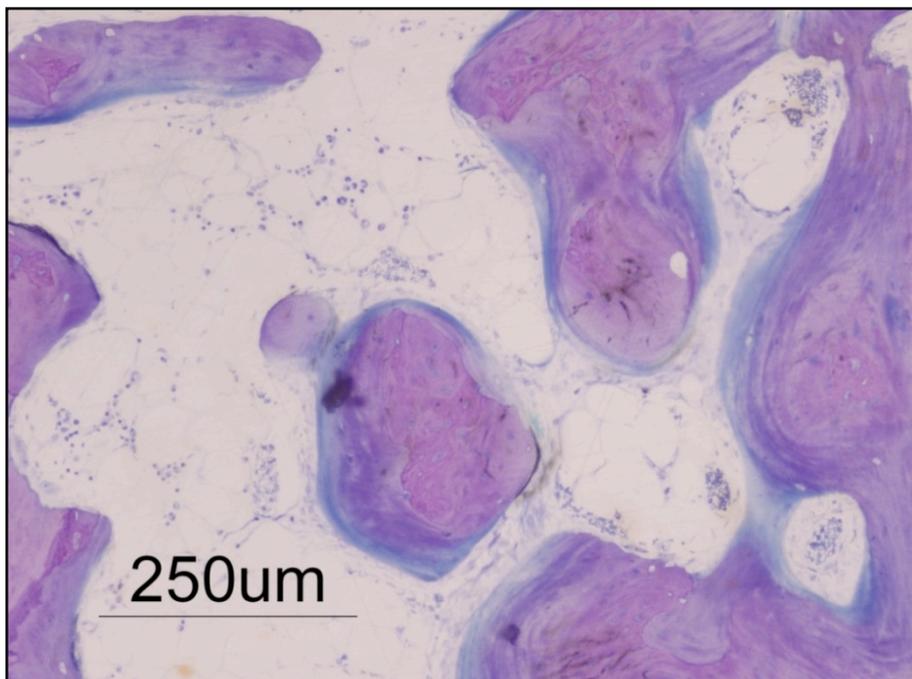


Figura 24 Áreas de osteóide na periferia de trabéculas contendo algumas partículas de autoenxerto. É notória a presença de grande quantidade de medula óssea.

1.6.3 – Defeitos ósseos preenchidos com xenoinxerto de origem bovina

Duas semanas: Nas secções coronais dos defeitos preenchidos com grânulos de xenoinxerto verificámos para além da presença de numerosas partículas, de forma e dimensões bastante heterogéneas (fig.30)., o aparecimento de algumas zonas de novo tecido ósseo.

As partículas de xenoinxerto apresentam na sua maioria um padrão característico de tecido ósseo esponjoso, com lamelas ósseas paralelas e numerosas lacunas ósseas vazias, ou seja, não ocupadas por osteócitos. Porém, é também possível identificar alguns fragmentos de xenoinxerto apresentando áreas formadas por nítidos sistemas de Havers.

Neste período é possível identificar uma clara linha de interface demarcando a parede do defeito e as novas trabéculas ósseas (fig 31), devido à sua diferente constituição histológica e tintorial. A regeneração de novo osso é já evidente, sendo mais exuberante na margem externa do defeito do que na sagital. Este crescimento de novo tecido ósseo processa-se em sentido centrípeto sendo mais evidente junto ao *endocranium* do que junto ao *pericranium* (fig 30). As trabéculas ósseas formadas nas regiões marginais, apesar de maioritariamente constituídas por tecido imaturo, mostram já uma considerável quantidade de tecido lamelar (figs 31 e 34). No entanto, a maioria do tecido ósseo formado por aposição directa às partículas mantém características de imaturidade (figs 32 e 33), sendo ainda pouco frequente a existência de tecido lamelar.

Regista-se também a presença de pontes de tecido ósseo fazendo uma ligação entre partículas revestidas (figs 32 e 33), sendo porém bastante limitada, principalmente a nível da margem sagital.

Nas zonas centrais dos defeitos são escassas as áreas de novo tecido ósseo, estando as partículas rodeadas quase na sua totalidade por tecido conjuntivo com bastantes fibras de colagénio (figs 35 e 36). Nestas regiões são notórios os sinais de actividade osteoclástica, que algumas destas partículas de xenoinxerto apresentam na sua superfície

As **secções horizontais** confirmam uma distribuição bastante homogénea da grânulos de xenoinxerto já evidenciada nos cortes coronais. É igualmente visível a presença de numerosas trabéculas ósseas algumas delas revestindo, parcialmente, os

grânulos de material. Estas trabéculas estabelecem uma ligação entre os grânulos e a parede do defeito (fig. 37). Na região central do defeito verifica-se uma grande escassez de novo tecido ósseo relativamente à região periférica.

De registar por último que o material implantado não provocou nenhuma reacção adversa a nível local, não sendo detectadas quaisquer células de natureza inflamatória.

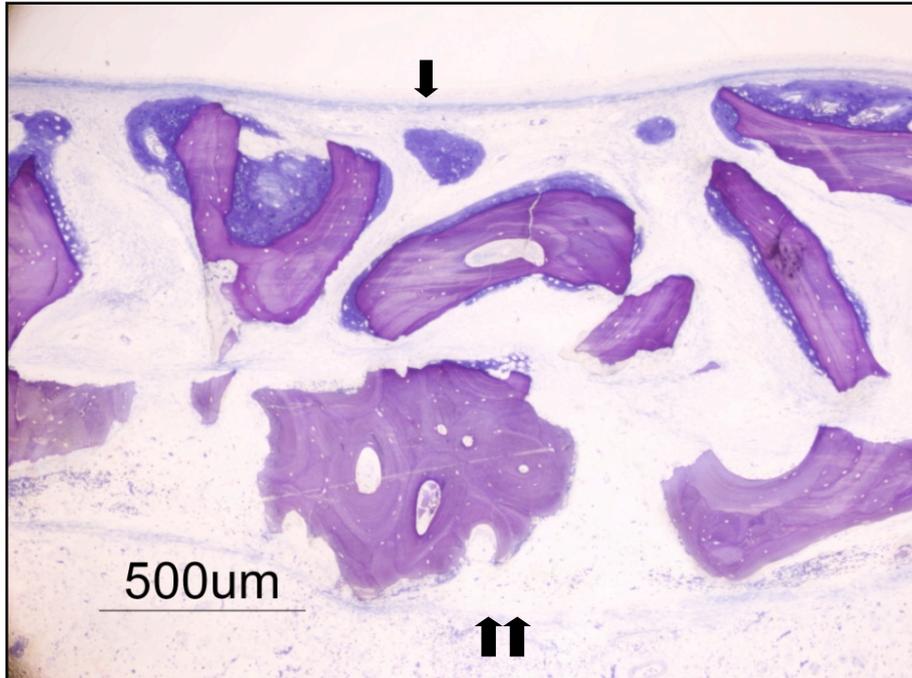


Figura 30- Defeito preenchido com grânulos de xenoinxerto com quinze dias de evolução sendo visível a distribuição, forma e dimensão das partículas. O tecido ósseo recém formado é mais evidente junto ao *endocranium* (↓) do que junto ao *pericranium* (↑↑).

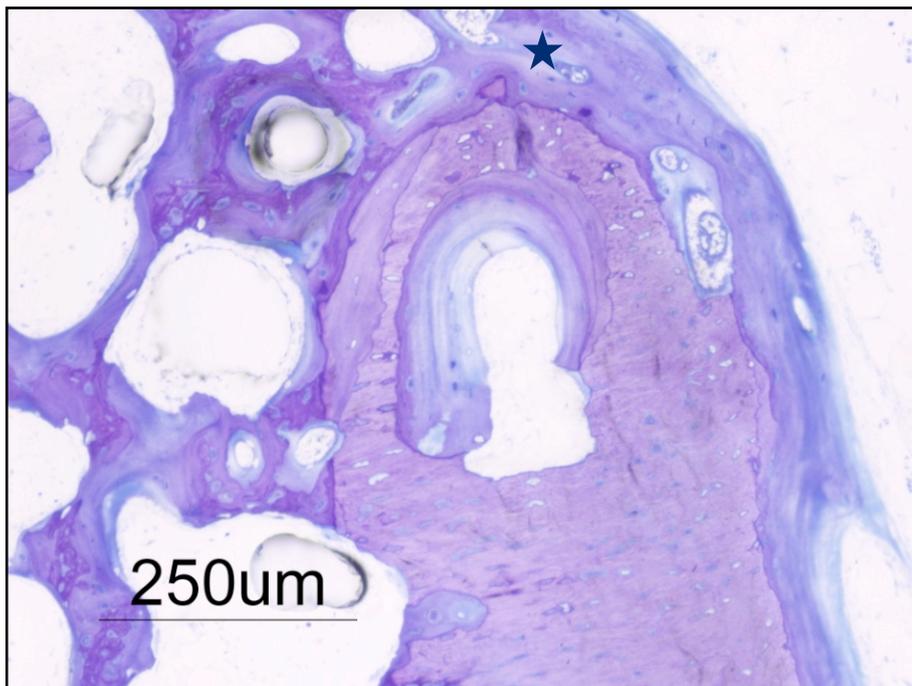


Figura 31- Margem externa de um defeito preenchido com partículas de xenoinxerto, aos quinze dias de evolução, sendo perceptível a transição entre o tecido ósseo do hospedeiro e o novo tecido ósseo (★) É também possível observar a existência de um cone de reabsorção na parede do defeito, já em processo de preenchimento ósseo.

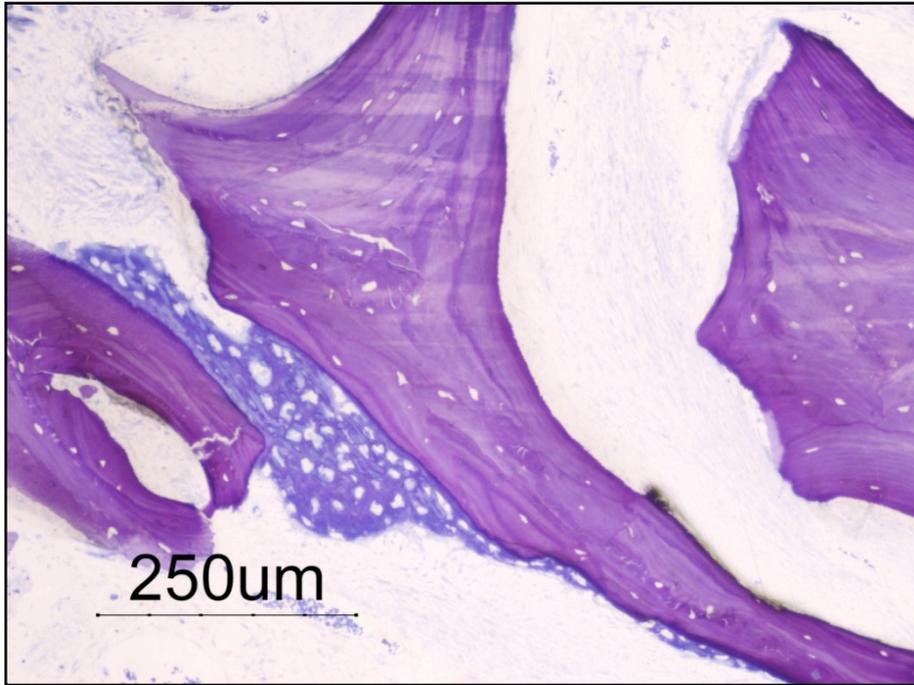


Figura 32 - Tecido ósseo bastante imaturo formado por aposição à superfície de duas partículas de xenoenxerto.

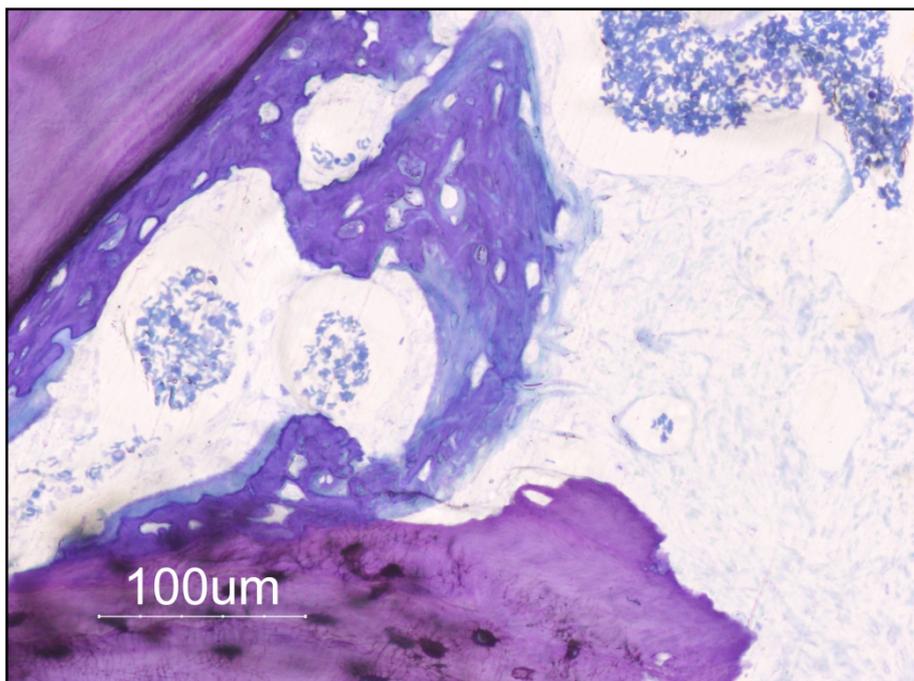


Figura 33 - Formação de uma ponte de ligação entre partículas de xenoenxerto revestidas por tecido ósseo. É também visível a presença de tecido conjuntivo muito vascularizado.

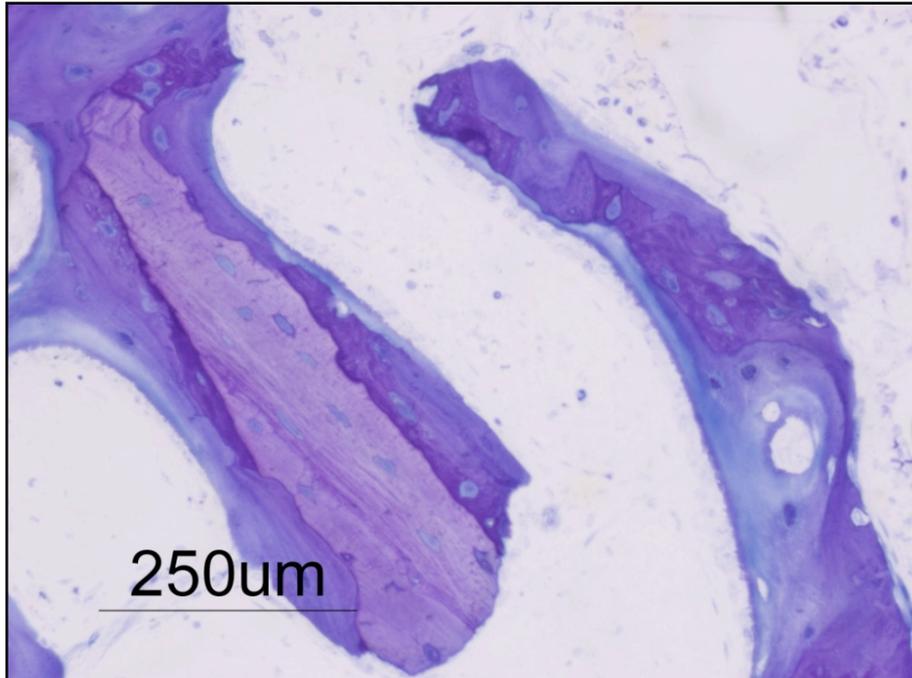


Figura 34- Fragmento de xenoenxerto, (mostrando vestígios de uma prévia reabsorção óssea - *Creeping substitution*), revestido por tecido imaturo (em contacto directo com o fragmento) e por tecido lamelar.

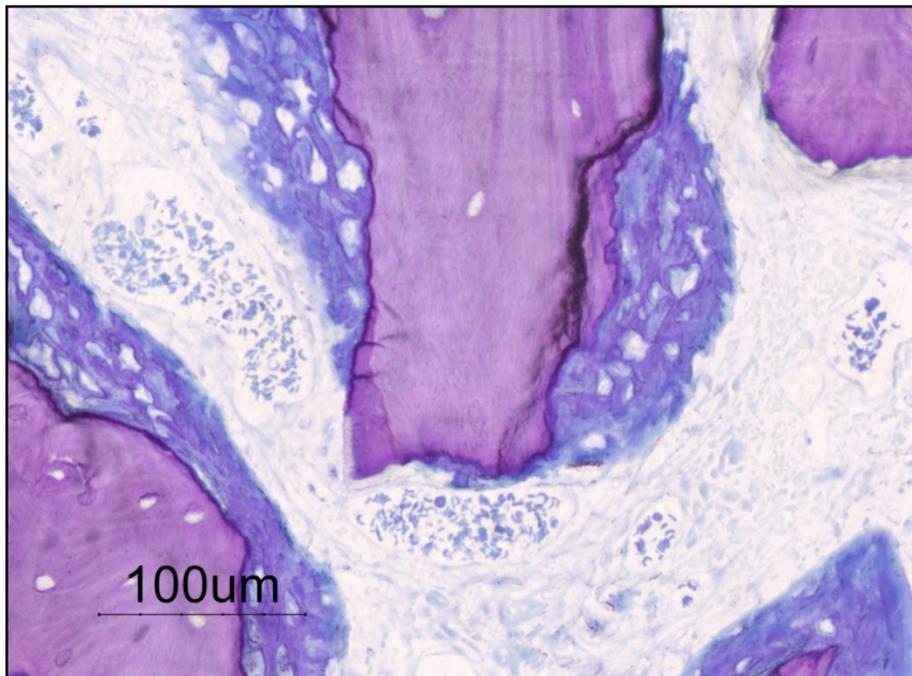


Figura 35 - Aspecto de uma zona central de um defeito, sendo notórias, a presença de áreas de tecido ósseo imaturo e de tecido conjuntivo com fibras de colagénio e vasos sanguíneos.

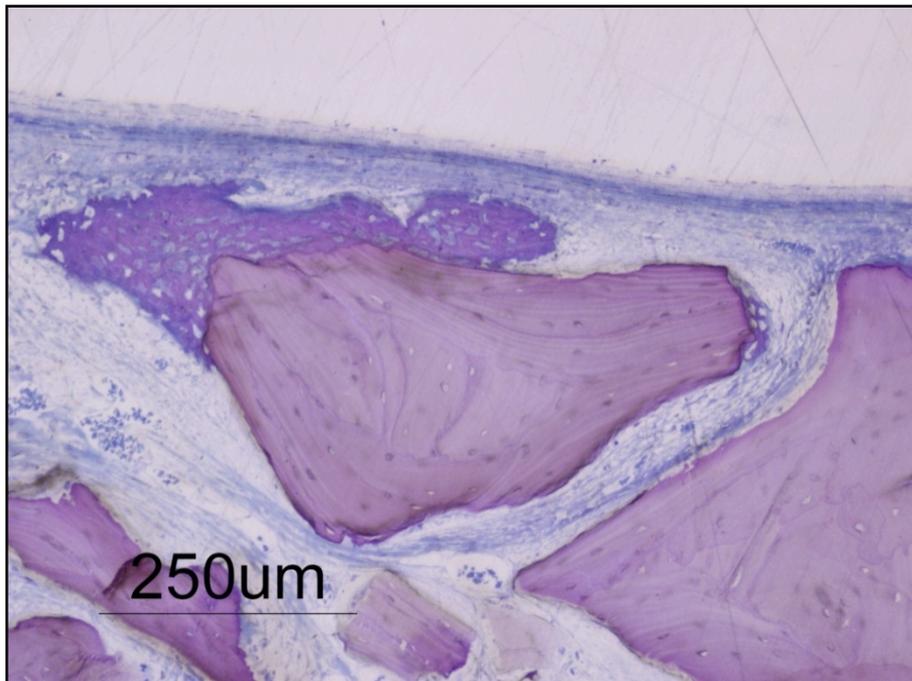


Figura 36 - Zona central do defeito preenchida por áreas de tecido conjuntivo com fibras de colagénio em redor de partículas em nítido processo de reabsorção.

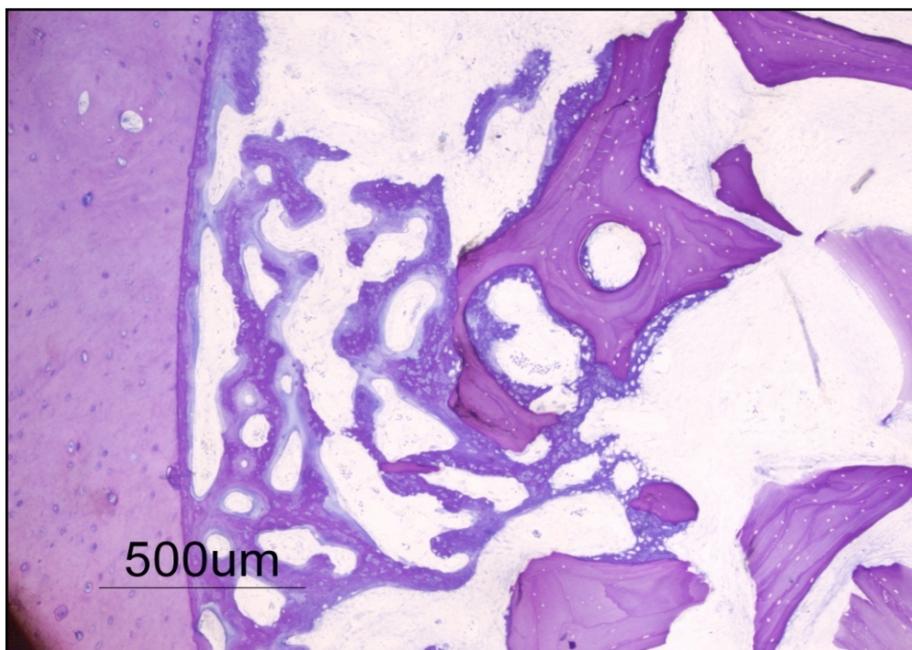


Figura 37- Secção horizontal de um defeito com quinze dias de evolução pondo em evidência uma rede de trabéculas ósseas que estabelecem a ligação entre os grânulos de xenoenxerto e a parede do defeito.

Quatro semanas: As **secções coronais** assinalam neste período um grande aumento de novo tecido ósseo em relação às duas semanas, particularmente junto às margens do defeito (fig 38). De facto, verifica-se nestas zonas uma maior espessura das trabéculas ósseas e a presença de partículas revestidas por maior quantidade de tecido ósseo. A formação de novo tecido ósseo parece ser sempre mais desenvolvida junto ao *endocranium* do que junto ao *pericranium*.

A linha de demarcação entre o osso do hospedeiro e o novo tecido ósseo (fig. 38), certamente devido a processos de remodelação de ambos os lados, já não se apresenta tão nítida.

