

RENATO SILVA NACER

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO DO POLÍMERO DE MAMONA
COMO MATERIAL DE SUBSTITUIÇÃO ÓSSEA EM DEFEITO
DIAFISÁRIO NO FÊMUR DE RATOS FRENTE A ALTERAÇÕES
SECUNDÁRIAS À ASSOCIAÇÃO COM NANOPARTÍCULAS DE
SÍLÍCIA E ZIRCÔNIA**

CAMPO GRANDE
2009

RENATO SILVA NACER

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO DO POLÍMERO DE MAMONA
COMO MATERIAL DE SUBSTITUIÇÃO ÓSSEA EM DEFEITO
DIAFISÁRIO NO FÊMUR DE RATOS FRENTE A ALTERAÇÕES
SECUNDÁRIAS À ASSOCIAÇÃO COM NANOPARTÍCULAS DE
SÍLÍCIA E ZIRCÔNIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Angela Antonia Sanches Tardivo Delben

CAMPO GRANDE
2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

RENATO SILVA NACER

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO DO POLÍMERO DE MAMONA
COMO MATERIAL DE SUBSTITUIÇÃO ÓSSEA EM DEFEITO
DIAFISÁRIO NO FÊMUR DE RATOS FRENTE A ALTERAÇÕES
SECUNDÁRIAS À ASSOCIAÇÃO COM NANOPARTÍCULAS DE
SÍLICA E ZIRCÔNIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de mestre.

Resultado _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____
Instituição _____

Prof. Dr. _____
Instituição _____

Prof. Dr. _____
Instituição _____

DEDICATÓRIA

A **Deus**, pela grandiosidade de sua obra. Agradeço por ter me concedido o discernimento, a sabedoria e a compreensão necessárias para os pequenos e grandes adventos da vida.

A minha família, especialmente à minha mãe **Olídia Maria Lima da Silva**, aos meus irmãos **Fernando Silva Nacer** e **Carlos Henrique Nacer** e aos meus avós **Lívia Lima da Silva** e **Evangelino Ladislau da Silva**, pelo alicerce, confiança e apoio que me prestaram durante todo o processo para elaboração desta dissertação, assim como em todo o percurso da minha vida.

AGRADECIMENTOS

- A **Deus**, pela força divina, oportunidade e por colocar em minha vida pessoas sábias e de grande exemplo.

- A minha mãe **Olídia Maria Lima da Silva**, pelas inesquecíveis lições, nunca medindo esforços para apoiar-me e sempre me alertando para o melhor caminho. Agradeço a compreensão, o amor, carinho, a sabedoria e a confiança depositadas.

- Aos meus avós, **Lívia e Evangelino**, pelos preciosos ensinamentos de vida e pelo constante incentivo.

- Aos meus irmãos **Fernando e Carlos Henrique** pelo apoio, incentivo e amizade em todos os momentos da minha vida.

- A todos os meus amigos que estiveram presentes durante o processo de elaboração desta dissertação. Ao longo deste processo pude contar com a infinita disponibilidade, interesse e companheirismo dos amigos **Baldomero Antonio Kato da Silva**, e especialmente do colega e amigo **Rodrigo Ré Poppi**.

- A minha companheira **Fabrizia de Souza Conceição**, que durante os momentos mais difíceis soube amparar-me e apoiar-me, sempre. A minha eterna gratidão pela sua amizade, compreensão e carinho.

- Ao **Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho**, pelo incentivo e por compartilhar a sua grandiosa experiência acadêmica. Muito me honra tê-lo como referência como pesquisador, uma fonte de inspiração.

- Ao **Prof. Dr. Alexandre Nakao Odashiro** pela atenção e sabedoria científica para o amadurecimento dos conhecimentos e conceitos que tanto me auxiliaram na execução e conclusão deste trabalho.

- A **Profa. Dra. Iandara Schettert Silva** pela disponibilidade e contribuição na execução dos procedimentos cirúrgicos, exemplo de competência e maturidade profissional.