As áreas de tecido ósseo imaturo observadas às duas semanas sofreram um intenso processo de reabsorção e remodelação dando lugar, neste período, a grandes regiões de tecido lamelar (fig. 39). Também as próprias partículas do xenoenxerto mostram grandes áreas de reabsorção sendo possível observar osteoclastos, células de grandes dimensões e com numerosos núcleos, localizados em lacunas de Howship (figs. 40 e 41). É de assinalar também uma aparente desmineralização dos fragmentos de xenoenxerto particularmente evidente nas zonas periféricas. Em paralelo aos mecanismos de reabsorção observamos também regiões de intensa actividade osteogénica com presença de células osteoprogenitoras num claro processo de ossificação intramembranoso (fig. 42). Deste modo e considerando o fenómeno de remodelação como um mecanismo de reabsorção/formação, encontramos numerosas trabéculas que conservam o registo deste processo (fig. 43), traduzido por inúmeras linhas de reversão. É de registar, também, a presença de inúmeras áreas de medula óssea (fig. 43) ocupando o espaço entre as trabéculas

À medida que caminhamos para o centro do defeito verificamos que a quantidade de novo tecido ósseo formado não é tão exuberante, quando comparado com a periferia, constatando-se a presença de inúmeras partículas revestidas unicamente por tecido conjuntivo denso. De facto, a actividade de formação de tecido ósseo é menor no centro do defeito do que na sua periferia, porém maior do que a observada às duas semanas. No entanto, não raramente observamos algumas áreas onde é considerável a existência de tecido ósseo numa aposição directa às partículas (fig. 44). É impossível deixar de registar nestas regiões a presença/formação de um tecido ósseo com características histológicas peculiares (fig. 45), um pouco diferentes do normalmente observado, parecendo constituir uma fase intermédia entre tecido ósseo imaturo e tecido ósseo lamelar.

As **secções horizontais** completam as observações histológicas obtidas nas secções coronais, comprovando a intensa formação de novo tecido ósseo que caracteriza este período (figs. 46 e 47), formando um processo sequencial e centrípeto, da margem para o interior do defeito. De notar, mais uma vez, o aparecimento de um tecido ósseo (fig. 47) que parece não se enquadrar totalmente nem no tecido imaturo nem no lamelar.

Em **síntese**, o conjunto de imagens dos defeitos ósseos preenchidos com partículas de xenoenxerto ilustra bem que estes defeitos foram sendo progressivamente ocupados por uma grande quantidade de tecido ósseo. A formação deste tecido ósseo caracteriza-se por uma deposição óssea crescente à superfície das partículas e, simultaneamente, nos espaços interparticulares, com a formação de trabéculas com tecido imaturo e lamelar, ligando as partículas entre si e às paredes do defeito. No último período de experimentação é visível a existência de numerosos processos de reabsorção osteoclástica, levando à degradação e fragmentação de muitas partículas.

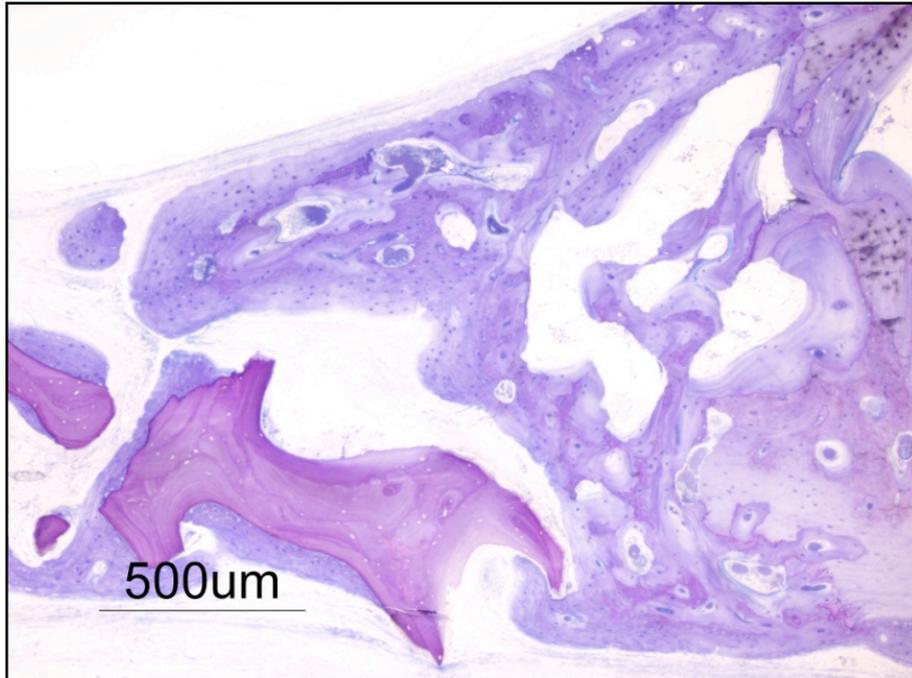


Figura 38- Margem sagita (mediana) de um defeito preenchido com grânulos do xenoenxerto com trinta dias de evolução sendo visível uma acentuada formação de tecido ósseo, numa tentativa de reconstituição da arquitectura do defeito.

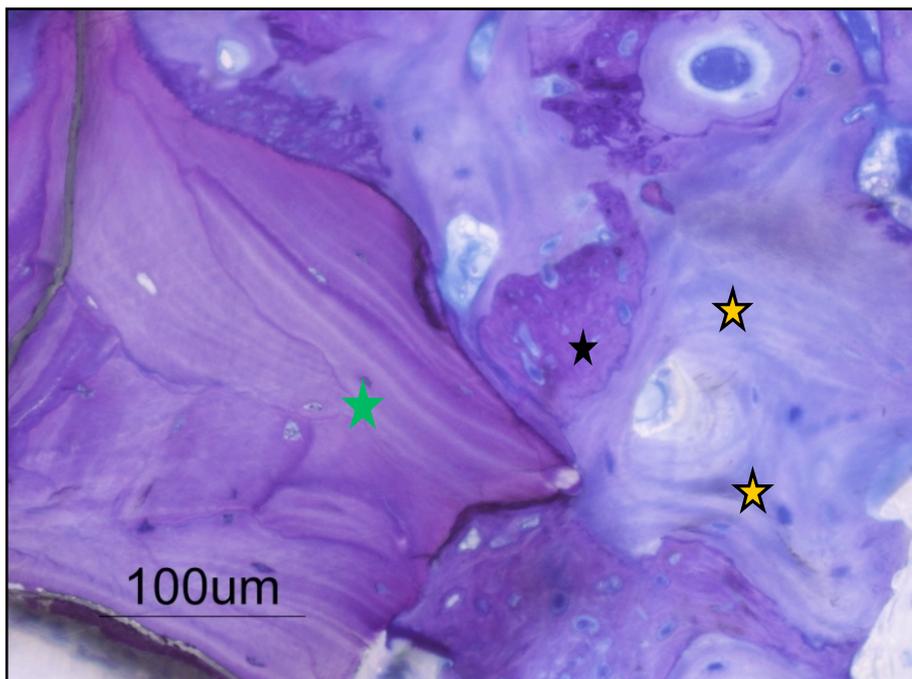


Figura 39 - Partícula de xenoenxerto (★) (conservando a sua estrutura lamelar), rodeada por algumas áreas de tecido ósseo imaturo (★) e por abundante tecido ósseo lamelar (★).

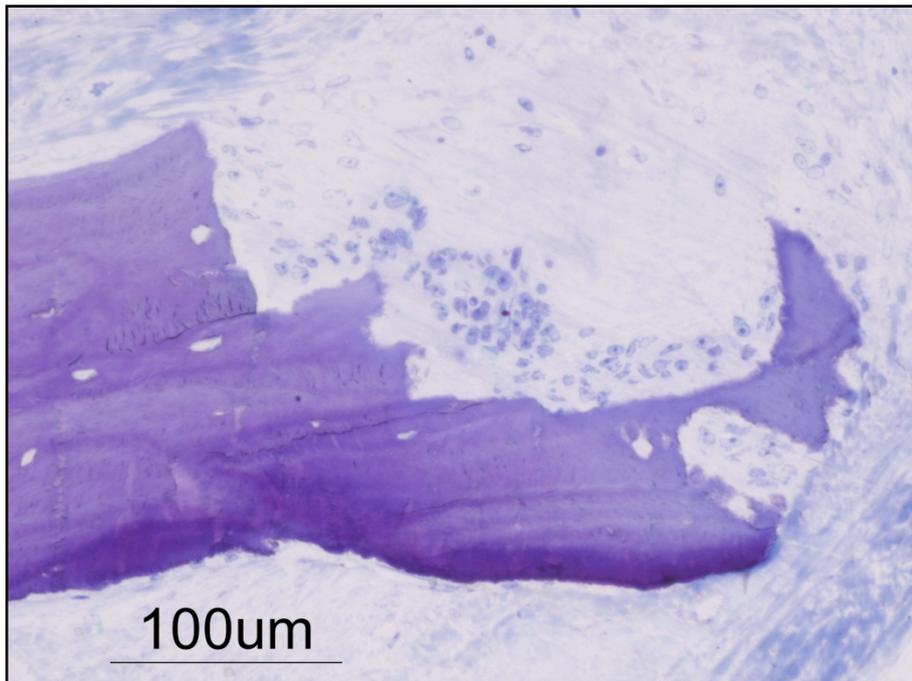


Figura 40 - Imagem de um fragmento de xenoenxerto num assinalável processo de reabsorção levado a cabo por numerosos osteoclastos.

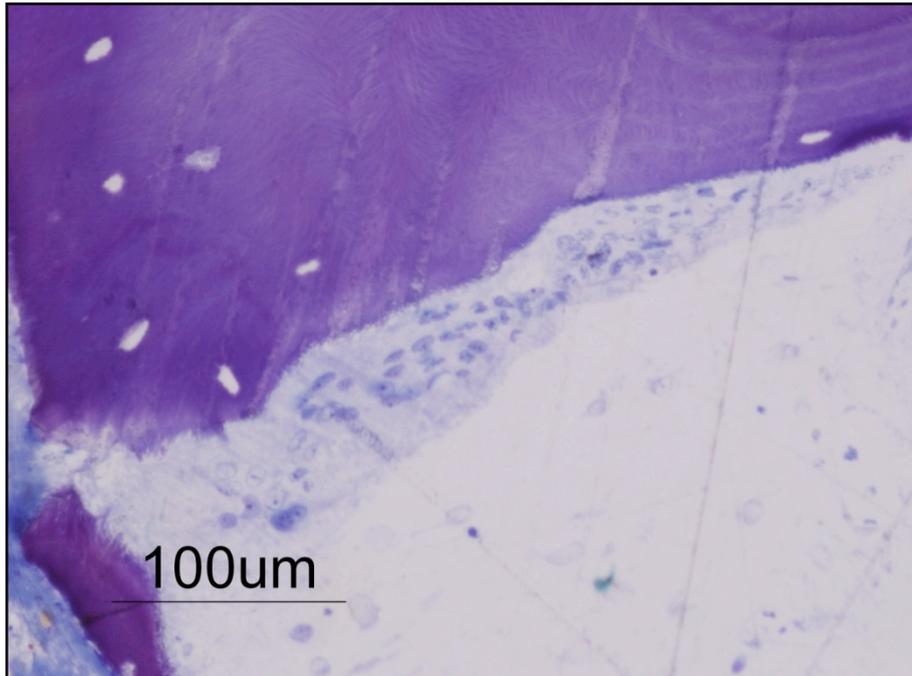


Figura 41 -Aspecto da actividade osteoclástica observada à superfície de uma partícula de xenoenxerto.

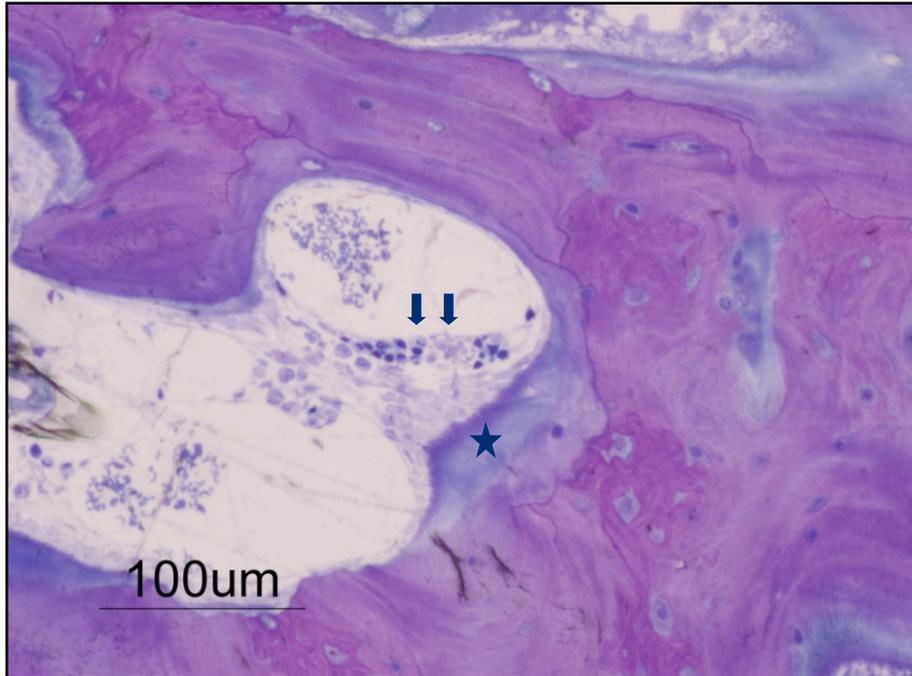


Figura. 42- Área de formação osteogénica com células osteoprogenitoras (↓) e osteóide (★) numa fase inicial do processo de formação duma ponte de tecido ósseo, unindo duas regiões próximas.

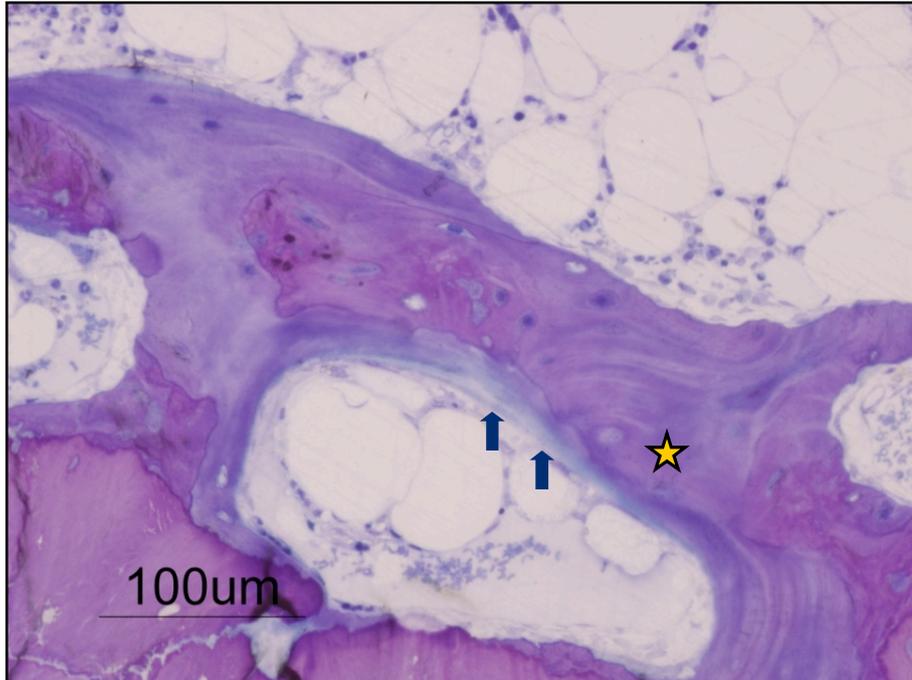


Figura 43 - Trabéculas ósseas em processo de remodelação ,com áreas de tecido ósseo imaturo, de tecido ósseo lamelar (★) e osteóide (↑), separadas por linhas de reversão. É ainda visível a existência de medula óssea ocupando os espaços entre as trabéculas.

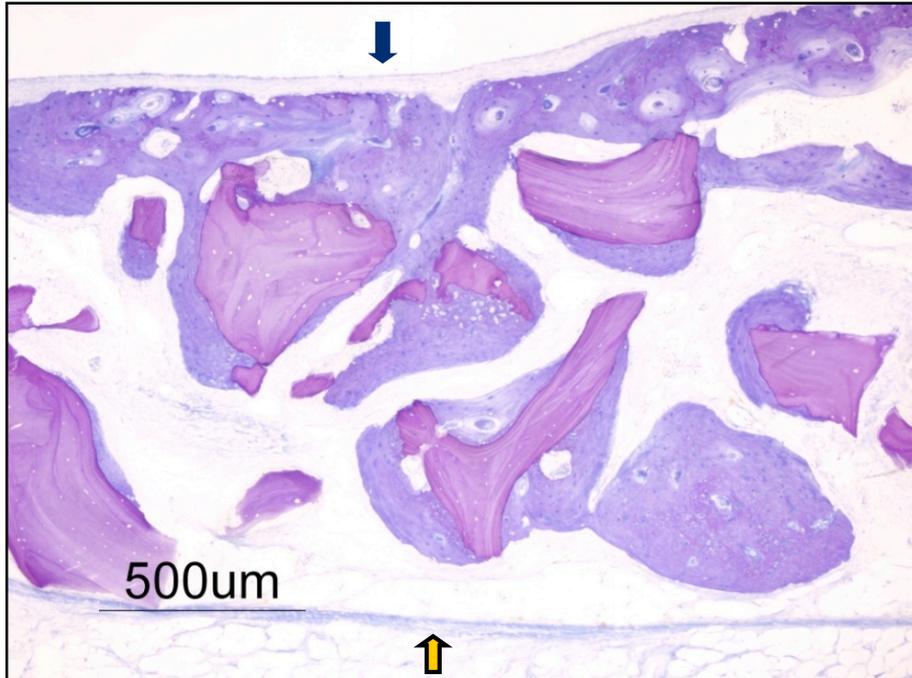


Figura 44 - Aspecto da área central de um defeito preenchido com grânulos de xenoinxerto com quatro semanas de evolução, evidenciando uma assinalável quantidade de novo tecido ósseo, mais evidente a nível do *endocranium* (↓) do que do *pericranium* (↑).

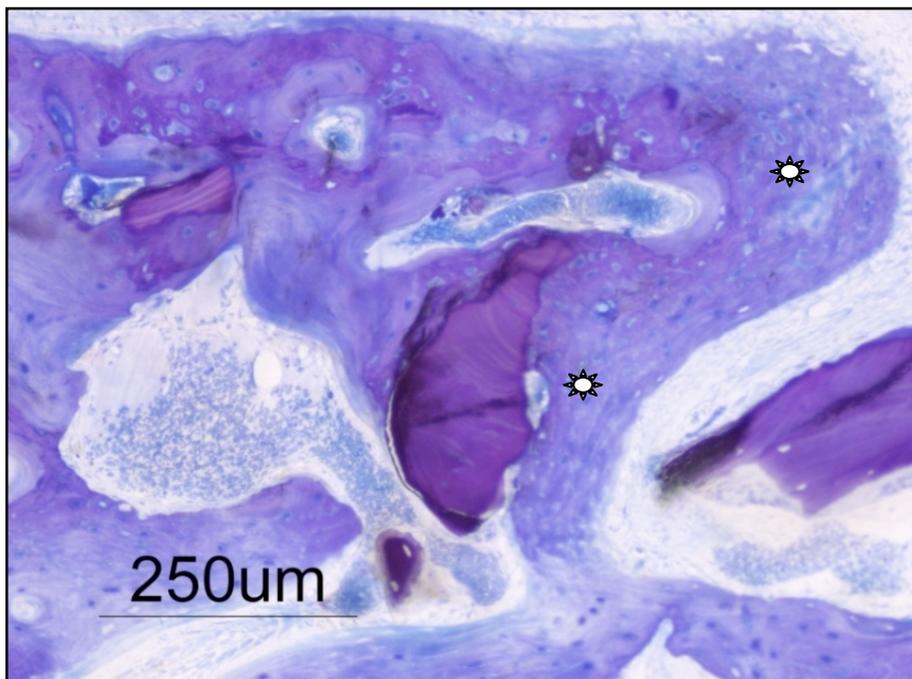


Figura 45 - Partícula de xenoinxerto revestida por uma zona de tecido ósseo com características invulgares (☼) parecendo constituir uma fase intermédia entre tecido ósseo imaturo e lamelar.

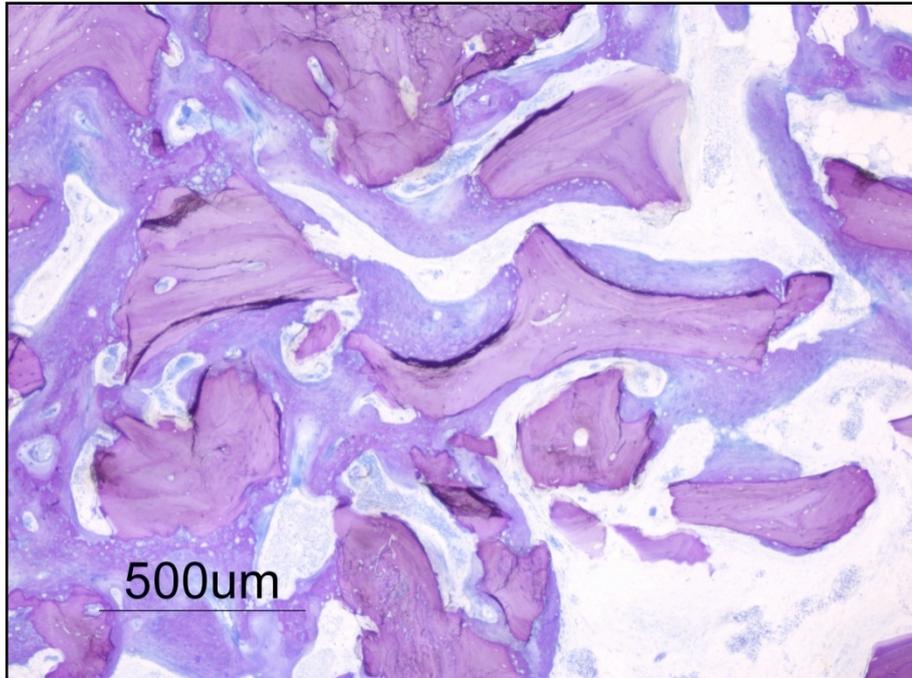


Figura. 46 - Secção horizontal de um defeito preenchido com grânulos de xenoenxerto com trinta dias de evolução mostrando uma acentuada formação de tecido ósseo traduzida numa maior espessura de trabéculas e por um maior envolvimento das partículas, quando comparado com os quinze dias.

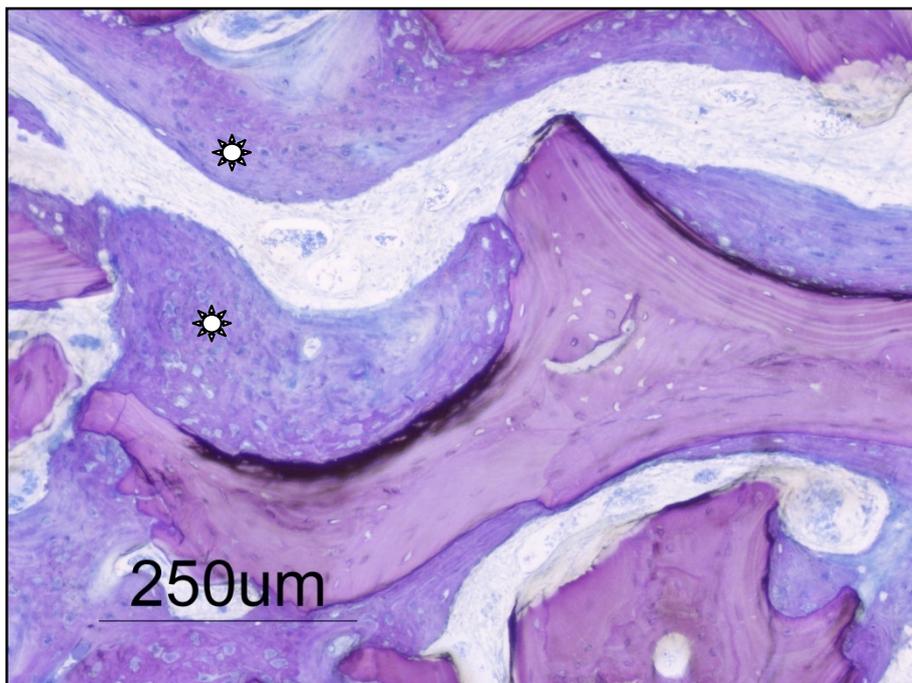


Figura 47 -Maior ampliação de uma área representada na figura anterior mostrando um tecido ósseo com características atípicas (*).

1.6.4 – Defeitos ósseos preenchidos com hidroxiapatite sintética

Nos defeitos ósseos preenchidos com hidroxiapatite sintética salienta-se desde logo a presença de inúmeras partículas de hidroxiapatite rodeadas e interligadas por numerosas áreas de tecido ósseo.

Duas semanas: nos **cortes coronais** é notória a falta de uniformidade na dimensão e forma das partículas de hidroxiapatite, sendo frequente a existência de imensas partículas de muito pequena dimensão (fig. 48). Estas partículas deverão resultar de processos de desagregação que poderiam ter ocorrido aquando da colocação do material, ou entre a colocação e a eutanásia dos animais.

Nalgumas partículas de hidroxiapatite são visíveis zonas correspondentes a processos de desmineralização (figs. 49 e 50) que parecem ser da responsabilidade de osteoclastos pois apresentam um perfil festonado característico de lacunas de Howship. Em favor desta hipótese está a presença de numerosas células, muito provavelmente osteoclastos, a rodear muitas partículas (fig. 50), e certamente relacionados com a sua fragmentação.

A existência de tecido ósseo é uma constante em quase toda a extensão do defeito, ou seja, tanto na periferia como na região central. Porém a constituição histológica das trabéculas localizadas na periferia (fig 54) é bastante diferente das regiões centrais (figs. 48, 51 e 52).

As trabéculas ósseas presentes neste período (ocupando a parte intermédia e central) estabelecem íntimas e numerosas ligações entre as partículas revestidas e estão separadas por espaços preenchidos por tecido conjuntivo laxo muito vascularizado. A aposição de novo osso que ocorreu directamente à superfície dos grânulos apresenta uma reduzida espessura sendo essencialmente constituído por tecido ósseo imaturo (figs 51,52 e 53). Por vezes é possível observar-se o início do processo de mineralização nas áreas de matriz osteóide (figs. 52 e 53), imagem típica dos processos de ossificação.

Importa ainda sublinhar a existência de uma interface (figs 52 e 53), constituída por uma fina camada, com uma maior intensidade de coloração, à superfície das partículas que apresentam aposição de tecido ósseo imaturo. Esta camada, semelhante a uma linha de reversão, parece estabelecer uma íntima relação com o novo tecido ósseo, não sendo visível nas áreas que não mostram uma aposição directa de tecido ósseo ou que estejam em processo de reabsorção.

Junto às margens dos defeitos, as trabéculas ósseas, como já foi referido, encontram-se particularmente desenvolvidas, apresentando uma maior espessura e maior quantidade de tecido lamelar em relação às trabéculas centrais.

Tal como foi referido para os materiais atrás descritos continua a observar-se um predomínio de formação de novo tecido ósseo na zona do *endocranium*, relativamente à zona do *pericranium*.

Os **cortes horizontais** confirmam as descrições histológicas apresentadas para os cortes coronais, fornecendo uma perspectiva diferente mas complementar da inter-relação hidroxiapatite-tecido ósseo (fig. 54). As trabéculas ósseas localizadas nas zonas marginais estão constituídas por tecido ósseo imaturo e algum tecido ósseo lamelar (fig 54). Estas trabéculas, de dimensão bastante homogénea, formam uma rede uniforme, revestindo, integrando e ligando as partículas entre si e às paredes do defeito.

Torna-se importante sublinhar que não verificaram sinais sugestivos da presença de uma resposta inflamatória por parte dos tecidos.

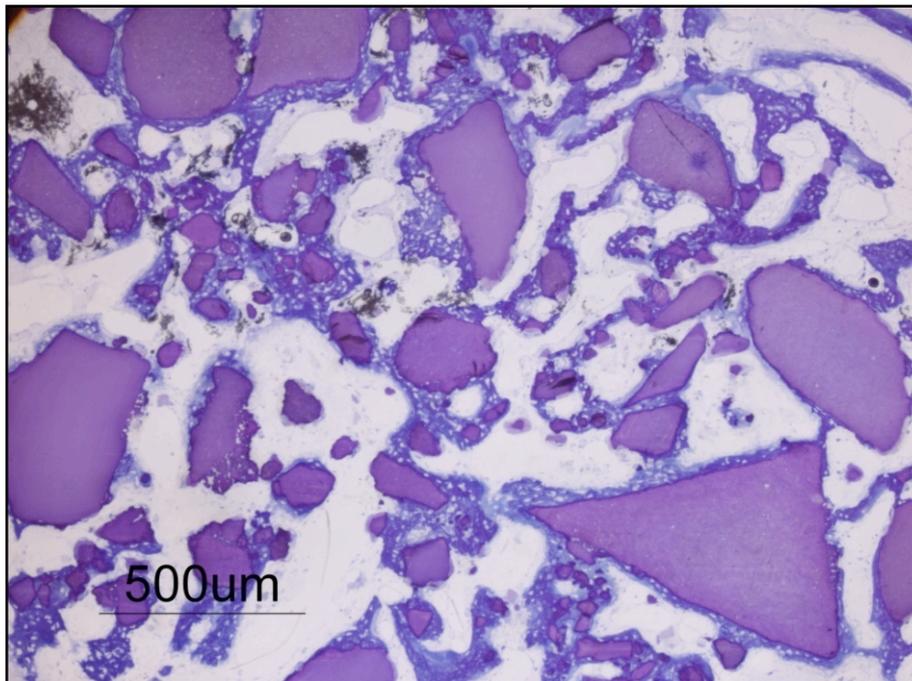


Figura 48 —Zona central de um defeito preenchido com partículas de HA, com quinze dias de evolução, mostrando a distribuição, forma e dimensão das partículas. É também visível a presença de numerosas áreas de tecido ósseo imaturo rodeando e interligando as partículas.

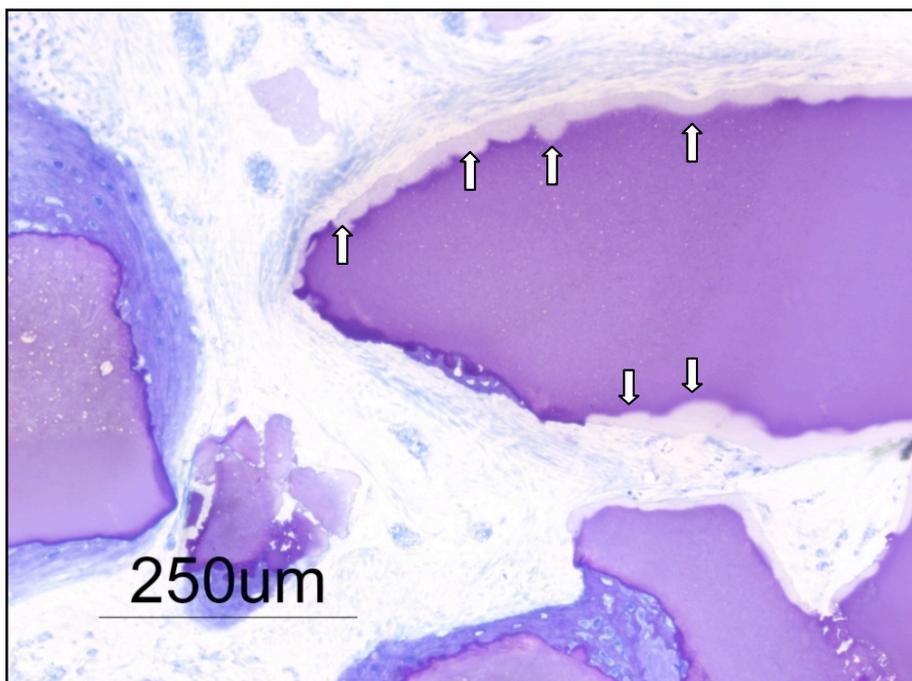


Figura 49- Corte coronal onde se evidencia uma partícula de HA mostrando na sua periferia uma extensa área de desmineralização (↓) com um perfil festonado, característico de lacunas de Howship.

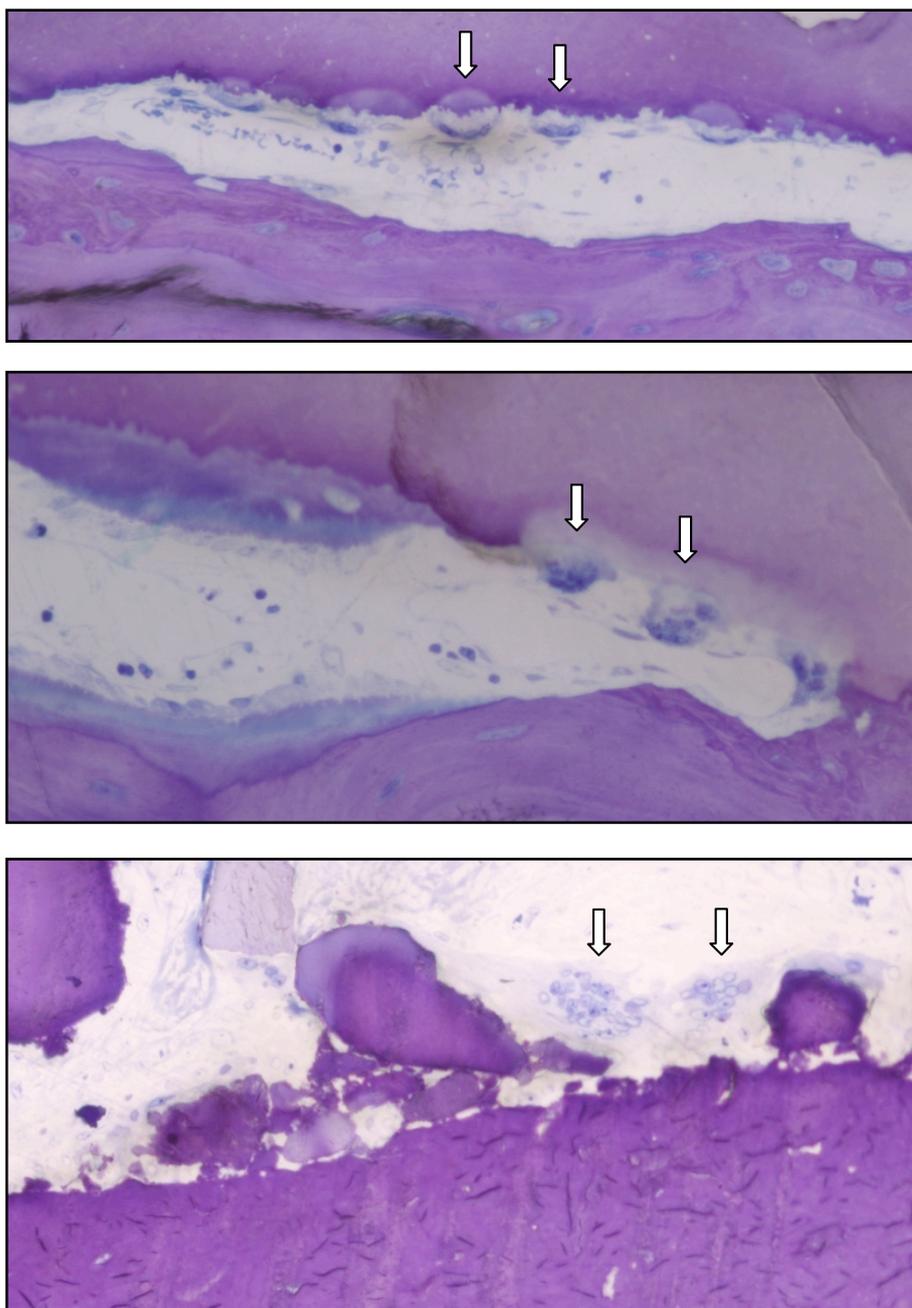


Figura 50-Zona central de um corte coronal, com quinze dias de evolução, onde se observam osteoclastos (↓) localizados na periferia de partículas de HA. Observam-se também diversas áreas em fase de desmineralização e/ou fragmentação.

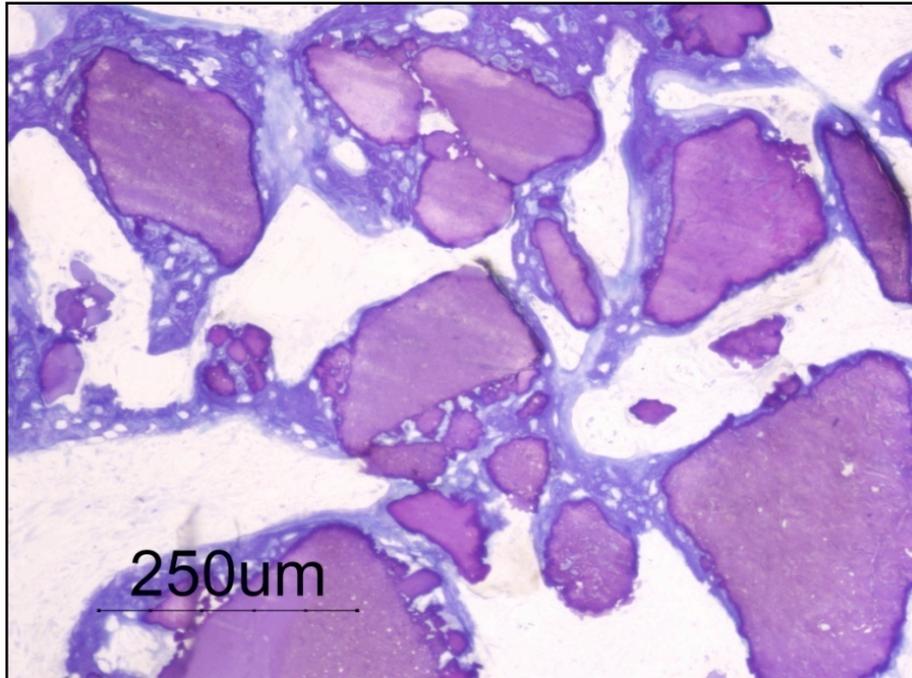


Figura 51 Imagem de um defeito mostrando uma grande densidade de partículas de HA revestidas por tecido ósseo muito imaturo e separadas por grandes áreas de tecido conjuntivo laxo.

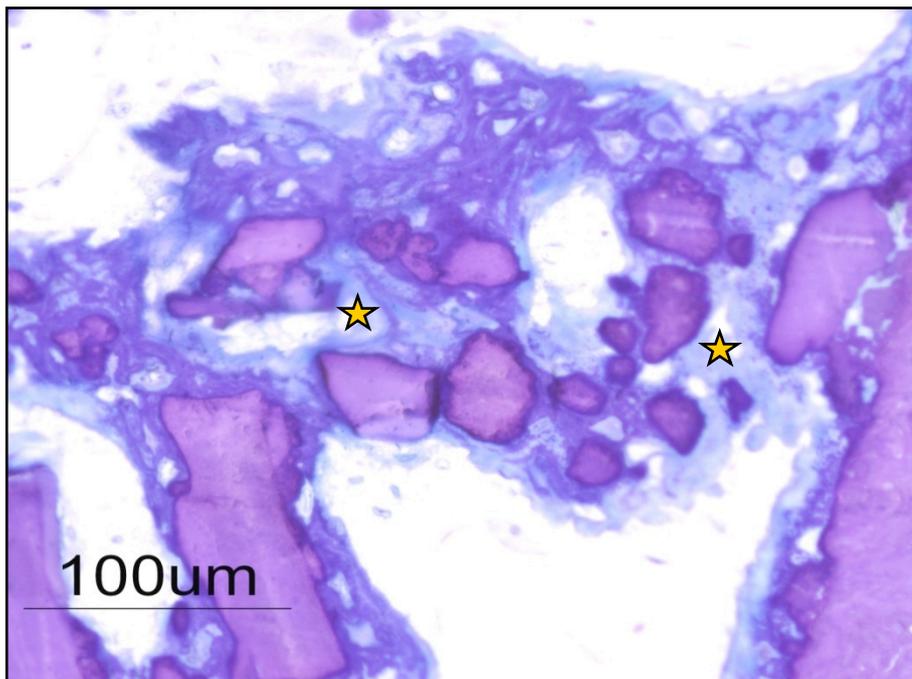


Figura 52-Matriz osteóide (★) em processo de formação e mineralização rodeando e ligando numerosas partículas de HA.

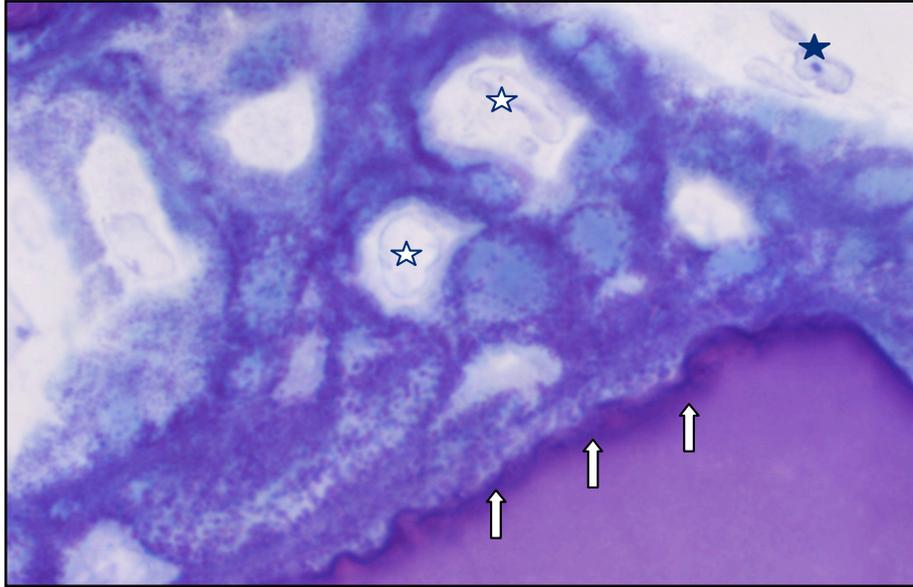


Figura 53- Focos de mineralização presentes numa matriz osteóide em contacto directo com uma partícula de HA. É também possível observar osteócitos (☆) e osteoblastos (★). É ainda visível uma nítida interface (↑) entre a partícula e o tecido ósseo imaturo. (1000x no original).

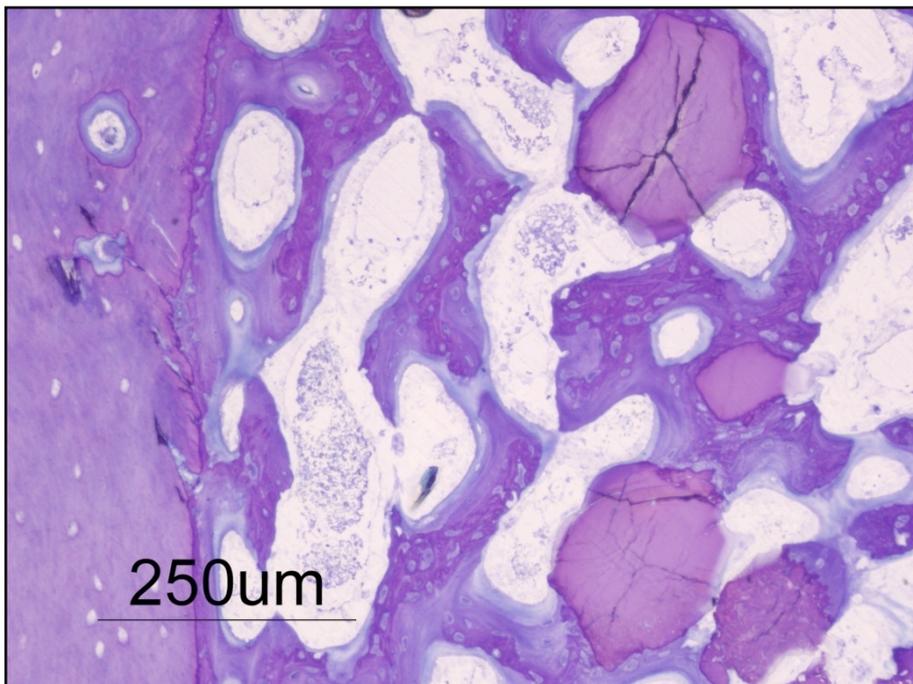


Figura 54 – Corte horizontal de um defeito preenchido com partículas de HA aos quinze dias de evolução, mostrando uma rede de trabéculas ósseas, já com certo grau de maturação, estabelecendo uma ligação entre as partículas e a parede do defeito.

Quatro semanas: Nos **cortes coronais** dos defeitos preenchidos com hidroxiapatite verificamos a presença de uma grande densidade de trabéculas ósseas. Estas estruturas apresentam-se numa fase de maturação e organização muito mais adiantada (fig. 55), quando comparadas com o observado aos quinze dias, em particular as situadas mais periféricamente, encontrando-se uma cada vez maior quantidade de tecido lamelar (fig. 56). As áreas de tecido ósseo, características deste período, formam uma forte unidade e coesão com as partículas, o que reflecte um bom processo de osteointegração deste material (fig. 55).

Em paralelo com o intenso mecanismo de formação óssea é possível detectar fenómenos de reabsorção quer no tecido ósseo imaturo quer nas partículas (fig. 56). Os sinais de actividade osteoclástica resultam num gradual desaparecimento das áreas de tecido imaturo e numa forte reabsorção, desmineralização e degradação das partículas (figs 56 e 58). As trabéculas ósseas apresentam menos tecido imaturo e mais tecido lamelar incorporando no seu interior partículas de hidroxiapatite.

Na zona central do defeito observa-se uma maior quantidade de tecido conjuntivo com fibras de colagénio a envolver as partículas de hidroxiapatite. Mais uma vez, tal como observado nas figuras 45 e 47, encontramos áreas de tecido ósseo com características de certo modo atípicas, que se continuam com tecido imaturo sem qualquer linha de demarcação (figs. 57 e 58), assemelhando-se a um tecido lamelar, mas com uma maior densidade celular e sem atingir a sua organização. Estas estruturas parecem revestidas externamente por tecido conjuntivo denso, apresentando sinais de remodelação óssea nas superfícies endósteais. Estas formações são mais frequentemente observadas nas zonas centrais dos defeitos.