- Meus mais profundos e sinceros agradecimentos à minha orientadora, **Profa. Dra. Angela Antonia Sanches Tardivo Delben** que conduziu-me com dedicação durante todo o processo de elaboração deste trabalho. Agradeço pela imensa contribuição teórica e orientação. Muito obrigado pela confiança!

- Ao **Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste** pela oportunidade e apoio concedidos, contribuindo inestimavelmente para o meu amadurecimento profissional.

- Aos professores do programa de Pós-Graduação, pelos valiosos ensinamentos, imprescindíveis na minha formação científica.

- Aos funcionários Biotério Central da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal – UNIDERP, especialmente ao **Adalton** pela atenção e cuidados dispensados aos animais.

*“Quanto mais nos elevamos, menores parecemos aos
olhos daqueles que não sabem voar.”*

(Friedrich Nietzsche)

RESUMO

Nacer RS. Estudo do comportamento do polímero de mamona como material de substituição óssea em defeito diafisário no fêmur de ratos frente a alterações secundárias à associação com nanopartículas de sílica e zircônia. Campo Grande; 2009. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento biológico do polímero de mamona como substituto ósseo em defeito diafisário no fêmur de ratos associado à presença de nanopartículas de Sílica e Zircônia em diferentes tempos de evolução. Foram utilizados 36 ratos machos da linhagem WISTAR, divididos em quatro grupos distintos e subdivididos por período de análise, sendo: grupo 1 (G1) - defeito ósseo preenchido com polímero de mamona acrescido de carbonato de cálcio; grupo 2 (G2) - polímero de mamona com carbonato de cálcio dopado com 5% de nanopartículas de Sílica; grupo 3 (G3) - polímero de mamona com carbonato de cálcio dopado com 10% de nanopartículas de Sílica; e grupo 4 (G4) - polímero de mamona acrescido de carbonato de cálcio dopado com 5% Zircônia. Decorrido o período de observação de 15, 30 e 60 dias, os animais foram submetidos à eutanásia e os fêmures removidos e encaminhados para avaliação histológica e microscopia eletrônica de varredura. A microscopia eletrônica revelou porosidade distinta em função da natureza do dopante. A avaliação histológica mostrou que houve crescimento ósseo em todos os grupos estudados, com maior tendência de crescimento no grupo contendo polímero de mamona acrescido apenas por carbonato de cálcio. No período inicial de avaliação (15 dias) observou-se ausência de neoformação óssea nos animais do G2, que apresentaram, juntamente com os animais do G4, intensa presença de fibroblastos e uma pseudocápsula de tecido fibroso ao redor do implante. Aos 30 dias, todos os grupos apresentaram resultados semelhantes, as diferenças não eram significantes estatisticamente. Aos 60 dias, notou-se menor neoformação óssea nos animais dos grupos 2 e 4 quando comparados aos dos grupos 1 e 3, porém, maior crescimento e invaginação óssea para o interior do material foi observada no grupo 1, e maior presença de fibroblastos, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos no grupo 3 aos 60 dias. Não houve diferença estatística significativa quanto à presença de reação inflamatória entre os grupos e momentos estudados. Concluiu-se neste estudo que a associação do polímero de mamona com nanopartículas de Óxido de Silício e Zircônio é viável uma vez que tanto a Sílica como Zircônia mostraram-se biocompatíveis, permitindo crescimento ósseo entre os poros dos materiais. Entretanto, em todos os momentos estudados, observou-se maior quantidade estimada de tecido ósseo maduro nos animais com implantes de polímero de mamona sem dopante. A maior presença de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos nos animais do grupo contendo 10% de Sílica no polímero de mamona sugerem que a sílica tem potencial osteoindutor, favorecendo a agregação e diferenciação celular, persistindo a atividade integrada dos três tipos de células envolvidas no processo de ativação-reabsorção-formação óssea, mesmo após longo período de observação. A rugosidade pode ser uma característica morfológica importante nos materiais estudados no que diz respeito à agregação e crescimento ósseo.

Descritores: Materiais biocompatíveis, Substitutos Ósseos, Óleo de Rícino, Ratos.

ABSTRACT

Nacer RS. Study of the behavior of the castor oil polymer as a bone replacement material in femoral diaphysis defects of rats before the changes secondary to association with nanoparticles of silicon oxide and zirconium. Campo Grande, 2009. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

The aim of this study was to evaluate the biological behavior of the polymer of castor oil as a substitute in bone defects in the femoral diaphysis of rats with the presence of nanoparticles of silica and zirconia at different times of evolution. We used 36 male Wistar rats, divided into four groups and subdivided by period of analysis, as follows: group 1 (G1) - bone defect filled with polymer of castor oil plus calcium carbonate, group 2 (G2) - polymer of castor oil with calcium carbonate doped with 5% of silica nanoparticles, group 3 (G3) - castor oil polymer with calcium carbonate doped with 10% of nanoparticles of silica, and group 4 (G4) - polymer of castor oil plus calcium carbonate doped with 5% zirconia. After the observation period of 15, 30 and 60 days, the animals were euthanized and the femurs removed and sent for histological evaluation and scanning electron microscopy. The porosity depended on the dopant, according to electron microscopy. Histological evaluation showed that there was bone growth in all groups studied, with larger growth trend of the group containing polymer of castor oil containing only calcium carbonate. In the initial period of assessment (15 days) there was no new bone formation in the animals of G2, which showed, together with the animals in the G4, intense presence of fibroblasts and a pseudocapsule of fibrous tissue around the implant. At 30 days, all groups showed similar results, and the differences were not statistically significant. After 60 days, it was noted less new bone formation in animals in groups 2 and 4 when compared to those of groups 1 and 3, however, increased growth and invagination into the bone material was observed in group 1 and increased presence of fibroblasts, osteoblasts and osteoclasts in group 3. There was no statistical difference regarding the presence of inflammatory reaction between the groups and moments studied. In conclusion, the association of the polymer of castor oil with nanoparticles of silicon oxide and zirconium is viable since both the silica and zirconia shown to be biocompatible, allowing bone growth into the pores of materials. However, at all times studied there was a higher estimated quantity of mature bone tissue in animals with implants of polymer of castor oil without dopant. The greater presence of osteoblasts, osteocytes and osteoclasts in the animals of the group containing 10% of silica in the polymer of castor oil suggests that the silica has an osteoinductive potential, favoring the aggregation and cell differentiation, persisting the integrated activity of the three types of cells involved in the process of activation-resorption-bone formation, even after long period of observation. The roughness may be an important morphological characteristic in the material studied with respect to aggregation and bone growth.