Nas partículas de hidroxiapatite continua a registar-se um processo de fragmentação (fig. 58) e desmineralização (fig. 56), bastante intenso.

O *Pericranium* e o *endocranium* encontram-se perfeitamente reconstituídos.

Os **cortes horizontais** corroboram os achados histológicos dos cortes coronais, com partículas osteointegradas e trabéculas ósseas bastante organizadas, maioritariamente constituídas por abundante tecido lamelar, ligando as partículas entre si e às paredes do defeito (figs 59 e 60). Observa-se ainda o aparecimento de medula óssea entre as trabéculas situadas mais periféricamente.

Em síntese, o conjunto de imagens apresentado começa com uma intensa formação de tecido ósseo, logo aos quinze dias, que rapidamente atinge, na periferia do defeito, uma acentuada maturação. Estas trabéculas, de dimensão bastante

homogénea, formam uma rede uniforme, revestindo, integrando e ligando as partículas entre si e às paredes do defeito. As partículas apresentam, aos quinze dias, sinais de uma intensa actividade de reabsorção, com osteoclastos visíveis na sua superfície.

Aos trinta dias continua a verificar-se uma grande densidade de trabéculas ósseas, bastante espessas e com um elevado grau de maturação e organização. Em paralelo, regista-se uma acentuada actividade de remodelação óssea, traduzindo uma intensa dinâmica funcional deste tecido, associada à reabsorção das partículas de hidroxiapatite.

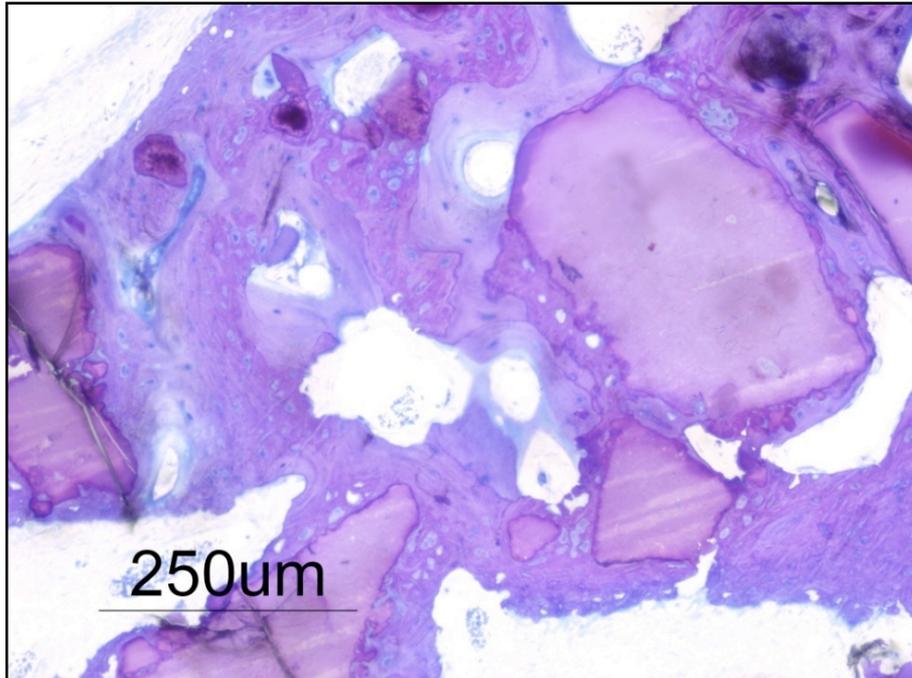


Figura.55- Defeito preenchido com HA, aos trinta dias de evolução, mostrando uma osteointegração destas partículas no seio de uma rede de trabéculas bem desenvolvidas. É notório a maior espessura das trabéculas, em relação aos quinze dias, com redução dos espaços inter-trabéculares.

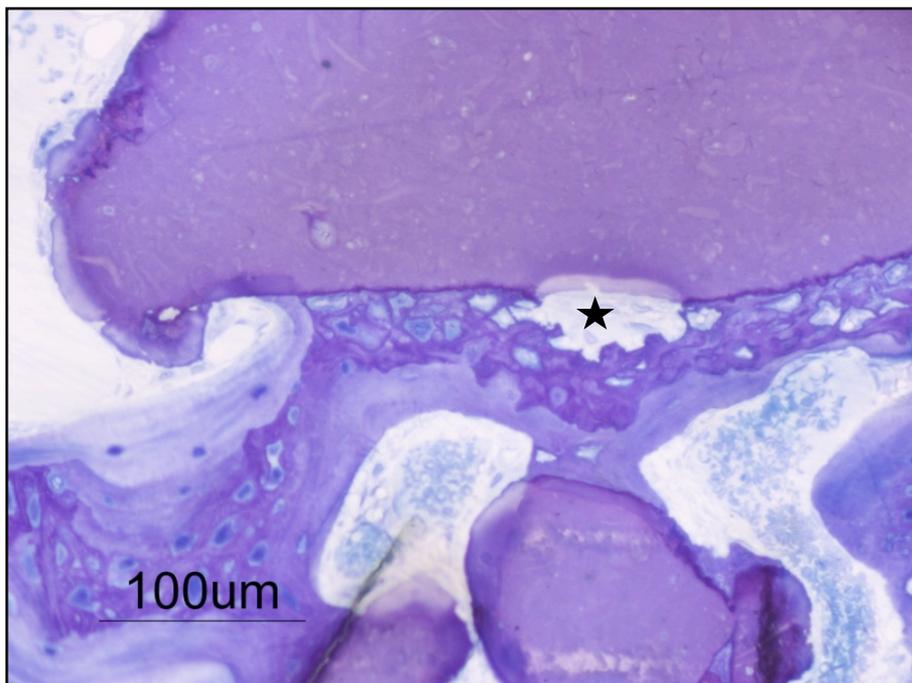


Figura. 56- Trabéculas ósseas estabelecendo uma ligação entre partículas de HA. Observa-se a existência de uma grande quantidade de tecido lamelar. É visível a reabsorção simultânea de uma área de tecido ósseo imaturo e de uma área da partícula (★).

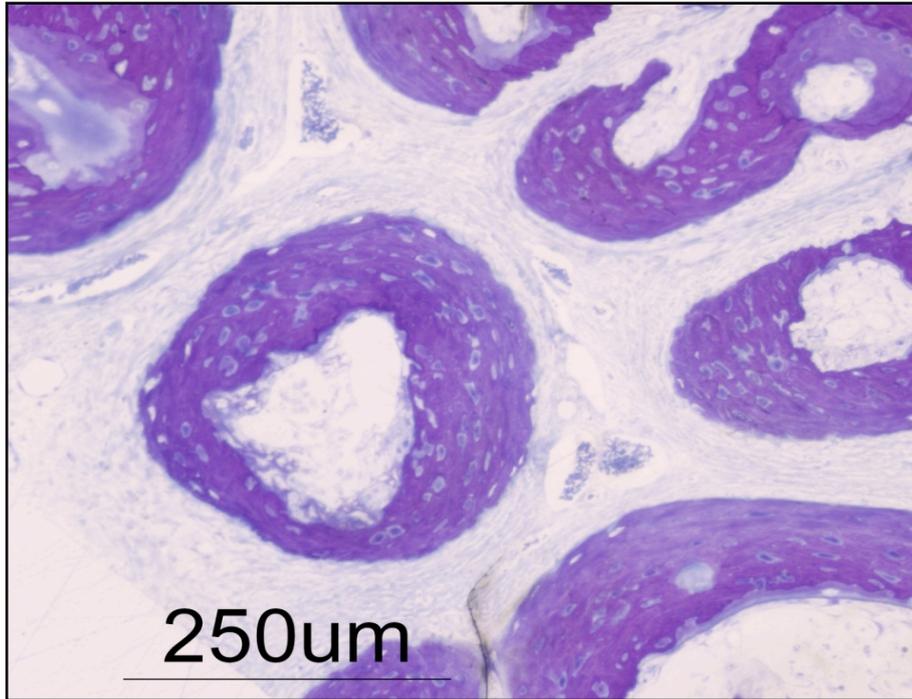


Figura 57 – Formações ósseas arredondadas com características invulgares parecendo constituir uma fase intermédia entre tecido ósseo imaturo e lamelar, rodeados por abundante tecido conjuntivo denso. São visíveis sinais de remodelação óssea nas superfícies endósteais.

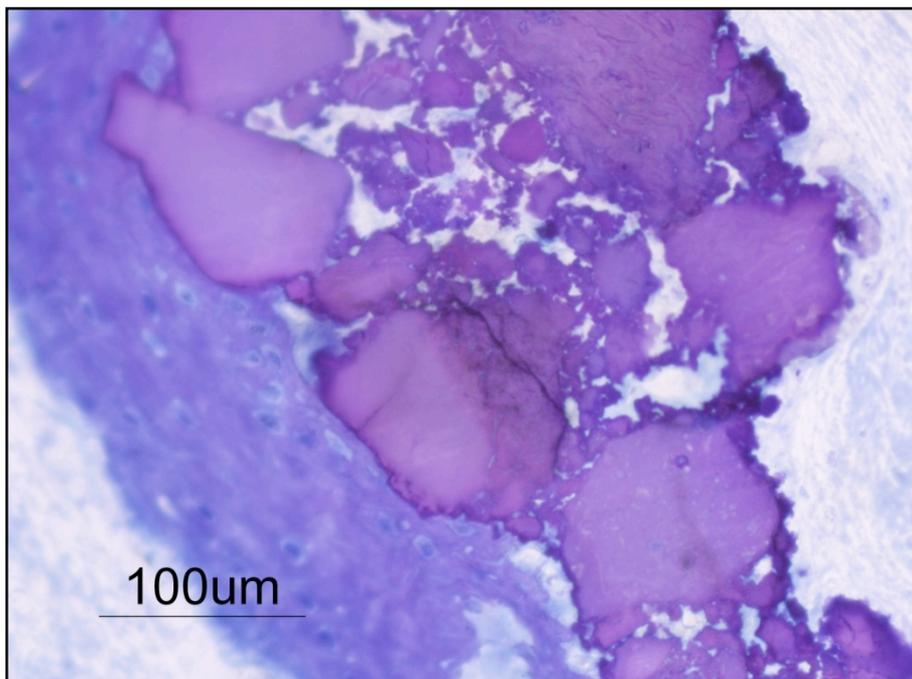


Figura 58 – Aspecto do processo das partículas, aos trinta dias. É possível observar a presença de tecido ósseo com características pouco definidas.

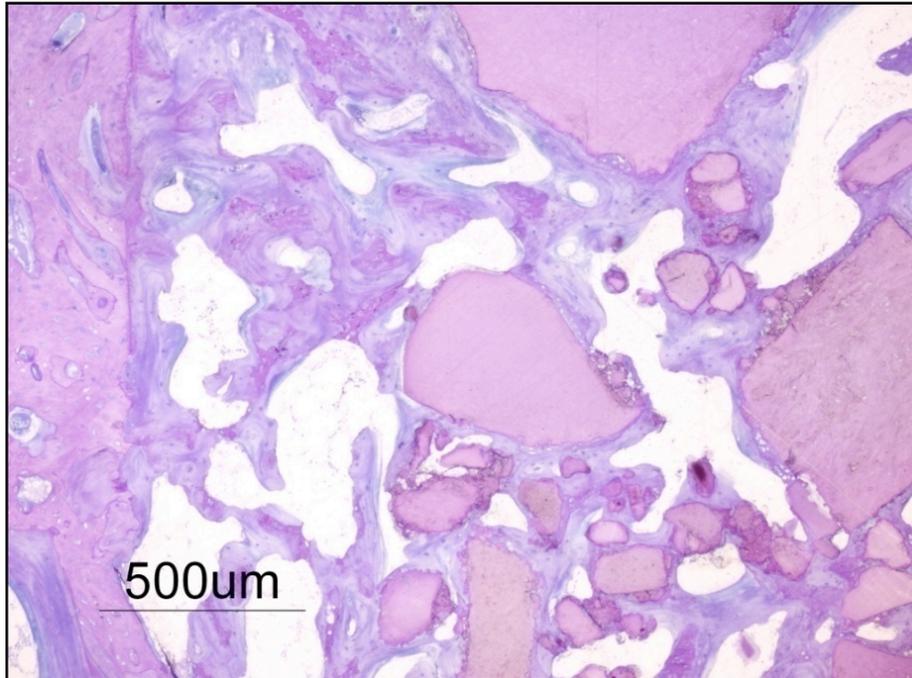


Figura 59 – Zona periférica de um corte horizontal de um defeito, aos trinta dias, mostrando partículas de HA osteointegradas e trabéculas ósseas bastante organizadas ligando as partículas entre si e às paredes do defeito.

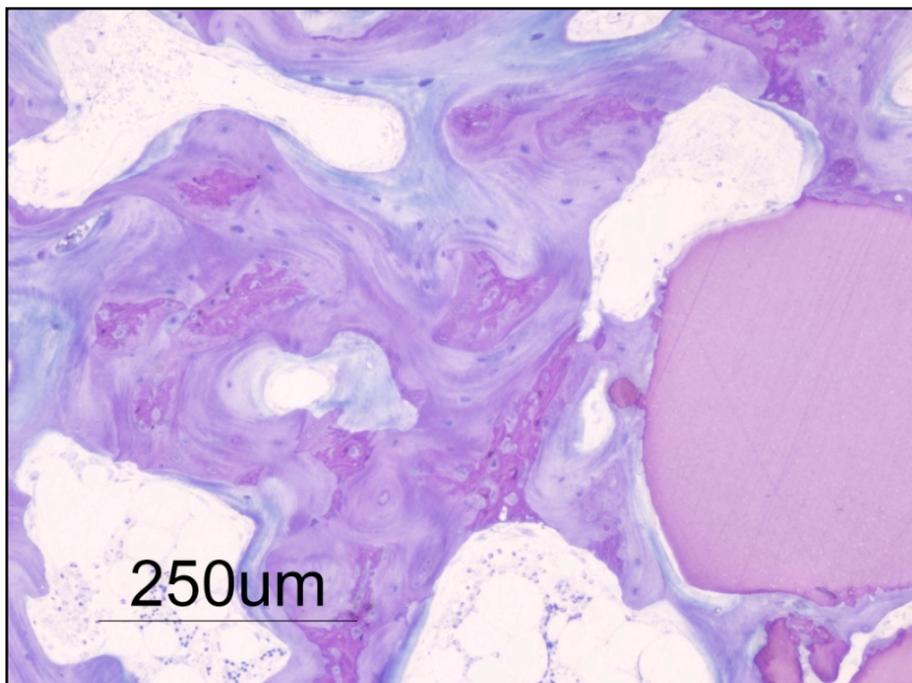


Figura. 60- Aspecto da organização histológica das trabéculas ósseas, aos trinta dias, mostrando uma intensa dinâmica de remodelação óssea. Observa-se ainda a presença de medula óssea entre as trabéculas.

4- DISCUSSÃO

A utilização de modelos de experimentação animal é comumente aplicada na área da regeneração óssea, revelando-se fundamental no auxílio da resolução de questões clínicas da patologia humana.

Os modelos animais contribuem de forma ímpar para a avaliação da eficácia biológica e funcional de vários materiais substituintes ósseos. A escolha do modelo animal adequado é o primeiro passo crítico no desenho de um procedimento experimental bem como na extrapolação dos resultados para o panorama clínico^{185, 186}. De acordo com Einhorn¹⁸⁷, a utilização apropriada de modelos animais na investigação relacionada com engenharia tecidual inicia-se com a criteriosa consideração da questão colocada, tornando-se desta forma evidente a necessidade de pensar toda a fase experimental a montante da mesma. Após esta cuidadosa selecção da questão a responder coloca-se a escolha do modelo animal, também ela objecto de concentrada dedicação. Esta preocupação na escolha do modelo animal é tema universal e ainda recentemente foi abordada no 6º Workshop Europeu de Periodontologia¹⁸⁸.

As implicações científicas e éticas envolvidas na escolha do modelo animal apropriado são frequentemente tema de debate. Esta escolha deve ter sempre presente o “Princípio dos 3 R’s” (Russel & Burch (1954)): Substituição (“*Replacement*”), Redução (“*Reduction*”) e Refinação (“*Refinement*”). Substituição refere-se à troca de um animal vivo por material inanimado. Redução significa a diminuição, ao mínimo indispensável, do número de animais utilizados de forma a obter informação em determinada quantidade e precisão. Refinação refere-se à diminuição na incidência ou severidade de procedimentos desumanos aplicados aos animais que serão utilizados (http://altweb.jhsph.edu/publications/humane_exp/chap4d.htm). Assim, num estudo experimental envolvendo a utilização de animais, o seu número pode ser reduzido (Redução) recorrendo, por exemplo, a estudos piloto ou “*in vitro*”, à partilha de experiências entre laboratórios e investigadores ou ao desenho cuidadoso da metodologia. A sua substituição pode ser feita recorrendo a sistemas computadorizados, sistemas avançados “*in vivo*”, a organismos inferiores, bem como a células, tecidos e cultura de órgãos. No que concerne à refinação ela pode ser executada recorrendo a pessoal bem treinado, equipamento adequado, optimização ambiental e eutanásia humanizada.

Assim, aquando desta escolha devemos ter em consideração alguns factores: 1) adequabilidade do modelo animal; 2) potencial e extrapolação expectável para o ambiente clínico; 3) homogeneidade genética do modelo animal específico; 4) disponibilidade de informação sobre anatomia, fisiologia, cicatrização óssea e propriedades biomecânicas ósseas, do modelo utilizado; 5) custo e disponibilidade do modelo; 6) generalização dos resultados ao longo da espécie; 7) facilidade e adaptabilidade do modelo a manipulações experimentais e laboratoriais; 8) considerações ecológicas e 9) implicações éticas e sociais^{185, 186, 189-191}, sendo que este último possui uma crescente importância nas sociedades ditas mais desenvolvidas.

Todos os seres vivos foram classificados pela espécie humana de acordo com a sua afinidade filogenética e semelhanças biológicas. Assim, os animais são classificados de acordo com o seu Filo, Classe, Ordem, Família, Género e Espécie. Entre os vários animais disponíveis os primatas não humanos (PNH) apresentam-se como sendo os animais filogeneticamente mais próximos dos humanos, preenchendo muitas das solicitações consideradas primordiais que permitem uma mais correcta extrapolação dos resultados para a espécie humana, como seja o facto de mais se aproximarem da espécie humana em termos de fisiologia da cicatrização^{192, 193}. No entanto, nem todas as experiências relativas a engenharia de tecido ósseo necessitam de PNH. Smith (1969) e Reynolds (1969) sugeriram alguns critérios para a determinação do modelo animal adequado para estudos de toxicologia^{194, 195}. Assim, Smith, após um estudo com vários mamíferos, reportou uma grande variabilidade no metabolismo de diferentes drogas ao longo dos vários grupos de primatas. Desta forma sugeriu que a escolha do modelo animal adequado fosse baseada em vias fisiológicas adequadas entre o modelo e humanos, e não necessariamente pela afinidade filogenética (“phyletic”). Goldstein (2002) propôs que a escolha do modelo animal adequado para engenharia de tecido ósseo também estivesse relacionado com o nível de hipótese testado, com a extrapolação expectável para a condição humana e com o mercado comercial onde o material de enxerto ósseo seria aplicado¹⁸⁶.

Um outro modelo animal bastante utilizado na experimentação relacionada com regeneração óssea é o cão. Neyt e colaboradores (1998) concluíram que o cão (e o gato) era utilizado em 11% da investigação músculo-esquelética publicada entre 1991 e 1995¹⁹⁶. Mais tarde, Martini e colaboradores (2001) constataram que, entre 1970 e 2001, 9% dos estudos ortopédicos utilizaram o cão como modelo animal¹⁹⁷. Dependendo da raça e tamanho do cão pode haver alguma discrepância na

macroestrutura, nomeadamente no tamanho e forma dos osso humanos e canídeos. Wang e colaboradores (1998) efectuaram um estudo onde foram analisadas as diferenças nas propriedades de fractura óssea entre bovinos, babuínos, coelho e cão, bem como a sua correlação entre a composição e a microestrutura¹⁹⁸. Concluíram que no osso humano adulto existe uma estrutura haversiana secundária (sistemas de Havers maiores que 100µm com vasos sanguíneos e linhas cimentantes que delimitam sistemas adjacentes) enquanto que no modelo canídeo o osso possui uma microestrutura mista composta predominantemente por osso haversiano no centro do osso cortical, mas com osso plexiforme nas áreas adjacentes ao endóstio e perióstio. Por outro lado, e apesar das semelhanças na composição orgânica, o osso canídeo possui uma densidade mineral superior à do osso humano¹⁹⁸. Relativamente à remodelação óssea existe uma diferença na sua taxa entre o modelo canídeo e o humano, sendo o *ratio* de remodelação óssea humana é mais baixo do que o canídeo^{199, 200}. No entanto, e apesar de haver semelhanças estruturais no *turnover* do osso trabecular entre o cão e humano²⁰¹, torna-se difícil estabelecer uma comparação exacta entre ambas as espécies²⁰². O *turnover* do osso trabecular no cão é altamente variável entre as várias localizações de osso e entre indivíduos/espécies. A sua média no *turnover* ósseo trabecular em todo o corpo canídeo é cerca de 100%²⁰¹. A remodelação da totalidade da massa óssea por ano nos humanos é de 5-15%, estimando-se que o *turnover* da totalidade de osso trabecular varie de 10-15% a 40-55% por ano^{201, 203}. No que diz respeito ao osso cortical canídeo ocorre, igualmente, uma variação no *turnover* ósseo de acordo com diferentes locais²⁰⁴. Sabe-se igualmente que a idade afecta não só o normal *turnover* como também a resposta óssea relativamente ao material implantado.

No âmbito da avaliação pretendida para o presente trabalho, não optámos por nenhum dos modelos atrás mencionados. Esta decisão deveu-se não só a condicionantes temporais e logísticas (como seja o cumprimento de prazos devidamente definidos), como, acima de tudo, a elevados custos para a sua aquisição, manipulação e manutenção, relacionados com protocolos experimentais mais longos e infra-estruturas adequadas para este tipo de animal.

Desta forma a nossa selecção recaiu sobre o coelho, como modelo animal, tendo em conta a experiência que temos tido ao integrar o grupo de investigação do Laboratório de Tecidos Duros do Departamento de Medicina Dentária da FMUC. Esta escolha prende-se com a facilidade de manuseamento e num metabolismo ósseo aproximado a animais de maior porte e ao homem²⁰⁵. A regeneração óssea no coelho ocorre numa proporção duas vezes superior à do cão e três mais rápida que a dos

humanos. O ciclo completo de remodelação óssea (reestruturação interna do osso pré-existente) é constituído por quatro fases, conhecidas globalmente como período sigma: activação das células ósseas precursoras (A), seguido por uma reabsorção activa (R), uma fase queiscente ou reversa (Q) e de formação óssea (F). Este período sigma tem a duração de 6 semanas no coelho, 12 semanas no cão e 18 semanas nos humanos²⁰⁶.

Optámos pelo modelo de cicatrização retardada na calote craniana do coelho. O defeito crítico no crânio do coelho, o mais pequeno defeito ósseo que não cicatriza espontaneamente, com uma quantidade de nova formação óssea inferior a 10%, durante a vida do animal¹⁸⁵ corresponde a um defeito único de 15mm²⁰⁷. Contudo, este defeito apresenta algumas desvantagens entre as quais realçamos a interferência com a sutura sagital (maior risco cirúrgico de hemorragia e possível intervenção do tecido conjuntivo na cicatrização), a impossibilidade de produzir dois defeitos por animal (o que aumentaria o número de animais necessário para o estudo e custos associados) e um período mínimo de avaliação de 24 semanas, tempo considerado excessivo para estudos preliminares com insuportáveis condicionantes económicas para um projecto nesta fase. De forma a ultrapassar estas limitações, foi estabelecido um modelo de dimensão crítica retardada com defeitos de 8 mm nos ossos parietais do coelho, originalmente criado por Kramer e colaboradores (1968a) e posteriormente desenvolvido por outros (Damien e colaboradores (1991,1994); Thaller e colaboradores (1993, 1994)^{208 209-212} e, em particular no nosso Departamento de Medicina Dentária da FMUC, por Guerra (2003) e Matos (2008)²¹³. A evidência de cicatrização destes defeitos ocorre apenas a partir das 16 semanas, antes das quais funcionam como se de verdadeiros defeitos críticos se tratassem, o que torna este modelo como o mais apropriado para estudos de curta duração, o que aliás era o pretendido. Além disso, a possibilidade de efectuar dois defeitos por animal em cada osso parietal, permitindo a comparação directa entre modalidades experimentais, com redução da variabilidade individual, e a conseqüente necessidade de um menor número de animais, torna este modelo atractivo em termos económicos e permite uma maior rotação dos espaços nas salas de manutenção.

Outro aspecto que não podemos deixar de mencionar relativamente a este modelo diz respeito às características morfofuncionais e embriológicas dos locais anatómicos seleccionados.

O processo de formação, crescimento e desenvolvimento do tecido ósseo pode ser levado a cabo por dois tipos de mecanismos distintos: ossificação

intramembranosa e ossificação endocondral. A distinção entre ambos é feita através da presença (ossificação endocondral) ou ausência (ossificação intramembranosa) de uma fase de tecido cartilágneo²¹⁴. Os ossos chatos da abóbada craniana partilham com a maioria das estruturas do complexo maxilofacial uma origem embriológica comum e um processo de ossificação intramembranoso. Os maxilares, com excepção de um segmento do processo coronóide e a região média da sínfise, a calote craniana e os ossos parietais seguem o mesmo tipo de ossificação²¹⁵. Neste âmbito, será importante salientar que os enxertos provenientes de ossos formados por um processo de ossificação intramembranosa mostram uma mais precoce revascularização e uma menor velocidade de reabsorção do que os de natureza endocondral²¹⁶. Com efeito, a reabsorção que se segue à transplantação dum autoenxerto é muito menor com enxertos mandibulares (de natureza intramembranosa) do que provenientes da crista ilíaca (de natureza endocondral), considerado ainda como um local de eleição²¹⁷. Apesar de limitadas, estão já bem determinadas zonas anatómicas reconhecidas como locais ideais de doação óssea intra-oral^{218, 219}. De um ponto de vista anatómico, a calote craniana é constituída por duas tábuas corticais com uma escassa quantidade de osso esponjoso e de medula óssea entre ambas. Desta forma resulta um osso compacto semelhante ao da mandíbula²⁰⁷. Fisiológica e embriologicamente, os ossos da calote craniana assemelham-se a mandíbulas atróficas²²⁰.

Ainda neste contexto importa recordar uma questão que não pode ser negligenciada em medicina dentária nem na área da cabeça e pescoço. Trata-se da origem muito peculiar dos ossos da face e do crânio. Estas estruturas, tal como o cemento e a dentina, têm origem no ectomesênquima constituído, não só, por células de natureza mesenquimatosa como também por células derivadas das cristas neurais. Estas células contribuem para a formação dos arcos branquiais e conferem aos seus derivados características muito próprias com grandes capacidades pluripotenciais de proliferação e diferenciação celulares. Estes aspectos estão na base de muitos comportamentos peculiares observados nos tecidos constituintes destas regiões, podendo explicar o aparecimento de áreas de tecido ósseo com características e arquitectura atípicas, como o descrito e documentado nos “Resultados” (figs. 57 e 58), bem como o facto dos processos de osteogénese observados neste trabalho serem, todos, de natureza intramembranosa.

Considerando a sua configuração, o defeito ósseo na calote craniana é um defeito de reduzida contenção física, sendo por isso considerado como o teste mais exigente para qualquer material de enxerto¹⁷⁴. Tendo em conta os vários factores

enunciados, este modelo tem sido considerado como um excelente modelo para avaliação de materiais de enxerto em Medicina Dentária, enquadrando-se e adequando-se bem aos objectivos deste trabalho. É ainda considerado um dos modelos mais utilizados e melhor caracterizados na literatura ²¹³.

≈ ≈

Os períodos de análise considerados neste trabalho foram de 2 e de 4 semanas de evolução pós-operatória. A primeira fase (2 semanas) é considerada como o período mínimo razoável para se identificarem os primeiros indícios de uma cicatrização óssea decorrente da metodologia utilizada ^{213, 221}. A segunda fase (4 semanas) é aceite como uma referência temporal para se observarem efeitos significativos nos processos de angiogénese e formação óssea, como resposta à implantação de materiais de substituição óssea^{213, 221-223}. No estudo por nós efectuado corroborámos estes dados, tendo verificado, às 4 semanas, alterações histológicas consideráveis que permitiram avaliar diferenças no desempenho e o potencial regenerativo dos vários materiais utilizados.

Relativamente ao método histológico utilizado para processamento dos tecidos optámos por uma técnica não descalcificada. Esta técnica pareceu-nos a mais acertada, pois permitiu a obtenção de imagens histológicas de elevada qualidade, não tendo ocorrido distorção morfológica das estruturas a observar, nem se tendo verificado a presença de artefactos relevantes. Para o processamento das amostras recorreu-se ao sistema Exact® de alta precisão. Este sistema e a metodologia adoptada revelaram-se como uma abordagem de referência, superando claramente as desvantagens da técnica descalcificada. De facto, os processos de descalcificação conduziram invariavelmente a alterações volumétricas dos grânulos de fosfato de cálcio, à indução de inúmeros artefactos, bem como a um arrastamento de tecidos maioritariamente devido ao uso de micrótomos convencionais com baixa precisão e reduzido poder de corte ²²¹. A utilização de azul de Toluidina, como corante, permitiu a obtenção de microfotografias adequadas a uma correcta avaliação histológica das várias estruturas a analisar.

Antes de iniciarmos uma discussão diferenciada de cada um dos defeitos e seu preenchimento, pareceu-nos vantajoso fazer algumas considerações gerais essencialmente relacionadas com reacções inespecíficas (consideradas como uma

resposta do tecido ósseo) atribuídas particularmente ao traumatismo cirúrgico e às características anatómicas da sua localização.

Entre elas destaca-se a formação de uma estreita zona de tecido ósseo trabecular, na margem dos defeitos, aspecto comum a todos eles, independentemente do material utilizado. O aparecimento de trabéculas ósseas num local ósseo em cicatrização é o resultado do recrutamento e migração de células osteogénicas, precedendo sempre o mecanismo de formação de matriz óssea. A matriz óssea não tem, por si só, capacidade de crescer nem propagar-se, isto é, uma vez formada não se move em relação aos tecidos biológicos vizinhos. Tendo em conta este facto facilmente se compreende que quem invade e coloniza a superfície dos biomateriais é uma população celular migratória da linha osteogénica²²¹. Esta actividade osteogénica será mais da responsabilidade da parede do defeito, constituindo uma resposta das superfícies ósseas expostas ao traumatismo, do que propriamente do material de substituição óssea utilizado. No entanto, não poderá ser menosprezada uma certa influência da massa crítica de células osteogénicas que respondem à chamada feita pelos vários materiais em análise²²¹.

É importante referir aqui o intenso processo de remodelação observado nestas regiões (parede do defeito), nas primeiras duas semanas de evolução pós-operatória. De facto, as numerosas áreas e cones de reabsorção visíveis nestas regiões e neste período, têm certamente um importante papel na condução de inúmeras populações celulares em direcção à margem/periferia do defeito. Por outro lado, e paralelamente às áreas de reabsorção, foi também observada com frequência uma grande actividade de formação óssea. Este facto, fica também a dever-se ao traumatismo cirúrgico que vai desencadear, por si só, uma intensa resposta osteogénica. Toda esta actividade e dinâmica funcional (de reabsorção/formação óssea) tem por objectivo iniciar o processo de reparação/regeneração óssea, representando, para além de uma adaptação mecânica às novas condições, uma tentativa de preenchimento do defeito ósseo com base na sua parede. Esta reacção inespecífica comum a todos os defeitos ósseos criados, é visível apenas na sua zona marginal, verificando-se que o preenchimento e regeneração óssea em direcção às áreas centrais, ao contrário do que ocorre na periferia, não é igual para todos os materiais utilizados.

A quantidade e qualidade de tecido ósseo formado e a sua progressão (no sentido centrípeto) depende já das características/propriedades osteocondutoras dos materiais de substituição óssea que terão um papel importante de forma a potenciar e acelerar a regeneração óssea e assim permitir um rápido e mais completo preenchimento do defeito²²⁴. Com efeito, para além de uma certa espessura, a

progressão da actividade osteogénica começa a adquirir especificidades relacionadas com cada um dos materiais em estudo. As características de cada um dos materiais irão estar na base das posteriores diferenças observadas no preenchimento das regiões mais internas do defeito, pois aqui o papel osteogénico da parede do defeito (células, vasos sanguíneos) será muito menor.

Às duas semanas começam, de facto, a tornar-se evidentes as diferenças na quantidade e qualidade de tecido ósseo recém-formado demonstrando, assim, as reais capacidades de cada um dos materiais em estudo neste modelo. Com efeito, a análise efectuada às duas semanas é um verdadeiro marco, tornando visível toda a dinâmica e eficácia que caracteriza os processos iniciais de cicatrização, permitindo ainda estabelecer uma previsão da evolução que iremos encontrar às quatro semanas²²¹.

A presença de um biomaterial pode influenciar, só por si, a composição e a concentração de factores de crescimento, no local da lesão, actuando como um “*bio-reactor*”²²⁴. A manipulação dos biomateriais, no sentido de potenciarem uma boa resposta osteoblástica, é um campo em constante evolução e merecedor de toda a atenção.

O aspecto mais saliente, de todos os defeitos ósseos, às duas semanas de evolução é a presença de áreas de tecido ósseo imaturo, muitas delas localizadas à superfície dos biomateriais.

Descreve-se mais facilmente o tecido ósseo imaturo considerando as características que não tem do que as que realmente tem. Assim, nunca forma lamelas ou sistemas de Havers, não apresentando também uma estrutura organizada nem das fibras de colagénio nem dos cristais de hidroxiapatite (que por sua vez também não têm um alto grau de cristalinidade) e, sobretudo, não possui uma resistência mecânica adequada²²⁵. Porém, é o único tipo de tecido ósseo que pode ser formado *de novo*, não necessitando de uma estrutura óssea ou cartilágnea prévia. O seu aparecimento resulta, sempre, de um crescimento acelerado, próprio de um processo de cicatrização, sendo essencialmente um tecido ósseo sintetizado em S.O.S., isto é, como uma resposta rápida formada com carácter de urgência num curto período de tempo²²⁶. Devido à rapidez do seu processo de formação não é de admirar a sua estrutura desorganizada e a sua grande densidade celular. Este aspecto que justifica o nome de “*Woven bone*” (“entrelaçado”: *in* <http://pt.wiktionary.org/wiki/woven>) associado à sua fraca resistência mecânica, justifica a sua rápida reabsorção.

Por outro lado, o tecido ósseo lamelar para se formar, necessita da presença de um suporte de matriz óssea ou cartilágnea, que lhe sirva de base, encontrando-se no entanto muito bem organizado em camadas paralelas (lamelas), constituídas por

Considerando que os materiais utilizados neste estudo foram todos aplicados sob a forma de grânulos/partículas o espaço entre eles (interparticulares) irá colmatar alguns “défices” de porosidade (intraparticular) inerentes a estes materiais, reconhecendo-se, desde logo, a importância da porosidade nos processos de angiogénese e osteogénese²³⁰.

Sempre que se aplica um material granulado/particulado há que atender não só à constituição e características das próprias partículas mas também, e sobretudo, à sua adequada compactação. Com efeito, torna-se crucial que as superfícies dos grânulos/partículas fiquem disponíveis para a colonização celular, através de um adequado espaçamento que funcionará da mesma forma que um sistema aberto de intercomunicação de poros²³¹⁻²³⁴. Por sua vez, este processo está directamente relacionado com o tamanho e forma das partículas. No presente trabalho confrontámo-nos muitas vezes com partículas muito heterogéneas, tanto na sua forma como no seu tamanho, o que pode tornar difícil a interpretação dos resultados obtidos. Esta situação foi particularmente evidente com as partículas de hidroxiapatite sintética, onde a disparidade de tamanhos era notável.

Defeitos sem preenchimento

Os defeitos sem preenchimento (controlo negativo) evidenciaram uma diminuta formação óssea tanto às duas como às quatro semanas. Em termos globais verificou-se uma evolução no sentido de uma cicatrização e não de uma verdadeira regeneração óssea. A maioria dos defeitos apresentou-se constituída por uma fina ponte fibrótica originando o colapso dos tecidos moles. Na verdade, constatou-se sempre a persistência de uma grande quantidade de tecido fibroso apresentando apenas, um pequeno reforço ósseo nas margens dos defeitos. Esta actividade osteogénica, limitada à zona marginal do defeito, será, como já foi referido, o corolário de uma reacção inespecífica de resposta à agressão cirúrgica, característica de todo o tecido ósseo.

Foram, no entanto, observadas algumas “ilhas” isoladas de tecido ósseo imaturo, assemelhando-se a centros de ossificação, localizadas nas zonas mais centrais do defeito, sem qualquer continuidade com as margens. A presença destas “ilhas” é, também, corroborada por estudos de Guerra (2003), Matos (2008) e Polimeni e colaboradores (2009). Tendo em conta a sua escassez às 4 semanas, estas “ilhas” contribuem de forma insuficiente para a melhoria da regeneração óssea.

Defeitos preenchidos com osso autógeno

Considerando que para uma boa regeneração óssea é desejável que o material de substituição possua propriedades físicas, químicas e mecânicas semelhantes às do tecido a reparar, facilmente se compreende que o próprio tecido ósseo constitua uma solução tentadora e quase sempre a melhor.

Nestes defeitos verificou-se, como era expectável, uma intensa neoformação óssea e um nítido e rápido processo de incorporação dos fragmentos de osso autógeno.

Com efeito, os defeitos preenchidos com fragmentos de autoenxerto apresentaram um desenvolvido processo de osteointegração. O conjunto de imagens apresentadas ilustra bem um processo sequencial e centrípeto de síntese e maturação de tecido ósseo, em que os defeitos foram sendo progressivamente ocupados por uma notável quantidade de trabéculas ósseas. Estas trabéculas estavam constituídas por numerosas áreas de novo osso revestindo, integrando e ligando os fragmentos de autoenxerto entre si e às paredes do defeito. No final do período experimental era visível, ao longo de todo o defeito, a presença de muitas zonas de tecido ósseo lamelar e, apenas, alguns vestígios de tecido ósseo imaturo. A actividade osteoclástica, traduzida por inúmeras linhas de reversão, foi bastante intensa levando à reabsorção das áreas de tecido imaturo e de fragmentos de autoenxerto, em paralelo com a formação de tecido lamelar.

Os enxertos autógenos, como é sabido, são o único tipo de enxertos que apresentam em simultâneo propriedades osteocondutoras, osteoindutoras e osteogénicas. Estes enxertos constituem, pelo menos teoricamente, sistemas que contêm todos os elementos necessários para uma formação óssea directa. De facto, ao incluir células competentes e respectiva matriz de suporte, não necessitam de medidas adicionais para além de uma correcta estabilidade mecânica e um leito vascular e metabólico adequados. Convém realçar, no entanto, que num autoenxerto, podem perder-se algumas das suas propriedades (durante o período de tempo que medeia a colheita e a colocação) e que, mesmo que muitas células possam sobreviver à transferência, são as células osteogénicas e osteoprogenitoras do hospedeiro (parede do defeito) que asseguram maioritariamente a vitalidade e funcionalidade deste autoenxerto^{213, 221}.

Este bio“material” constitui sempre uma referência em relação à qual todos os outros “bio”materiais devem ser comparados.

Defeito preenchido com um xenoenxerto de origem bovina

Para além do osso autogéneo os materiais xenógenos constituem, também, uma boa alternativa como materiais de enxerto ósseo. Porém, as propriedades biológicas dos xenoenxertos, à partida muito promissoras, podem ser condicionadas pelo tipo de tratamento a que são submetidas durante a sua preparação, esterilização e conservação, para evitar a rejeição imunológica após a implantação³. Apesar disso, as partículas deste xenoenxerto fornecem uma matriz, que é química (relação Ca/P semelhante à do tecido ósseo 2:1) e morfologicamente muito próxima da matriz óssea mantendo uma disposição dos cristais de HA muito semelhante à matriz colagénica que lhe serviu de molde. Esta organização da fase mineral, é conservada, como já foi referido, devido ao processamento deste material a relativamente baixa temperatura (300°C). Esta condição preserva, também, a microporosidade original bem como a sua topografia de superfície.

As hidroxiapatites de origem natural e porosas, apresentam uma maior elasticidade, o que permite uma melhor distribuição e transmissão do stress mastigatório ao osso subjacente. Ao permitir a revascularização e a subsequente colonização por células ósseas possibilitam uma replicação do fenómeno natural da cicatrização⁶.

Assim, os nossos resultados obtidos com esta hidroxiapatite natural mostraram uma aposição óssea crescente à superfície das partículas e, simultaneamente, nos espaços interparticulares, com o aparecimento de trabéculas constituídas por tecido imaturo e lamelar, ligando as partículas entre si e às paredes do defeito. Foi também visível a existência de numerosos processos de reabsorção osteoclástica, levando à degradação e fragmentação de muitas partículas.

A reabsorção de matriz óssea desproteínizada de origem bovina através da actividade osteoclástica é, ainda, tópicos de controvérsia³, especialmente quando comparamos resultados de estudos com experimentação animal e estudos clínicos humanos. Klinge e colaboradores (1993), utilizando, tal como no presente trabalho experimental, um defeito craniano no coelho, observou que as partículas de osso bovino desmineralizado tinham desaparecido quase completamente após 14 dias de cicatrização, como resultado da acção fagocitária de células gigantes multinucleadas²³⁵. Apesar de alguns estudos humanos^{236 237} detectarem a reabsorção osteoclástica deste material, a maioria²³⁸⁻²⁴⁴ não consegue detectar uma grande evidência da sua reabsorção. De acordo com o fabricante, durante o processamento deste biomaterial

todas as proteínas foram extraídas. Por outro lado, de um ponto de vista biológico, como já mencionado, o processo de reabsorção requer a presença de moléculas de adesão (sequências RGD) que permitam a união de células osteoclásticas a proteínas da matriz extracelular (fibronectina, fibrinogénio, vitronectina, colagénio tipo I, osteopontina e sialoproteína óssea)²⁴⁵. Como este derivado de osso bovino foi previamente desproteínizado, ficando livre de proteínas^{246, 247} a reabsorção osteoclástica provavelmente não poderá ocorrer, apenas com base nestes mecanismos fisiológicos. Porém, estudos de Schwartz e colaboradores (2000) conseguiram encontrar TGF- β e BMP-2 nestes biomateriais, derivados de osso bovino, o que poderá explicar, em parte, a intensa reabsorção encontrada¹⁷⁶.

Schneider e colaboradores (2009), utilizando defeitos não críticos na calote do coelho, obtiveram resultados histológicos com este xenoenxerto muito semelhantes aos nossos. Verificaram, às quatro semanas, a presença de tecido ósseo com características lamelares, maturo, a rodear e interligar as partículas de xenoenxerto²⁴⁸.

Os resultados experimentais e clínicos destes materiais têm sido muito satisfatórios, de tal modo que o seu campo de aplicação de tem diversificado amplamente, tanto na cirurgia dentária como na cirurgia ortopédica e traumatológica⁶.

Este material pode representar uma estrutura intermédia entre a matriz óssea e uma hidroxiapatite sintética, contendo menos grupos hidróxil e mais iões carbonato do que as formas sintéticas⁶.

Em síntese, pode afirmar-se que as partículas deste xenoenxerto de origem bovina demonstraram, neste estudo, uma boa capacidade osteocondutora e que a composição química de uma matriz bastante próxima da fase mineral do tecido ósseo deverá, sem dúvida, favorecer e estimular os processos de formação e posterior remodelação de tecido ósseo.

Defeito preenchido com hidroxiapatite sintética

Nos defeitos ósseos preenchidos com hidroxiapatite sintética salienta-se, desde logo, a presença de partículas, com forma e dimensões muito heterogéneas. A par de partículas de grande tamanho, muitas delas com “*sharp edged*” observava-se, também, a existência de imensas partículas de pequenas dimensões. Porém, todas estas partículas começam por apresentar, logo aos quinze dias, uma nítida aposição de tecido ósseo imaturo. Estas observações estão de acordo com estudos de Sun et al²⁴⁹ que constataram, numa cultura de osteoblastos, que esta população celular crescia de forma semelhante em partículas de HA sintéticas cuja dimensão variava de 37 a

841µm. Deste modo, concluíram estes autores, que as características da HA em si, mais do que o tamanho dos grânulos, parecem ser responsáveis pelo comportamento biológico deste material.

Aos trinta dias encontram-se já muitas partículas perfeitamente osteointegradas e trabéculas ósseas bastante organizadas, maioritariamente constituídas por abundante tecido lamelar. Em paralelo registou-se uma acentuada actividade de remodelação óssea, traduzindo uma intensa dinâmica funcional deste tecido, associada a uma forte reabsorção das partículas de hidroxiapatite.

Contribuindo para a intensa actividade osteogénica encontrada poderá estar a formação de uma activa interface entre as partículas de hidroxiapatite em estudo e o tecido ósseo sobre elas formado. De facto, nos locais onde esta interface não estava presente, também não se observava qualquer aposição óssea. Esta fina camada parece estabelecer uma íntima relação com o novo tecido ósseo, podendo estar na base da sua formação. Deste modo, somos levados a crer que existe uma relação directa entre esta camada, certamente formada por uma apatite carbonatada, e o aparecimento de novo tecido ósseo. Esta apatite, quimicamente semelhante à encontrada no tecido ósseo, irá certamente condicionar a adsorção de proteínas que por sua vez irão modular e mediar os processos de adesão celular⁴, sendo co-responsável pela eficácia deste biomaterial.