Key words: Biocompatible Materials, Bone Substitutes, Castor Oil, Rats.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das médias das variáveis obtidas da análise histológica entre os diferentes períodos analisados para o Grupo 01(G1), 2009. (n =03).....	53
Tabela 2 - Distribuição das médias das variáveis obtidas da análise histológica entre os diferentes períodos analisados para o Grupo 02(G2), 2009. (n = 03)	57
Tabela 3 - Distribuição das médias das variáveis obtidas da análise histológica entre os diferentes períodos analisados para o Grupo 03(G3), 2009. (n = 03)	61
Tabela 4 - Distribuição das médias das variáveis obtidas da análise histológica entre os diferentes períodos analisados para o Grupo 04(G4), 2009. (n = 03)	64
Tabela 5 - Distribuição das médias da quantificação da presença de neoformação óssea para os grupos G1, G2, G3 e G4 entre os vários períodos analisados, 2009. (n = 12)	64
Tabela 6 - Distribuição das médias da quantificação da presença de fibroblastos para os grupos G1, G2, G3 e G4 entre os vários períodos analisados, 2009. (n = 12)	65
Tabela 7 - Distribuição das médias da quantificação da presença de reação inflamatória para os grupos G1, G2, G3 e G4 entre os vários períodos analisados, 2009. (n = 12)	65
Tabela 8 - Distribuição das médias da quantificação da presença de células gigantes para os grupos G1, G2, G3 e G4 entre os vários períodos analisados, 2009. (n = 12)	65
Tabela 9 - Distribuição das médias da quantificação de osteoblastos para os grupos G1, G2, G3 e G4 entre os vários períodos analisados, 2009. (n = 12)	66
Tabela 10 - Distribuição das médias da quantificação da presença de osteócitos para os grupos G1, G2, G3 e G4 entre os vários períodos analisados, 2009. (n = 12)	66
Tabela 11 - Distribuição das médias da quantificação de osteoclastos para os grupos G1, G2, G3 e G4 entre os vários períodos analisados, 2009. (n = 12)	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Organograma representativo da divisão dos grupos e períodos de observação.....	39
Figura 2 –	Balança eletrônica de precisão <i>Tecnal, Mark 210 A</i>	40
Figura 3 –	Furadeira DREMEL [®] 300 Séries, trefina cirúrgica e polímero de mamona	41
Figura 4 –	Bloco pré-fabricado do polímero de mamona esterelizado individualmente por óxido de etileno.....	41
Figura 5 –	Montagem das fotografias que ilustram a produção dos defeitos ósseos no fêmur do rato	43
Figura 6 –	Microscópio de luz acoplado à câmera fotográfica (aberta).....	46
Figura 7 –	Evaporadora (<i>Sputter</i>) Denton Vacuum – Desk III [®]	47
Figura 8 –	Equipamento utilizado para deposição metálica sobre as amostras.....	47
Figura 9 –	Vista geral do microscópio eletrônico de varredura (MEV).....	48
Figura 10 –	Coluna ótico-eletrônica, detector e câmara de amostras	48
Figura 11 –	Fotomicrografia da lâmina obtida dos animais do G1 após 15 dias da realização dos defeitos ósseos.....	50
Figura 12 –	Montagem das fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do G1 após 30 dias da realização dos defeitos ósseos.....	51
Figura 13 –	Montagem das fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do G1 após 60 dias da realização dos defeitos ósseos	52
Figura 14 –	Montagem das fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do G2 após 15 dias da realização dos defeitos ósseos	54
Figura 15 –	Montagem das fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do G2 após 30 dias da realização dos defeitos ósseos	55
Figura 16 –	Montagem das fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do G2 após 60 dias da realização dos defeitos ósseos	56

Figura 17 –	Montagem das fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do G3 após 15 dias da realização dos defeitos ósseos	58
Figura 18 –	Montagem das fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do G3 após 30 dias da realização dos defeitos ósseos	59
Figura 19 –	Montagem das fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do G3 após 60 dias da realização dos defeitos ósseos.....	60
Figura 20 –	Montagem das fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do G4 após 15 dias da realização dos defeitos ósseos.....	62
Figura 21 –	Montagem das fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do G4 após 30 dias da realização dos defeitos ósseos.....	62
Figura 22 –	Montagem das fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do G4 após 60 dias da realização dos defeitos ósseos.....	63
Figura 23 –	Montagem de fotomicrografia típica de MEV obtida do polímero de mamona não implantado	67