A observação das lâminas histológicas mostrou também um intenso processo de reabsorção das partículas de HA sintética, caracterizado pela presença, na sua superfície, de concavidades em tudo semelhantes a lacunas de Howship e células multinucleadas com uma morfologia típica de osteoclastos. Convém recordar, mais uma vez, que no caso destes materiais de substituição óssea, tal como no xenoenxerto de origem bovina, os osteoclastos aderem a matrizes desprovidas de proteínas (fibronectina, fibrinogénio, vitronectina, colagénio tipo I, osteopontina e sialoproteína óssea)²⁴⁵ que, em condições fisiológicas, são essenciais para a ligação a integrinas envolvidas na formação de uma adequada zona de vedação¹³⁴. Esta situação tem que ser colmatada por outro tipo de proteínas, provenientes do coágulo de fibrina, do plasma sanguíneo ou do soro³, que, quando adsorvidas à superfície deste biomaterial exerçam um papel semelhante.

Mesmo sem excluir uma degradação físico-química, parece-nos ser possível afirmar que esta população celular da linha osteoclástica foi responsável, em grande parte, pelos processos de degradação e desagregação observados nesta hidroxiapatite. Esta observação foi também referida por outros autores²⁵⁰⁻²⁵².

Considerando a sua relação Ca/P (1,67) e o seu elevado grau de cristalinidade, facilmente se percebe que esta hidroxiapatite não reúne as melhores condições para justificar uma acentuada reabsorção^{249, 250}. Esta reabsorção pode realmente resultar do facto desta hidroxiapatite ser constituída por nanocristais de fosfato de cálcio. A presença de nanocristais, em tudo semelhantes aos encontrados no tecido ósseo (nanometricamente naturais), poderá ser um factor que irá facilitar a actividade osteoclástica à sua superfície. De facto, como já referido, a acção osteoclástica observada à superfície de uma nanohidroxiapatite é duas vezes maior que numa hidroxiapatite convencional. Ainda HA que ter em conta o facto de os cristais de hidroxiapatite possuírem um fraco arranjo estrutural, o que também vai proporcionar a sua degradação^{253, 254}.

Por último convém recordar que, as concavidades escavadas pelos osteoclastos na superfície das partículas, (apresentando uma geometria conformacional, dimensão, composição, microarquitECTURA e nanoestrutura de superfície ideais), constituem locais estratégicos e privilegiados para a formação de matriz osteóide e sua posterior mineralização. O microambiente assim gerado será muito propício ao aparecimento de um fenótipo osteoblástico, contribuindo para a formação e maturação de áreas de tecido ósseo. Estas lacunas podem, ainda, favorecer, ou mesmo contribuir, para uma sequestração de iões e de factores de crescimento ou outras proteínas com efeitos osteoindutores, estimulando ao mesmo tempo os processos de angiogénese, pré-requisito essencial para a osteogénese^{44, 106}.

Em síntese, o material utilizado neste grupo experimental reúne um conjunto de variáveis que isoladamente têm reconhecida actividade osteopromotora. A sinergia resultante da combinação das partículas de hidroxiapatite (com uma composição química adequada), dos seus nanocristais e de uma interface favorável formada por uma apatite carbonatada, poderá potenciar a adesão, proliferação e diferenciação tanto das células da linha osteoblástica como da linha osteoclástica. Deste modo estimulam uma intensa formação e posterior remodelação de matriz óssea justificando a *performance* deste biomaterial.

A arquitectura otimizada e “*biologically inspired*” desta hidroxiapatite, poderá estar na base do sucesso dos processos de regeneração óssea observados com este biomaterial.

Tanto quanto é do nosso conhecimento, não há trabalhos publicados, quer *in vivo* quer *in vitro*, com a utilização de uma HA sintética possuidora das características

da nossa. Esta HA sintética, produzida pelo Departamento de Engenharia Mecânica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da U.C., está a ser testada pela primeira vez. Como tal, torna-se difícil estabelecer um adequado termo de comparação entre os nossos resultados e aqueles obtidos com outro material substituinte ósseo sintético.

5- CONCLUSÕES

Com base nos resultados das observações histológicas do trabalho experimental efectuado podemos retirar as seguintes conclusões:

1- O modelo experimental utilizado revelou-se muito eficaz na avaliação do comportamento biológico de todos os materiais utilizados, ao longo dos períodos de tempo estipulados. Este modelo animal permitiu uma boa colheita, *en bloc*, dos defeitos contendo os materiais de enxerto em estudo.

2- A execução da técnica cirúrgica tem como pontos críticos a anestesia e a trepanação.

3- O Sistema Exakt®, existente no Laboratório de Tecidos Duros do Departamento de Medicina Dentária, Estomatologia e Cirurgia Maxilo-Facial da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, permitiu otimizar a técnica de processamento dos tecidos duros. A técnica não descalcificada proporcionou a obtenção de imagens histológicas onde foi possível identificar, sem artefactos, os elementos constituintes dos tecidos moles e dos tecidos duros, apresentando-se bem preservados e com uma excelente qualidade morfológica.

4- Os materiais utilizados, todos sob a forma de grânulos/partículas, mostraram uma adequada biocompatibilidade, traduzida pela ausência de reacções inflamatórias ou outras reacções adversas, bem como quaisquer alterações anátomo-patológicas nos tecidos envolventes e órgãos alvo.

5- Os defeitos sem preenchimento demonstraram, *per sí*, uma diminuta capacidade de regeneração óssea, não se tendo verificado, em nenhum dos casos estudados, a iminência de um completo e adequado encerramento. Foi, no entanto, visível um pequeno reforço ósseo nas margens dos defeitos, constituindo uma resposta do tecido ósseo à agressão cirúrgica.

6- Os autoenxertos continuam a apresentar-se como materiais de substituição óssea de excelência. Estes bio“materiais” constituem sempre uma referência em relação à qual todos os outros “bio”materiais devem ser comparados.

7- As partículas do xenoenxerto de origem bovina confirmaram, nesse estudo, uma boa capacidade osteocondutora. A composição química de uma matriz bastante próxima da fase mineral do tecido ósseo deverá favorecer e estimular os processos de formação e posterior remodelação de tecido ósseo.

8- A hidroxiapatite sintética evidencia uma capacidade osteocondutora, traduzida pela nítida aposição de tecido ósseo à sua superfície. Este tecido, às quatro semanas, já apresenta uma evidente maturação.

9- Verificaram-se intensos fenómenos de reabsorção, das partículas de hidroxiapatite sintética, maioritariamente da responsabilidade da actividade osteoclástica. De facto, foram visíveis muitas células multinucleadas à superfície das partículas apresentando uma morfologia típica de osteoclastos.

10- A uniformização da dimensão e macroarquitECTURA das partículas desta hidroxiapatite será importante, com o intuito de melhorar o seu desempenho e previsibilidade biológica.

6- RESUMO

A Medicina Dentária é uma área em constante evolução, tentando acompanhar as expectativas estéticas e funcionais de uma sociedade cada vez mais exigente. Neste sentido há, inúmeras vezes, a necessidade de estimular a regeneração do tecido ósseo em locais onde este se perdeu ou reabsorveu. Uma das formas de o conseguir consiste na utilização de biomateriais de substituição óssea que permitam a formação, o mais rapidamente possível, de um tecido ósseo com qualidade.

O autoenxerto continua a ser, devido às suas características e capacidades, o material de enxerto ósseo ideal. A sua obtenção está, no entanto, associada a uma segunda cirurgia (para a sua colheita) e subsequente morbidade, bem como a uma quantidade, muitas vezes insuficiente, que não irá satisfazer o volume de defeito ósseo a tratar.

Tendo consciência das limitações associadas aos autoenxertos, têm vindo a ser desenvolvidos diversos materiais de substituição óssea. Estes novos biomateriais pretendem, em última análise, mimetizar e otimizar a fisiologia óssea procurando, desta forma, atingir a excelência biológica.

A matriz mineral do tecido ósseo tem sido mimetizada através da manipulação de fosfatos de cálcio, entre os quais se destaca a hidroxiapatite, utilizando várias estratégias que incluem a fabricação de materiais nanoestruturados. A este propósito parece-nos pertinente lembrar que a matriz óssea é um biomaterial nanoestruturado, possuindo uma fase orgânica e uma fase mineral com dimensões nanométricas e que grande parte dos processos biológicos ocorrem a uma escala nano. Assim, os cerâmicos de fosfato de cálcio nanocristalinos parecem constituir, no presente, materiais bastante promissores nos processos de osteointegração.

As características de superfície de um biomaterial parecem ter uma importância crucial na evolução da resposta osteoblástica. Com efeito irão determinar o tipo de moléculas proteicas (natureza, quantidade e conformação) que serão adsorvidas à sua superfície. Este “filme” proteico irá mediar a interação entre o material implantado e as células. De facto, são muitas vezes estas proteínas que irão modular a resposta inicial dos tecidos ao biomaterial em questão.

Está hoje em expansão o fabrico de uma nova geração de biomateriais com uma nanotopografia estrategicamente pensada e desenhada, de forma a estimular e modular a resposta celular e molecular no sentido pretendido. Muitos destes biomateriais *high-tech* pretendem activar processos celulares de osteoindução apenas

com base nas propriedades físico-químicas da sua superfície, sem necessidade de recurso a técnicas de imobilização de moléculas bioactivas.

O trabalho experimental apresentado neste estudo propõe-se avaliar *in vivo*, no coelho, o processo de osteointegração e o potencial de regeneração óssea de uma hidroxiapatite sintética nanocristalina.

Este trabalho foi concebido com o objectivo de analisar o comportamento biológico desta hidroxiapatite sintética (utilizando um modelo de cicatrização óssea retardada com defeitos ósseos cranianos com reduzida contenção física) tendo como referência um defeito ósseo preenchido com osso autógeno (controlo positivo) e um defeito ósseo sem preenchimento (controlo negativo). Em paralelo foi ainda avaliada uma hidroxiapatite natural de origem bovina (Bio-Oss® Spongiosa), por ser um material de ampla utilização na clínica de Medicina Dentária.

O presente trabalho experimental foi desenvolvido com base uma amostra de 20 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*, n=20), da estirpe “*New Zealand White*”, machos, adultos, com um peso de 3,4+/- 0,5Kg. Estes coelhos foram divididos em duas séries de 10 coelhos, correspondentes aos dois períodos de tempo de experiência, isto é, duas e quatro semanas.

Foi executado o denominado modelo de cicatrização óssea retardada, durante o qual se evita que a regeneração espontânea ocorra durante períodos experimentais de média duração. Procedeu-se à criação de dois defeitos circulares transcorticais bilaterais, com 8mm de diâmetro, um em cada osso parietal.

A avaliação dos processos de cicatrização óssea assentou essencialmente em estudos de índole histológica, realizados em microscopia de luz.

Os materiais utilizados, todos sob a forma de grânulos/partículas, mostraram uma adequada biocompatibilidade, traduzida pela ausência de reacções inflamatórias ou outras reacções adversas, bem como quaisquer alterações anátomo-patológicas nos tecidos envolventes e órgãos alvo.

Os defeitos sem preenchimento (controlo negativo) evidenciaram uma diminuta formação óssea tanto às duas como às quatro semanas. Em termos globais verificou-se uma evolução no sentido de uma cicatrização e não de uma verdadeira regeneração óssea. A maioria dos defeitos apresentou-se constituída por uma fina ponte fibrótica originando o colapso dos tecidos moles.

Nos defeitos preenchidos com autoenxerto verificou-se, como era expectável, uma intensa neoformação óssea e um nítido e rápido processo de incorporação dos fragmentos de osso autógeno. Os defeitos foram sendo progressivamente ocupados por uma notável quantidade de trabéculas ósseas constituídas por numerosas áreas de novo osso revestindo, integrando e ligando os fragmentos de autoenxerto entre si e às paredes do defeito. A actividade osteoclástica, traduzida por inúmeras linhas de reversão, foi bastante intensa levando à reabsorção das áreas de tecido imaturo e de fragmentos de autoenxerto, em paralelo com a formação de tecido lamelar.

Os defeitos preenchidos com o xenoenxerto de origem bovina mostraram uma aposição óssea crescente à superfície das partículas e, simultaneamente, nos espaços interparticulares, bem como o aparecimento de trabéculas constituídas por tecido imaturo e lamelar, ligando as partículas entre si e às paredes do defeito. Foi também visível a existência de numerosos processos de reabsorção osteoclástica. Pode afirmar-se, pois, que este material de enxerto demonstrou, neste estudo, uma boa capacidade osteocondutora. A composição química de uma matriz bastante próxima da fase mineral do tecido ósseo deverá, sem dúvida, favorecer e estimular os processos de formação e posterior remodelação de tecido ósseo.

Nos defeitos ósseos preenchidos com hidroxiapatite sintética salienta-se a presença de partículas, com forma e dimensões muito heterogéneas. A par de partículas de grande tamanho, muitas delas com “*sharp edged*” observou-se, também, a existência de imensas partículas de pequenas dimensões.

Todas as partículas apresentaram, logo aos quinze dias, uma nítida aposição de tecido ósseo imaturo. Aos trinta dias encontraram-se, já, muitas partículas perfeitamente osteointegradas e trabéculas ósseas bastante organizadas, maioritariamente constituídas por tecido lamelar. Contribuindo para esta intensa actividade osteogénica poderá estar a presença de uma activa interface entre as partículas de hidroxiapatite em estudo e o tecido ósseo sobre elas formado. Esta fina camada parece estabelecer uma íntima relação com o novo tecido ósseo, podendo estar na base da sua formação.

Em paralelo registou-se uma acentuada actividade de remodelação óssea.

De facto, a observação das lâminas histológicas mostrou a presença, na superfície das partículas de HA, de concavidades em tudo semelhantes a lacunas de Howship e de células multinucleadas com uma morfologia típica de osteoclastos.

Sem excluir a existência de uma degradação físico-química, parece-nos ser possível afirmar que esta população celular (linha osteoclástica) foi responsável, em

grande parte, pelos processos de degradação e desagregação observados nesta hidroxiapatite.

Por outro lado, as concavidades escavadas pelos osteoclastos parecem constituir locais estratégicos e privilegiados para a formação de matriz osteóide e sua posterior mineralização. O microambiente assim gerado será muito propício ao aparecimento de um fenótipo osteoblástico, contribuindo para a formação e maturação de áreas de tecido ósseo.

O material utilizado neste grupo experimental reúne um conjunto de variáveis que isoladamente têm reconhecida actividade osteopromotora. A sinergia resultante da combinação das partículas de hidroxiapatite (com uma composição química adequada), dos seus nanocristais e de uma interface favorável, poderá potenciar a adesão, proliferação e diferenciação tanto das células da linha osteoblástica como da linha osteoclástica.

A arquitectura optimizada e “*biologically inspired*” desta hidroxiapatite, poderá estar na base do sucesso dos processos de regeneração óssea observados com este biomaterial.

Pretende-se com este estudo, dar continuidade ao trabalho desenvolvido pelo grupo em que estamos integrados, contribuindo com mais alguns dados em relação ao comportamento biológico de materiais sintéticos, nanocristalinos, à base de fosfato de cálcio.

Perspectivas Futuras

Uma dissertação de mestrado apresenta características próprias. No entanto, como qualquer outro trabalho de índole científica será sempre algo limitado e finito, pretendendo responder a algumas questões específicas.

Tendo por base os resultados apresentados, é incontornável a necessidade de uma análise histomorfométrica no sentido de confirmar e complementar os resultados histológicos obtidos em microscopia de luz. Por razões que nos ultrapassaram, e que nos fizeram desviar do trajecto inicial programado, não nos foi possível efectuar os estudos morfométricos. Assim, temos já programado o início dos trabalhos

conducentes a uma validação quantitativa dos resultados apresentados nesta dissertação.

De forma a tirar conclusões mais precisas parece-nos imprescindível uniformizar o tamanho dos grânulos da hidroxiapatite sintética em estudo, de forma a obter uma ou mais granulometrias. Deste modo, seria possível avaliar o efeito do tamanho das partículas nos processos de osteocondução.

Também a obtenção de partículas com uma porosidade interna, interconectada, seria uma característica merecedora de atenção e investimento.

Finalmente, e considerando os dados existentes na literatura e já mencionados nesta dissertação, a possibilidade de inclusão de outros elementos químicos nesta hidroxiapatite poderia constituir uma mais valia para a optimização da sua performance biológica.

O conjunto dos estudos realizados bem como os resultados alcançados abriram-nos novas perspectivas para o desenvolvimento de outros trabalhos de investigação clínica e experimental.

7 -SUMMARY

Dentistry has been an area in continuous evolution, always aiming at the achievement of the aesthetic and functional expectations of a more and more demanding society. As to, the stimulation of bone regeneration in places where it had been lost or reabsorbed has been required for innumerable times. The needed bone volume can be attained by the use of biomaterials that allow the formation of quality bone tissue.

Autografts remain the ideal bone grafting material because of their characteristics and capabilities. However, the harvest of this ideal bone graft material demands an additional surgery most of the times associated to morbidity. Moreover, the amount of collected bone is frequently insufficient to fill all the volume of the bone defect to be treated.

Several materials for bone replacement have been developed to overtake the limitations associated to autografts. Eventually, these new biomaterials essay for bone physiology mimesis, optimization and consequently biological excellence.

Recently, calcium phosphates, such as hydroxyapatite, have been manipulated to simulate the bone tissue mineral matrix by means of the production of nanostructured materials. To speak to the purpose, it would be interesting to remind that bone matrix is a nanostructured biomaterial constituted by an organic phase and a mineral phase of nanometric dimensions. Furthermore, the great majority of the biological processes in the bone matrix occur in scale. On that account, the calcium phosphate porcelain nanocrystals appear to be, at the present moment, promising materials on the on the osteointegration processes.

The surface characteristics of any biomaterial seem to be extremely important on the evolution of the osteoblasts response to it. As a matter of fact, the surface of a biomaterial will determine the essence of the proteinous molecules (nature, quantity and shape) to be adsorbed. This proteinic “film” will lie between the implanted material and the cells and many times regulate the initial response of the tissues.

Nowadays, a new generation of biomaterials with a taken thought and well-designed nanotopography is coming into existence in order to stimulate and to modulate the molecular and cellular reaction to a desired outcome. Many of these *high-tech* materials intend simply at the activation of the cellular processes of osteoinduction, based on their surface chemical and physical properties, not needing techniques for the immobilization of bioactive molecules.

The experimental work presented in this study puts forward to consideration the *in vivo* evaluation of the process of osteointegration and the potential of bone regeneration of a nanocrystal synthetic hydroxyapatite, in the rabbit.

The purpose of this study was to analyze the biological performance of a synthetic hydroxyapatite, by means of using a delayed bone cicatrization model with cranial defects of low physical retainment and referring to a bone defect filled up with autogenous bone graft (positive control) and to a non-filled bone defect (negative control). At the same time, a natural hydroxyapatite of bovine origin bovina (Bio-Oss® Spongiosa) was evaluated side-by-side to the synthetic hdroxyapatite for its extensive use in Dentistry

This work comprised of a 20 male adult rabbit sample (*Oryctolagus cuniculus*, n=20), from the “*New Zealand White*” lineage weighting 3,4+/- 0,5Kg. The rabbits were then divided into 2 series of 10 animals each, matching to the 2 stages of the experience (2 and 4 weeks).

We performed the delayed bone cicatrization model, preventing spontaneous regeneration for the time of experience. 2 transcortical bilateral circular 8mm diameter defects were created on each parietal bone.

The evaluation of the bone cicatrization process was based on studies of histological nature, carried out in light microscopy.

The granular/particulate materials used presented adequate biological compatibility, showing no inflammatory or other adverse reactions, as well as no pathological changes on the surrounding tissues and target-sites.

The unfilled defects (negative control) exhibited very little bone formation over each evaluation period (2 and 4 weeks). We verified that these defects trended to heal by cicatrization instead of bone regeneration. Actually, most of them presented a tapered fibrotic bridge, which caused soft tissue to collapse.

On the autograft filled defects, as expected, intense new bone formation with a fast process of inclusion of the bone graft particles was verified. Defects were progressively occupied by a great extent of bone trabeculae constituted by numerous areas of new bone coating, integrating and binding the fragments of autograft. The osteoclastic activity, noticed for innumerable lines of reversion, was intense enough to lead to the resorption of areas of immature tissue and fragments of autograft, parallel to the formation of lamellar tissue.

The defects filled with bovine xenograft showed bone apposition increasing from the surface of particles and, simultaneously, in the space between each particle. Besides, trabeculae constituted by immature and lamellar tissue were visible, binding particles together and to the walls of the defect. Numerous processes of osteoclastic resorption were also visible. For that reason, this bone substitution material, as demonstrated in this study, can be said to have a good osteoconductive capability. The chemical composition of a matrix almost identical to the mineral phase of the bone tissue is responsible for the stimulation of the processes of formation and bone tissue remodeling.

On bone defects filled with synthetic hydroxyapatite, particles of different sizes and shapes are noticeable. Side by side with sharp edged large particles, many small particles were also observed. Every particle presented, for the first 15-day period, clear apposition of immature bone tissue. By the time of the next period (30 days), many particles were integrated and bone trabeculae, made up from lamellar tissue, showed already some kind of organization. This intense osteogenic activity might have been enhanced by the presence of an active interface between the particles of hydroxyapatite and the bone tissue formed over them. This lining layer appears to establish a close relation with the new bone and could be the origin of its formation. At the same time, intense bone remodeling activity was registered.

As a matter of fact, histological slides observation revealed the presence of concavities on the HA surface, similar to those of the Howship lacunae, and multinuclei cells, with the typical osteoclast morphology.

Regardless the possibility of a chemical and physical degradation, it seems possible that this cellular population (osteoclast lineage) is responsible for the degradation and disaggregation processes observed for the hydroxyapatite.

On the other hand, osteoclast-digged concavities seem to be privileged sites for osteoid matrix formation and subsequent mineralization. The ambience present at these sites is favorable to the appearance of an osteoblast phenotype, which will contribute for the formation and maturation of bone tissue areas.

The material used in this experimental group gathers a collection of elements that have, isolated, well-known osteopromoting activity. The synergic combination of the nanocrystals of hydroxyapatite and a favorable interface might enhance the adhesion, proliferation and differentiation of both osteoblasts and osteoclasts.

The “biologically inspired” and optimized architecture of this hydroxyapatite might be the basis for success for the bone regeneration processes observed for this biomaterial.

This study intends to continue the work already developed by the investigation group in which we have been integrated, by contributing with some additional data on the biological performance of calcium phosphate based nanocrystal synthetic materials.

Future perspectives

Even though a master degree essay presents some specific characteristics and aims at the fulfilment of some questions, it will always remain, as any other scientific paper, finite and somehow limited.

On the subject of the presented results, one must agree on the evitable need to perform a histomorphometrical analysis of the samples, to confirm and complete the histological results attained on the optical microscope. Several unexplained reasons made us unable to get with the established programme. Therefore, the beginning of another scientific work to quantitatively validate the results presented on this study has already been scheduled.

In order to withdraw more precise conclusions it is indispensable to make even the size of the particles in the synthetic hydroxyapatite granulate, to attain one or more collections of particles, which would allow the evaluation the influence of the particle size on the osteoconduction processes.

Moreover, the attainment of inner porosity particles, connected in between, would be an interesting characteristic to invest and spare attention on.

Finally, taking into account data in the literature referred to in this essay, the possibility of inclusion of other chemical elements in this hydroxyapatite could be of most value for the optimization of its biological performance.

The collection of performed studies, as well as the attained results changed our frame of mind to the development of other clinical and experimental investigation papers.

Capítulo III

III – BIBLIOGRAFIA

bibliografia

1. Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84-A(3):454-64.
2. De Long WG, Jr., Einhorn TA, Koval K, McKee M, Smith W, Sanders R, et al. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *J Bone Joint Surg Am* 2007;89(3):649-58.
3. Hallman M, Thor A. Bone substitutes and growth factors as an alternative/complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry. *Periodontol* 2000 2008;47:172-92.
4. LeGeros RZ. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem Rev* 2008;108(11):4742-53.
5. Barrère F, Mahmood, T.A., de Groot, K., van Blitterswijk, C.A. Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions *Materials Science and Engineering* 2008;R59:38-71.
6. Matos SMA. Sistemas de Libertação de Moléculas Bioativas na Regeneração Óssea - Estudo Experimental. Tese de Mestrado. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. 1999.
7. Schilling AF, Filke, S., Brink, S. Osteoclasts and Biomaterials. *European Journal of Trauma* 2006;2:107-13.
8. Minkin C, Marinho VC. Role of the osteoclast at the bone-implant interface. *Adv Dent Res* 1999;13:49-56.
9. Schilling AF, Filke, S., Brink, S., Korbmacher, H., Amling, M., Rueger, J.M. Osteoclasts and Biomaterials. *European Journal of Trauma* 2006;32:107-13.
10. Sato M, Webster TJ. Nanobiotechnology: implications for the future of nanotechnology in orthopedic applications. *Expert Rev Med Devices* 2004;1(1):105-14.
11. Hing KA. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 2004;362(1825):2821-50.
12. Kokubo T, Kim HM, Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials* 2003;24(13):2161-75.
13. Bostrom MPG, Boskey, A., Kaufman, J.K., Einhorn, T.A. Form and Function of Bone. *Orthopaedic Basic Science*. 2nd ed. Buckwalter, J.A., Einhorn, T.A., Simon, S.R. 2004;2:320-69.
14. Heling I, Heindel R, Merin B. Calcium-fluorapatite. A new material for bone implants. *J Oral Implantol* 1981;9(4):548-55.
15. Patel N, Best SM, Bonfield W, Gibson IR, Hing KA, Damien E, et al. A comparative study on the in vivo behavior of hydroxyapatite and silicon substituted hydroxyapatite granules. *J Mater Sci Mater Med* 2002;13(12):1199-206.
16. Gao T, Aro HT, Ylanen H, Vuorio E. Silica-based bioactive glasses modulate expression of bone morphogenetic protein-2 mRNA in Saos-2 osteoblasts in vitro. *Biomaterials* 2001;22(12):1475-83.
17. Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution. *J Biomed Mater Res* 2001;55(2):151-7.
18. Reffitt DM, Ogston N, Jugdaohsingh R, Cheung HF, Evans BA, Thompson RP, et al. Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone* 2003;32(2):127-35.

19. Hing KA, Revell PA, Smith N, Buckland T. Effect of silicon level on rate, quality and progression of bone healing within silicate-substituted porous hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials* 2006;27(29):5014-26.
20. Pietak AM, Reid JW, Stott MJ, Sayer M. Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials* 2007;28(28):4023-32.
21. Botelho CM, Brooks RA, Best SM, Lopes MA, Santos JD, Rushton N, et al. Human osteoblast response to silicon-substituted hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res A* 2006;79(3):723-30.
22. Botelho CM, Brooks RA, Spence G, McFarlane I, Lopes MA, Best SM, et al. Differentiation of mononuclear precursors into osteoclasts on the surface of Si-substituted hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res A* 2006;78(4):709-20.
23. Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med Eng Phys* 1998;20(2):92-102.
24. Seeman E. Structural basis of growth-related gain and age-related loss of bone strength. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47 Suppl 4:iv2-8.
25. Barrere F, van der Valk CM, Dalmeijer RA, van Blitterswijk CA, de Groot K, Layrolle P. In vitro and in vivo degradation of biomimetic octacalcium phosphate and carbonate apatite coatings on titanium implants. *J Biomed Mater Res A* 2003;64(2):378-87.
26. Radin SR, Ducheyne P. The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vitro behavior. II. Precipitation. *J Biomed Mater Res* 1993;27(1):35-45.
27. Dhert WJ, Klein CP, Jansen JA, van der Velde EA, Vriesde RC, Rozing PM, et al. A histological and histomorphometrical investigation of fluorapatite, magnesiumwhitlockite, and hydroxylapatite plasma-sprayed coatings in goats. *J Biomed Mater Res* 1993;27(1):127-38.
28. Okazaki M, Takahashi J, Kimura H, Aoba T. Crystallinity, solubility, and dissolution rate behavior of fluoridated CO₃ apatites. *J Biomed Mater Res* 1982;16(6):851-60.
29. Lee MH, Brass DA, Morris R, Composto RJ, Ducheyne P. The effect of non-specific interactions on cellular adhesion using model surfaces. *Biomaterials* 2005;26(14):1721-30.
30. Doi Y, Iwanaga H, Shibutani T, Moriwaki Y, Iwayama Y. Osteoclastic responses to various calcium phosphates in cell cultures. *J Biomed Mater Res* 1999;47(3):424-33.
31. Christoffersen J, Christoffersen MR, Kolthoff N, Barenholdt O. Effects of strontium ions on growth and dissolution of hydroxyapatite and on bone mineral detection. *Bone* 1997;20(1):47-54.
32. Katchburian E, Arana, V. Conceitos de Biomineralização. . In: Katchburian E, Arana V, editors. *Histologia e Embriologia Oral, Texto-Atlas-Correlações Clínicas*. Segunda edição ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan SA. 2004:22-35.
33. Geesink RG, de Groot K, Klein CP. Chemical implant fixation using hydroxyl-apatite coatings. The development of a human total hip prosthesis for chemical fixation to bone using hydroxyl-apatite coatings on titanium substrates. *Clin Orthop Relat Res* 1987(225):147-70.
34. Rahbek O. Calcium phosphate coatings for for implant fixation. in: J.A. Epinette, M.T. Manley (Eds.), *Fifteen Years of Clinical Experience with Hydroxyapatite Coatings in Joint Arthroplasty*, Springer, Paris. 2004:35-51.
35. Underwood PA, Steele JG, Dalton BA. Effects of polystyrene surface chemistry on the biological activity of solid phase fibronectin and vitronectin, analysed with monoclonal antibodies. *J Cell Sci* 1993;104 (Pt 3):793-803.
36. Kilpadi KL, Chang PL, Bellis SL. Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel. *J Biomed Mater Res* 2001;57(2):258-67.

37. Okamoto K, Matsuura T, Hosokawa R, Akagawa Y. RGD peptides regulate the specific adhesion scheme of osteoblasts to hydroxyapatite but not to titanium. *J Dent Res* 1998;77(3):481-7.
38. Di Silvio L, Dalby MJ, Bonfield W. Osteoblast behaviour on HA/PE composite surfaces with different HA volumes. *Biomaterials* 2002;23(1):101-7.
39. Dalby MJ, Di Silvio L, Harper EJ, Bonfield W. Increasing hydroxyapatite incorporation into poly(methylmethacrylate) cement increases osteoblast adhesion and response. *Biomaterials* 2002;23(2):569-76.
40. Habibovic P, Yuan H, van den Doel M, Sees TM, van Blitterswijk CA, de Groot K. Relevance of osteoinductive biomaterials in critical-sized orthotopic defect. *J Orthop Res* 2006;24(5):867-76.
41. Gosain AK, Song L, Riordan P, Amarante MT, Nagy PG, Wilson CR, et al. A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part I. *Plast Reconstr Surg* 2002;109(2):619-30.
42. Yuan H, Van Den Doel M, Li S, Van Blitterswijk CA, De Groot K, De Bruijn JD. A comparison of the osteoinductive potential of two calcium phosphate ceramics implanted intramuscularly in goats. *J Mater Sci Mater Med* 2002;13(12):1271-5.
43. Yuan H, Li Y, de Bruijn JD, de Groot K, Zhang X. Tissue responses of calcium phosphate cement: a study in dogs. *Biomaterials* 2000;21(12):1283-90.
44. Habibovic P, van der Valk CM, van Blitterswijk CA, De Groot K, Meijer G. Influence of octacalcium phosphate coating on osteoinductive properties of biomaterials. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15(4):373-80.
45. Wenisch S, Stahl JP, Horas U, Heiss C, Kilian O, Trinkaus K, et al. In vivo mechanisms of hydroxyapatite ceramic degradation by osteoclasts: fine structural microscopy. *J Biomed Mater Res A* 2003;67(3):713-8.
46. Sun JS, Lin FH, Hung TY, Tsuang YH, Chang WH, Liu HC. The influence of hydroxyapatite particles on osteoclast cell activities. *J Biomed Mater Res* 1999;45(4):311-21.
47. Detsch R, Mayr, H., Ziegler, G. Formation of osteoclast-like cells on HA and TCP ceramics. *Acta Biomaterialia* 2006:139-48.
48. LeGeros RZ, Tung MS. Chemical stability of carbonate- and fluoride-containing apatites. *Caries Res* 1983;17(5):419-29.
49. LeGeros RZ. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. *Clin Mater* 1993;14(1):65-88.
50. Koerten HK, van der Meulen J. Degradation of calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mater Res* 1999;44(1):78-86.
51. Monchau F, Lefevre A, Descamps M, Belquin-myrdycz A, Laffargue P, Hildebrand HF. In vitro studies of human and rat osteoclast activity on hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate, calcium carbonate. *Biomol Eng* 2002;19(2-6):143-52.
52. Koch KB, W. Superhydrophobic and superhydrophilic plant surfaces: an inspiration for biomimetic materials. *Phil. Trans. R. Soc. A* 2009;367:1487-509.
53. Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* 1996;17(2):137-46.
54. Kieswetter K, Schwartz Z, Dean DD, Boyan BD. The role of implant surface characteristics in the healing of bone. *Crit Rev Oral Biol Med* 1996;7(4):329-45.
55. Mendonca G, Mendonca DB, Aragao FJ, Cooper LF. Advancing dental implant surface technology--from micron- to nanotopography. *Biomaterials* 2008;29(28):3822-35.
56. Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res* 2004;83(7):529-33.

57. Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A* 2005;74(1):49-58.
58. Arima Y, Iwata H. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials* 2007;28(20):3074-82.
59. Rodrigues SN, Goncalves IC, Martins MC, Barbosa MA, Ratner BD. Fibrinogen adsorption, platelet adhesion and activation on mixed hydroxyl-/methyl-terminated self-assembled monolayers. *Biomaterials* 2006;27(31):5357-67.
60. Altankov G, Groth, T. Reorganizations of substratum-bound fibronectin on hydrophilic and hydrophobic materials is related to biocompatibility. *J Mater Sci Mater Med* 1994;5:732-7.
61. Carlsson LV, Alkerktsson T, Berman C. Bone response to plasma-cleaned titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1989;4(3):199-204.
62. Wennerberg A, Bolind P, Albrektsson T. Glow-discharge pretreated implants combined with temporary bone tissue ischemia. *Swed Dent J* 1991;15(2):95-101.
63. Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *J Biomed Mater Res* 2000;51(3):475-83.
64. Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Enhanced osteoclast-like cell functions on nanophase ceramics. *Biomaterials* 2001;22(11):1327-33.
65. Klabunde KJS, J.; Koper, O.; et al. Nanocrystals as stoichiometric reagents with unique surface chemistry. *J. Phys. Chem.* 1996;100:121-41.
66. Webster TJ, Siegel RW, Bizios R. Osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Biomaterials* 1999;20(13):1221-7.
67. Thomas CH, McFarland CD, Jenkins ML, Rezanian A, Steele JG, Healy KE. The role of vitronectin in the attachment and spatial distribution of bone-derived cells on materials with patterned surface chemistry. *J Biomed Mater Res* 1997;37(1):81-93.
68. Webster TJ, Ejiogor JU. Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo. *Biomaterials* 2004;25(19):4731-9.
69. Kay S, Thapa A, Haberstroh KM, Webster TJ. Nanostructured polymer/nanophase ceramic composites enhance osteoblast and chondrocyte adhesion. *Tissue Eng* 2002;8(5):753-61.
70. Schweikl H, Muller R, Englert C, Hiller KA, Kujat R, Nerlich M, et al. Proliferation of osteoblasts and fibroblasts on model surfaces of varying roughness and surface chemistry. *J Mater Sci Mater Med* 2007;18(10):1895-905.
71. Shelton RM, Rasmussen AC, Davies JE. Protein adsorption at the interface between charged polymer substrata and migrating osteoblasts. *Biomaterials* 1988;9(1):24-9.
72. Healy KE, Thomas CH, Rezanian A, Kim JE, McKeown PJ, Lom B, et al. Kinetics of bone cell organization and mineralization on materials with patterned surface chemistry. *Biomaterials* 1996;17(2):195-208.
73. dos Santos EA, Farina M, Soares GA, Anselme K. Surface energy of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate ceramics driving serum protein adsorption and osteoblast adhesion. *J Mater Sci Mater Med* 2008;19(6):2307-16.
74. Jager M, Zilkens C, Zanger K, Krauspe R. Significance of nano- and microtopography for cell-surface interactions in orthopaedic implants. *J Biomed Biotechnol* 2007;2007(8):69036.
75. Ishaug-Riley SL, Okun LE, Prado G, Applegate MA, Ratcliffe A. Human articular chondrocyte adhesion and proliferation on synthetic biodegradable polymer films. *Biomaterials* 1999;20(23-24):2245-56.

76. Lee SJ, Khang G, Lee YM, Lee HB. Interaction of human chondrocytes and NIH/3T3 fibroblasts on chloric acid-treated biodegradable polymer surfaces. *J Biomater Sci Polym Ed* 2002;13(2):197-212.
77. Papadaki M, Mahmood T, Gupta P, Claase MB, Grijpma DW, Riesle J, et al. The different behaviors of skeletal muscle cells and chondrocytes on PEGT/PBT block copolymers are related to the surface properties of the substrate. *J Biomed Mater Res* 2001;54(1):47-58.
78. Boyan BD, Schwartz Z, Hambleton JC. Response of bone and cartilage cells to biomaterials in vivo and in vitro. *J Oral Implantol* 1993;19(2):116-22; discussion 36-7.
79. Hambleton J, Schwartz Z, Khare A, Windeler SW, Luna M, Brooks BP, et al. Culture surfaces coated with various implant materials affect chondrocyte growth and metabolism. *J Orthop Res* 1994;12(4):542-52.
80. Siebers MC, ter Brugge PJ, Walboomers XF, Jansen JA. Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review. *Biomaterials* 2005;26(2):137-46.
81. Wu C, Fields AJ, Kapteijn BA, McDonald JA. The role of alpha 4 beta 1 integrin in cell motility and fibronectin matrix assembly. *J Cell Sci* 1995;108 (Pt 2):821-9.
82. Pearson BS, Klebe RJ, Boyan BD, Moskowicz D. Comments on the clinical application of fibronectin in dentistry. *J Dent Res* 1988;67(2):515-7.
83. Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Dufresne E, Judas D, Iost A, et al. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. *J Biomed Mater Res* 2000;49(2):155-66.
84. Balasundaram G, Sato M, Webster TJ. Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD. *Biomaterials* 2006;27(14):2798-805.
85. Gronthos S, Stewart K, Graves SE, Hay S, Simmons PJ. Integrin expression and function on human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 1997;12(8):1189-97.
86. Bhatnagar RS, Qian JJ, Gough CA. The role in cell binding of a beta-bend within the triple helical region in collagen alpha 1 (I) chain: structural and biological evidence for conformational tautomerism on fiber surface. *J Biomol Struct Dyn* 1997;14(5):547-60.
87. Sinha RK, Tuan RS. Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopedic implant materials. *Bone* 1996;18(5):451-7.
88. Ellingsen JE. A study on the mechanism of protein adsorption to TiO₂. *Biomaterials* 1991;12(6):593-6.
89. Matsuura T, Hosokawa R, Okamoto K, Kimoto T, Akagawa Y. Diverse mechanisms of osteoblast spreading on hydroxyapatite and titanium. *Biomaterials* 2000;21(11):1121-7.
90. Yim EK, Leong KW. Significance of synthetic nanostructures in dictating cellular response. *Nanomedicine* 2005;1(1):10-21.
91. Webster TJ, Schadler LS, Siegel RW, Bizios R. Mechanisms of enhanced osteoblast adhesion on nanophase alumina involve vitronectin. *Tissue Eng* 2001;7(3):291-301.
92. McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell* 2004;6(4):483-95.
93. Dalby MJ, McCloy D, Robertson M, Agheli H, Sutherland D, Affrossman S, et al. Osteoprogenitor response to semi-ordered and random nanotopographies. *Biomaterials* 2006;27(15):2980-7.
94. Le Guehennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater* 2007;23(7):844-54.

95. Groessner-Schreiber B, Tuan RS. Enhanced extracellular matrix production and mineralization by osteoblasts cultured on titanium surfaces in vitro. *J Cell Sci* 1992;101 (Pt 1):209-17.
96. Dalby MJ, McCloy D, Robertson M, Wilkinson CD, Oreffo RO. Osteoprogenitor response to defined topographies with nanoscale depths. *Biomaterials* 2006;27(8):1306-15.
97. Chesmel KD, Clark CC, Brighton CT, Black J. Cellular responses to chemical and morphologic aspects of biomaterial surfaces. II. The biosynthetic and migratory response of bone cell populations. *J Biomed Mater Res* 1995;29(9):1101-10.
98. Davies JE, Lowenberg B, Shiga A. The bone-titanium interface in vitro. *J Biomed Mater Res* 1990;24(10):1289-306.
99. Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J, Jr., et al. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res* 1995;29(3):389-401.
100. Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19(5):444-51.
101. Isa ZM, Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Stanford CM. Effects of fluoride-modified titanium surfaces on osteoblast proliferation and gene expression. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006;21(2):203-11.
102. Meirelles L, Arvidsson A, Albrektsson T, Wennerberg A. Increased bone formation to unstable nano rough titanium implants. *Clin Oral Implants Res* 2007;18(3):326-32.
103. McManus AJ, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Evaluation of cytocompatibility and bending modulus of nanoceramic/polymer composites. *J Biomed Mater Res A* 2005;72(1):98-106.
104. Price RL, Gutwein LG, Kaledin L, Tepper F, Webster TJ. Osteoblast function on nanophase alumina materials: Influence of chemistry, phase, and topography. *J Biomed Mater Res A* 2003;67(4):1284-93.
105. Price RL, Ellison K, Haberstroh KM, Webster TJ. Nanometer surface roughness increases select osteoblast adhesion on carbon nanofiber compacts. *J Biomed Mater Res A* 2004;70(1):129-38.
106. Kaiser JP, Bruinink A. Investigating cell-material interactions by monitoring and analysing cell migration. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15(4):429-35.
107. Navarro M, Ginebra MP, Planell JA, Zeppetelli S, Ambrosio L. Development and cell response of a new biodegradable composite scaffold for guided bone regeneration. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15(4):419-22.
108. Ripamonti U, Van den Heever B, Van Wyk J. Expression of the osteogenic phenotype in porous hydroxyapatite implanted extraskeletally in baboons. *Matrix* 1993;13(6):491-502.
109. Magan A, Ripamonti U. Geometry of porous hydroxyapatite implants influences osteogenesis in baboons (*Papio ursinus*). *J Craniofac Surg* 1996;7(1):71-8.
110. Kuboki Y, Takita H, Kobayashi D, Tsuruga E, Inoue M, Murata M, et al. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. *J Biomed Mater Res* 1998;39(2):190-9.
111. Anselme K, Noel B, Hardouin P. Human osteoblast adhesion on titanium alloy, stainless steel, glass and plastic substrates with same surface topography. *J Mater Sci Mater Med* 1999;10(12):815-9.
112. Vaananen HK, Laitala-Leinonen T. Osteoclast lineage and function. *Arch Biochem Biophys* 2008;473(2):132-8.

113. Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis* 2002;8(3):147-59.
114. Roberts WE, Epker, B.N., Burr, D.B., Harstfield, J.K., Roberts, J.A. Remodeling of Mineralized Tissues, Part II: Control and Pathophysiology. *Seminars in Orthodontics* 2006;12(4):238-53.
115. Kierszenbaum AL. *Histologia e Biologia Celular - Uma Introdução à Patologia*. 2ª ed. Elsevier Editora Lda 2008:143.
116. Ross FP, Teitelbaum SL. alphavbeta3 and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology. *Immunol Rev* 2005;208:88-105.
117. Fisher JE, Caulfield MP, Sato M, Quartuccio HA, Gould RJ, Garsky VM, et al. Inhibition of osteoclastic bone resorption in vivo by echistatin, an "arginyl-glycyl-aspartyl" (RGD)-containing protein. *Endocrinology* 1993;132(3):1411-3.
118. Rodan SB, Rodan GA. Integrin function in osteoclasts. *J Endocrinol* 1997;154 Suppl:S47-56.
119. Sago K, Teitelbaum SL, Venstrom K, Reichardt LF, Ross FP. The integrin alphavbeta5 is expressed on avian osteoclast precursors and regulated by retinoic acid. *J Bone Miner Res* 1999;14(1):32-8.
120. Vaananen HK, Horton M. The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. *J Cell Sci* 1995;108 (Pt 8):2729-32.
121. Vaananen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 2000;113 (Pt 3):377-81.
122. Luxenburg C, Addadi L, Geiger B. The molecular dynamics of osteoclast adhesions. *Eur J Cell Biol* 2006;85(3-4):203-11.
123. Luxenburg C, Geblinger D, Klein E, Anderson K, Hanein D, Geiger B, et al. The architecture of the adhesive apparatus of cultured osteoclasts: from podosome formation to sealing zone assembly. *PLoS ONE* 2007;2(1):e179.
124. Chabadel A, Banon-Rodriguez I, Cluet D, Rudkin BB, Wehrle-Haller B, Genot E, et al. CD44 and beta3 integrin organize two functionally distinct actin-based domains in osteoclasts. *Mol Biol Cell* 2007;18(12):4899-910.
125. Salo J, Metsikko K, Palokangas H, Lehenkari P, Vaananen HK. Bone-resorbing osteoclasts reveal a dynamic division of basal plasma membrane into two different domains. *J Cell Sci* 1996;109 (Pt 2):301-7.
126. Zhao H, Vaananen HK. Pharmacological sequestration of intracellular cholesterol in late endosomes disrupts ruffled border formation in osteoclasts. *J Bone Miner Res* 2006;21(3):456-65.
127. Schlesinger PH, Blair HC, Teitelbaum SL, Edwards JC. Characterization of the osteoclast ruffled border chloride channel and its role in bone resorption. *J Biol Chem* 1997;272(30):18636-43.
128. Vaananen HK, Karhukorpi EK, Sundquist K, Wallmark B, Roininen I, Hentunen T, et al. Evidence for the presence of a proton pump of the vacuolar H(+)-ATPase type in the ruffled borders of osteoclasts. *J Cell Biol* 1990;111(3):1305-11.
129. Kornak U, Kasper D, Bosl MR, Kaiser E, Schweizer M, Schulz A, et al. Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* 2001;104(2):205-15.
130. Ravesloot JH, Eisen T, Baron R, Boron WF. Role of Na-H exchangers and vacuolar H+ pumps in intracellular pH regulation in neonatal rat osteoclasts. *J Gen Physiol* 1995;105(2):177-208.
131. Yoshida N, Sato T, Kobayashi K, Okada Y. High extracellular Ca²⁺ and Ca²⁺-sensing receptor agonists activate nonselective cation conductance in freshly isolated rat osteoclasts. *Bone* 1998;22(5):495-501.

132. Debari K, Sasaki T, Udagawa N, Rifkin BR. An ultrastructural evaluation of the effects of cysteine-proteinase inhibitors on osteoclastic resorptive functions. *Calcif Tissue Int* 1995;56(6):566-70.
133. Drake FH, Dodds RA, James IE, Connor JR, Debouck C, Richardson S, et al. Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *J Biol Chem* 1996;271(21):12511-6.
134. Garant PR. *Oral Cells and Tissues*. ed.: Quintessence Publishing Co, Inc - Canada. 2003.
135. Bossard MJ, Tomaszek TA, Thompson SK, Amegadzie BY, Hanning CR, Jones C, et al. Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification. *J Biol Chem* 1996;271(21):12517-24.
136. Votta BJ, Levy MA, Badger A, Bradbeer J, Dodds RA, James IE, et al. Peptide aldehyde inhibitors of cathepsin K inhibit bone resorption both in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 1997;12(9):1396-406.
137. Andersen TL, del Carmen Ovejero M, Kirkegaard T, Lenhard T, Foged NT, Delaisse JM. A scrutiny of matrix metalloproteinases in osteoclasts: evidence for heterogeneity and for the presence of MMPs synthesized by other cells. *Bone* 2004;35(5):1107-19.
138. Linsuwant-Santiwong B, Takagi Y, Ohya K, Shimokawa H. Expression of MT1-MMP during deciduous tooth resorption in odontoclasts. *J Bone Miner Metab* 2006;24(6):447-53.
139. Parikka V, Lehenkari P, Sassi ML, Halleen J, Risteli J, Harkonen P, et al. Estrogen reduces the depth of resorption pits by disturbing the organic bone matrix degradation activity of mature osteoclasts. *Endocrinology* 2001;142(12):5371-8.
140. Everts V, Delaisse JM, Korper W, Beertsen W. Cysteine proteinases and matrix metalloproteinases play distinct roles in the subosteoclastic resorption zone. *J Bone Miner Res* 1998;13(9):1420-30.
141. Goto T, Tsukuba T, Kiyoshima T, Nishimura Y, Kato K, Yamamoto K, et al. Immunohistochemical localization of cathepsins B, D and L in the rat osteoclast. *Histochemistry* 1993;99(5):411-4.
142. Sakai D, Minkin, C. The osteoclast molecular phenotype. In: *Molecular and cellular biology of bone*. Zaidi M, editor. *Advances in organ biology*. Greenwich, CT: JAI Press, pp. . 1998:385-421.
143. Minkin C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 1982;34(3):285-90.
144. Hollberg K, Hultenby K, Hayman A, Cox T, Andersson G. Osteoclasts from mice deficient in tartrate-resistant acid phosphatase have altered ruffled borders and disturbed intracellular vesicular transport. *Exp Cell Res* 2002;279(2):227-38.
145. Ciancio SG. Systemic medications: clinical significance in periodontics. *J Clin Periodontol* 2002;29 Suppl 2:17-21.
146. Bain S, Ramamurthy NS, Impeduglia T, Scolman S, Golub LM, Rubin C. Tetracycline prevents cancellous bone loss and maintains near-normal rates of bone formation in streptozotocin diabetic rats. *Bone* 1997;21(2):147-53.
147. Howell TH. Blocking periodontal disease progression with anti-inflammatory agents. *J Periodontol* 1993;64(8 Suppl):828-33.
148. Gapski R, Hasturk H, Van Dyke TE, Oringer RJ, Wang S, Braun TM, et al. Systemic MMP inhibition for periodontal wound repair: results of a multi-centre randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2009;36(2):149-56.
149. Roberts WE, Jeffrey, A.R., Bruce, N.E., David, B.B., James, K.H. Remodeling of Mineralized Tissues, Part I: The Frost Legacy. *Seminars in Orthodontics* 2006;12(4):216-37.

150. Deng ZL, Sharff KA, Tang N, Song WX, Luo J, Luo X, et al. Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development. *Front Biosci* 2008;13:2001-21.
151. Noble BS, Reeve J. Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance. *Mol Cell Endocrinol* 2000;159(1-2):7-13.
152. Cohen MM, Jr. The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am J Med Genet A* 2006;140(23):2646-706.
153. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15(6):457-75.
154. Theoleyre S, Wittrant Y, Couillaud S, Vusio P, Berreur M, Dunstan C, et al. Cellular activity and signaling induced by osteoprotegerin in osteoclasts: involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and MAPK. *Biochim Biophys Acta* 2004;1644(1):1-7.
155. Zerbo IR, Zijdeveld SA, de Boer A, Bronckers AL, de Lange G, ten Bruggenkate CM, et al. Histomorphometry of human sinus floor augmentation using a porous beta-tricalcium phosphate: a prospective study. *Clin Oral Implants Res* 2004;15(6):724-32.
156. Heymann D, Pradal G, Benahmed M. Cellular mechanisms of calcium phosphate ceramic degradation. *Histol Histopathol* 1999;14(3):871-7.
157. Heymann D, Guicheux J, Rousselle AV. Ultrastructural evidence in vitro of osteoclast-induced degradation of calcium phosphate ceramic by simultaneous resorption and phagocytosis mechanisms. *Histol Histopathol* 2001;16(1):37-44.
158. Rumpel E, Wolf E, Kauschke E, Bienengraber V, Bayerlein T, Gedrange T, et al. The biodegradation of hydroxyapatite bone graft substitutes in vivo. *Folia Morphol (Warsz)* 2006;65(1):43-8.
159. Constantz BR, Ison IC, Fulmer MT, Poser RD, Smith ST, VanWagoner M, et al. Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone. *Science* 1995;267(5205):1796-9.
160. Muller-Mai CM, Stupp SI, Voigt C, Gross U. Nanoapatite and organoapatite implants in bone: histology and ultrastructure of the interface. *J Biomed Mater Res* 1995;29(1):9-18.
161. Gomi K, Lowenberg B, Shapiro G, Davies JE. Resorption of sintered synthetic hydroxyapatite by osteoclasts in vitro. *Biomaterials* 1993;14(2):91-6.
162. Lu JX, Gallur A, Flautre B, Anselme K, Descamps M, Thierry B, et al. Comparative study of tissue reactions to calcium phosphate ceramics among cancellous, cortical, and medullar bone sites in rabbits. *J Biomed Mater Res* 1998;42(3):357-67.
163. Merckx MA, Maltha JC, Freihofer HP, Kuijpers-Jagtman AM. Incorporation of three types of bone block implants in the facial skeleton. *Biomaterials* 1999;20(7):639-45.
164. Knaack D, Goad ME, Aiolova M, Rey C, Tofighi A, Chakravarthy P, et al. Resorbable calcium phosphate bone substitute. *J Biomed Mater Res* 1998;43(4):399-409.
165. Zerbo IR, Bronckers AL, de Lange G, Burger EH. Localisation of osteogenic and osteoclastic cells in porous beta-tricalcium phosphate particles used for human maxillary sinus floor elevation. *Biomaterials* 2005;26(12):1445-51.
166. Holy CE, Fialkov, J.A., Shoichet, M.S., Davies, J.E. In vivo models for bone tissue-engineering constructs. *Bone Engineering*; ed. Davies JE, Toronto, Canada 2000:495-504.
167. Kramer RH, Kelly, H.C., Wright, H.C. The response of the rabbit to implants or processed calf bone (Boplant). *Arch Oral Biol* 1968a;13:1263.
168. Damien CJ, Parsons JR. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater* 1991;2(3):187-208.

169. Damien CJ, Parsons JR, Prewett AB, Rietveld DC, Zimmerman MC. Investigation of an organic delivery system for demineralized bone matrix in a delayed-healing cranial defect model. *J Biomed Mater Res* 1994;28(5):553-61.
170. Thaller SR, Hoyt J, Borjeson K, Dart A, Tesluk H. Reconstruction of calvarial defects with anorganic bovine bone mineral (Bio-Oss) in a rabbit model. *J Craniofac Surg* 1993;4(2):79-84.
171. Thaller SR, Hoyt J, Dart A, Borjeson K, Tesluk H. Repair of experimental calvarial defects with Bio-Oss particles and collagen sponges in a rabbit model. *J Craniofac Surg* 1994;5(4):242-6.
172. Guerra FADRA. Biomimética:Formulações haptotáticas para aplicação em regeneração óssea. Tese Doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. 2003.
173. Matos SMA. Aplicação de matrizes enriquecidas com moduladores biológicos na regeneração de tecidos periodontais e tecidos ósseos. Tese Doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. 2008.
174. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* 1986(205):299-308.
175. Gomes JF, Granadeiro, C.C., Silva, M.A., Hoyos,M., Silva, R., Vieira, T. Investigation of the Synthesis Parameters of the Reaction of Hydroxyapatite Precipitation in Aqueous Media *International Journal of Chemical Reactor Engineering* 2008;6:A103.
176. Schwartz Z, Weesner T, van Dijk S, Cochran DL, Mellonig JT, Lohmann CH, et al. Ability of deproteinized cancellous bovine bone to induce new bone formation. *J Periodontol* 2000;71(8):1258-69.
177. Lynch SE, Genco, R.G., Marx, R.E. *Tissue Engineering - Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. Ed. Quintessence books. 1999.
178. Kleinschmidt JC, Hollinger, J.O. Animal models in bone research. *Bone Grafts & Bone Substitutes*; eds. Habal MB & Reddi AH; WB Saunders Company; 13: 133-146 1992.
179. Tuffrey AA. *Laboratory animals: an introduction for new experimenters*. ed. John Wiley and Sons Ltd., Chichester. 1987.
180. Anderson RS, Edney, A.T.B. *Practical animal handling*; ed. Pergamon Press, Oxford, UK. 1991.
181. Lumley JSP, Green, C.J., Lear,P., Angell-James. *Essentials of experimental surgery*; ed. Butterwoths & Co., London: 63-64. 1990.
182. Cooley BC. *A laboratory manual for microvascular and microtubular surgery*; ed. Norwell, Look, Inc. 1994:133-35.
183. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 1982;11(4):318-26.
184. Donath K. Preparation of histologic sections by the cutting-grinding technique for hard tissue and other material not suitable to be sectioned by routine methods - Equipment and methodical performance. *Exakt - Kulzer - Publication*; Norderstedt. 1995.
185. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1990;1(1):60-8.
186. Goldstein SA. Tissue engineering: functional assessment and clinical outcome. *Ann N Y Acad Sci* 2002;961:183-92.
187. Einhorn TA. Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research. *Clin Orthop Relat Res* 1999(367 Suppl):S59-67.
188. Palmer RM, Cortellini P. Periodontal tissue engineering and regeneration: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 2008;35(8 Suppl):83-6.

189. Siegel MI, Mooney MP. Appropriate animal models for craniofacial biology. *Cleft Palate J* 1990;27(1):18-25.
190. Newman E, Turner AS, Wark JD. The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone* 1995;16(4 Suppl):277S-84S.
191. Rodgers JB, Monier-Faugere MC, Malluche H. Animal models for the study of bone loss after cessation of ovarian function. *Bone* 1993;14(3):369-77.
192. Wikesjo UM, Kean CJ, Zimmerman GJ. Periodontal repair in dogs: supraalveolar defect models for evaluation of safety and efficacy of periodontal reconstructive therapy. *J Periodontol* 1994;65(12):1151-7.
193. Caton J, Mota L, Gandini L, Laskaris B. Non-human primate models for testing the efficacy and safety of periodontal regeneration procedures. *J Periodontol* 1994;65(12):1143-50.
194. Reynolds HH. Nonhuman primates in the study of toxicological effects on the central nervous system: a review. *Ann N Y Acad Sci* 1969;162(1):617-29.
195. Smith GC. Value of nonhuman primates in predicting disposition of drugs in man. *Ann N Y Acad Sci* 1969;162:600-03.
196. Neyt JG, Buckwalter JA, Carroll NC. Use of animal models in musculoskeletal research. *Iowa Orthop J* 1998;18:118-23.
197. Martini L, Fini M, Giavaresi G, Giardino R. Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comp Med* 2001;51(4):292-9.
198. Wang X, Mabrey JD, Agrawal CM. An interspecies comparison of bone fracture properties. *Biomed Mater Eng* 1998;8(1):1-9.
199. Bloebaum RD, Merrell M, Gustke K, Simmons M. Retrieval analysis of a hydroxyapatite-coated hip prosthesis. *Clin Orthop Relat Res* 1991(267):97-102.
200. Bloebaum RD, Ota DT, Skedros JG, Mantas JP. Comparison of human and canine external femoral morphologies in the context of total hip replacement. *J Biomed Mater Res* 1993;27(9):1149-59.
201. Kimmel DB, Jee WS. A quantitative histologic study of bone turnover in young adult beagles. *Anat Rec* 1982;203(1):31-45.
202. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* 2007;13:1-10.
203. Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil I, Alobera-Gracia MA, del-Canto-Pingarron M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006;11(1):E47-51.
204. Polig E, Jee WS. Bone structural parameters, dosimetry, and relative radiation risk in the beagle skeleton. *Radiat Res* 1989;120(1):83-101.
205. Holy CE, Fialkov, J.A., Shoichet, M.S., Davies, J.E. In vivo models for bone tissue-engineering constructs. *Bone Engineering*; ed Davies J.E., Toronto, Canada 2000:495-504.
206. Roberts EW, Garetto, L.P., Brezniak, N. Applied anatomy and physiology for dental implants - Bone physiology and metabolism. . *Contemporary Implant Dentistry*. ed. Misch CE; Mosby, St. Louis ; Chapter 16: 327-353. 1993.
207. Frame JW. A convenient animal model for testing bone substitute materials. *J Oral Surg* 1980;38(3):176-80.
208. Kramer RH, Kelly, H.C., right, H.C. A histological and radiological comparison of the healing of defects of the rabbit calvarium with and without implanted heterogeneous anorganic bone. . *Arch Oral Biol* 1968b;13:1095-106.

209. Damien CJ, Parsons, J. R., Benedict, J.J., Weisman, D.S., . Investigation of a hydroxyapatite and calcium sulfate composite supplemented with an osteoinductive factor. *J Biomed Mater Res* 1991;2:187-208.
210. Damien CJ, Parsons, J. R., Prewett, A.B., Rietveld, D.C., Zimmerman, M.C. Investigation of an organic delivery system for demineralized bone matrix in a delayed-healing cranial defect model. *J Biomed Mater Res* 1994;28:553-61.
211. Thaller SR, Hoyt, J., Borjeson, K., Dart, A., Tesluk, H. Reconstruction of calvarial defects with anorganic bovine bone mineral (Bio-Oss) in a rabbit model. *J Craniofac Surg* 1993;4:79-84.
212. Thaller SR, Hoyt, J., Borjeson, K., Dart, A., Tesluk, H. Repair of experimental calvarial defects with Bio-Oss particles and collagen sponges in a rabbit model. *J Craniofac Surg* 1994;5:242-46.
213. Matos SMA. Aplicação de matrizes enriquecidas com moduladores biológicos na regeneração de tecidos periodontais e tecidos ósseos. . Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. 2008.
214. Junqueira LC, Carneiro, J. *Histologia Básica*. 9ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara koogan. 1999.
215. Hollinger JO, Buck, D.C., Bruder, S.P. Biology of bone healing: its impact on clinical therapy. . *Tissue Engineering Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. eds. Lynch SE, Genco RJ, Marx RE; Quintessence Publishing; Chapter2: 17-53 1999.
216. Prolo DJ, Gutierrez RV, DeVine JS, Oklund SA. Clinical utility of allogeneic skull discs in human craniotomy. *Neurosurgery* 1984;14(2):183-6.
217. Meffert RM. Current usage of bone fill as an adjunct in implant dentistry. *Dent Implantol Update* 1998;9(2):9-12.
218. Buser D, Dula K, Belser U, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxilla. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1993;13(1):29-45.
219. Misch CE, Dietsch F. Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant Dent* 1993;2(3):158-67.
220. Bays RA. Current concepts in bone grafting. *Current Advances in Oral and Maxillofacial Surgery*. eds. Irby WB, Shelton DW; St. Louis, CV Mosby 1983;4(109).
221. Guerra F. Biomimética - formulações haptotáticas para aplicação em regeneração óssea. . Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. 2003.
222. Schmid J, Wallkamm B, Hammerle CH, Gogolewski S, Lang NP. The significance of angiogenesis in guided bone regeneration. A case report of a rabbit experiment. *Clin Oral Implants Res* 1997;8(3):244-8.
223. Tamimi FM, Torres J, Tresguerres I, Clemente C, Lopez-Cabarcos E, Blanco LJ. Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between Bio-Oss and a novel beta-TCP/DCPD granulate. *J Clin Periodontol* 2006;33(12):922-8.
224. Davies JE, Hosseini, M.M. Hystodynamics of endosseous wound healing. Em Davies JE (ed): *Bone Engineering*. Toronto, Canada. 1-14. 2000.
225. Christel P, Cerf, C., Pilla, A. Time evolution of the mechanical properties of the calus of fresh fractures. *Annals of Biomed. Eng.* 1981;9:383-91.
226. Martin RB, Burr, D.B. *Skeletal Tissue Mechanics*. Springer-Verlag, New York. 1998.
227. Kohler DM, Crenshaw MA, Arsenault AL. Three-dimensional analysis of mineralizing turkey leg tendon: matrix vesicle-collagen relationships. *Matrix Biol* 1995;14(7):543-52.
228. Goldstein J, Mase C, Newman MH. Fixed membranous bone graft survival after recipient bed alteration. *Plast Reconstr Surg* 1993;91(4):589-96.

229. Goldstein JA, Mase CA, Newman MH. The influence of bony architecture on fixed membranous bone graft survival. *Ann Plast Surg* 1995;34(2):162-7.
230. McAllister BS, Haghghat K. Bone augmentation techniques. *J Periodontol* 2007;78(3):377-96.
231. Polimeni G, Susin C, Wikesjo UM. Regenerative potential and healing dynamics of the periodontium: a critical-size supra-alveolar periodontal defect study. *J Clin Periodontol* 2009;36(3):258-64.
232. Habibovic P, Gbureck U, Doillon CJ, Bassett DC, van Blitterswijk CA, Barralet JE. Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants. *Biomaterials* 2008;29(7):944-53.
233. Habibovic P, de Groot K. Osteoinductive biomaterials--properties and relevance in bone repair. *J Tissue Eng Regen Med* 2007;1(1):25-32.
234. Kong L, Ao Q, Wang A, Gong K, Wang X, Lu G, et al. Preparation and characterization of a multilayer biomimetic scaffold for bone tissue engineering. *J Biomater Appl* 2007;22(3):223-39.
235. Klinge B, Alberius P, Isaksson S, Jonsson J. Osseous response to implanted natural bone mineral and synthetic hydroxylapatite ceramic in the repair of experimental skull bone defects. *J Oral Maxillofac Surg* 1992;50(3):241-9.
236. Piatelli M, Favero G, Scarano A, Orsini G, Piatelli A. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:835-40.
237. Wallace SS, Froum SJ, Tarnow DP. Histologic evaluation of a sinus elevation procedure: a clinical report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1996;16(1):46-51.
238. Hallman M, Lundgren S, Sennerby L. Histologic analysis of clinical biopsies taken 6 months and 3 years after maxillary sinus floor augmentation with 80% bovine hydroxyapatite and 20% autogenous bone mixed with fibrin glue. *Clin Implant Dent Relat Res* 2001;3(2):87-96.
239. Hallman M, Nordin T. Sinus floor augmentation with bovine hydroxyapatite mixed with fibrin glue and later placement of nonsubmerged implants: a retrospective study in 50 patients. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004;19(2):222-7.
240. Schlegel AK, Donath K. BIO-OSS--a resorbable bone substitute? *J Long Term Eff Med Implants* 1998;8(3-4):201-9.
241. Valentini P, Abensur D, Wenz B, Peetz M, Schenk R. Sinus grafting with porous bone mineral (Bio-Oss) for implant placement: a 5-year study on 15 patients. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000;20(3):245-53.
242. Valentini P, Abensur D, Densari D, Graziani JN, Hammerle C. Histological evaluation of Bio-Oss in a 2-stage sinus floor elevation and implantation procedure. A human case report. *Clin Oral Implants Res* 1998;9(1):59-64.
243. Yildirim M, Spiekermann H, Biesterfeld S, Edelhoff D. Maxillary sinus augmentation using xenogenic bone substitute material Bio-Oss in combination with venous blood. A histologic and histomorphometric study in humans. *Clin Oral Implants Res* 2000;11(3):217-29.
244. Yildirim M, Spiekermann H, Handt S, Edelhoff D. Maxillary sinus augmentation with the xenograft Bio-Oss and autogenous intraoral bone for qualitative improvement of the implant site: a histologic and histomorphometric clinical study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;16(1):23-33.
245. Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81(19):5985-8.
246. Benke D, Olah A, Mohler H. Protein-chemical analysis of Bio-Oss bone substitute and evidence on its carbonate content. *Biomaterials* 2001;22(9):1005-12.

247. Wenz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials* 2001;22(12):1599-606.
248. Schneider OD, Weber F, Brunner TJ, Loher S, Ehrbar M, Schmidlin PR, et al. In vivo and in vitro evaluation of flexible, cottonwool-like nanocomposites as bone substitute material for complex defects. *Acta Biomater* 2009;5(5):1775-84.
249. Sun JS, Liu HC, Chang WH, Li J, Lin FH, Tai HC. Influence of hydroxyapatite particle size on bone cell activities: an in vitro study. *J Biomed Mater Res* 1998;39(3):390-7.
250. Oonishi H, Hench LL, Wilson J, Sugihara F, Tsuji E, Kushitani S, et al. Comparative bone growth behavior in granules of bioceramic materials of various sizes. *J Biomed Mater Res* 1999;44(1):31-43.
251. Allegrini S, Jr., Rumpel E, Kauschke E, Fanghanel J, Konig B, Jr. Hydroxyapatite grafting promotes new bone formation and osseointegration of smooth titanium implants. *Ann Anat* 2006;188(2):143-51.
252. Manjubala I, Sivakumar M, Sureshkumar RV, Sastry TP. Bioactivity and osseointegration study of calcium phosphate ceramic of different chemical composition. *J Biomed Mater Res* 2002;63(2):200-8.
253. Muller-Mai C, Voigt C, Hering A, Rahmanzadeh R, Gross U. [Madreporic hydroxyapatite granulates for filling bone defects]. *Unfallchirurg* 2001;104(3):221-9.
254. Gibson IR, Hing, K.A., Revell, P.A., Santos, J.D., Best, S.M. Bonfield, W. Enhanced in vivo response to silicate-substituted hydroxyapatite. *Key Eng Mater*, 2002:105-17.