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

SiO ₂	Sílica
ZrO ₂	Zircônia
HA	Hidroxiapatita
µm	Micrômetro (s)
a.C	Antes de Cristo
°C	Graus Celsius
CaSO ₄ .2H ₂ O	Gesso
Y ₂ O ₃	Óxido de ítrio
Al ₂ O ₃	Óxido de alumínio
Si-O-Si	Siloxanos
Si-OH	Silanóis
g	gramas
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
UNIDERP	Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal
COBEA	Colégio brasileiro de experimentação animal
Pr ³⁺	Praseodímio
mm	milímetros
cm	centímetros
ml	mililitros
EDTA	Etileno Diamino Tetra Acetato
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Stubs	Suportes metálicos
kV	Kilovolts
HE	Hematoxilina & eosina
OH	Hidroxila
NCO	Isocianato
CaP	Fosfato de cálcio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Tecido Ósseo.....	20
2.1.1 Formação e Remodelamento ósseo.....	23
2.1.2 Fratura e reparo do tecido ósseo.....	25
2.2 Enxertos ósseos.....	27
2.3 Biomateriais.....	28
2.3.1 Polímero de mamona.....	31
2.3.2 Biocerâmicas.....	33
2.3.2.1 Cerâmicas de zircônia.....	35
2.3.2.2 Cerâmicas de Sílica	37
3 OBJETIVOS.....	39
4 MATERIAL E MÉTODO.....	40
4.1 Animais de Experimentação.....	40
4.2 Grupos Experimentais.....	40
4.3 Preparo dos blocos pré-moldados do polímero da mamona.....	41
4.4 Produção dos defeitos ósseos.....	44
4.5 Eutanásia.....	46
4.6 Procedimentos Histológicos.....	46
4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	48
5 RESULTADOS.....	50
5.1 Avaliação microscópica.....	50
5.1.1 Grupo 1 – 15 dias.....	50
5.1.2 Grupo 1 – 30 dias.....	51
5.1.3 Grupo 1 – 60 dias.....	52
5.1.4 Grupo 2 – 15 dias.....	54
5.1.5 Grupo 2 – 30 dias.....	55
5.1.6 Grupo 2 – 60 dias.....	57
5.1.7 Grupo 3 – 15 dias.....	58

5.1.8 Grupo 3 – 30 dias.....	59
5.1.9 Grupo 3 – 60 dias.....	60
5.1.10 Grupo 4 – 15 dias.....	62
5.1.11 Grupo 4 – 30 dias.....	63
5.1.12 Grupo 4 – 60 dias.....	64
5.2 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	68
6 DISCUSSÃO.....	71
7 CONCLUSÕES.....	80
REFERÊNCIAS.....	81
ANEXOS	102

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo caracteriza-se por ser um tecido metabolicamente ativo, composto por células mesenquimais inclusas dentro de uma matriz extracelular calcificada que confere ao tecido grande resistência, plasticidade e rigidez sob condições de carga, e que continuamente sofrem processo de renovação e remodelação (BURGUER *et al.*, 1995; VIEIRA *et al.*, 1999; SARTORI *et al.*, 2008).

O osso frente a situações nocivas possui características adaptativas desenvolvendo-se em sua estrutura e função em resposta a forças mecânicas e demandas metabólicas (CARVALHO *et al.*, 2002). A resposta do osso ao trauma consiste de uma seqüência histológica definida, ordenada e bem diferenciada de eventos, que resulta na cicatrização do tecido lesado de forma bastante semelhante à sua estrutura inicial (GIORDANO *et al.*, 2001).

Na prática ortopédica, freqüentemente encontra-se dificuldade na reparação de defeitos ósseos, alterações anatômicas e perturbações funcionais ocasionadas por perda óssea segmentar ou fraturas, uma vez que a rápida formação ou penetração de tecido conjuntivo circunjacente, impede ou dificulta a neoformação óssea entre os limites da lesão. Como o tecido conjuntivo apresenta velocidade de proliferação e migração celular maior do que o tecido ósseo, essa alteração morfofuncional resultante do processo regenerativo pode levar à necessidade de vários procedimentos cirúrgicos para sua adequada correção (RESTREPO *et al.*, 1998; CALIXTO *et al.*, 2001a; CALIXTO, 2001b; IGNÁCIO *et al.*, 2002; MARIA *et al.*, 2003; BETTI, 2004; FIGUEIREDO *et al.*, 2004; JACQUES *et al.*, 2004; MENDONÇA, 2006; LAUREANO FILHO *et al.*, 2007; PEREIRA JÚNIOR *et al.*, 2007).

Situações dessa natureza beneficiam-se do uso dos biomateriais para reconstrução, substituição ou preenchimento dos defeitos, porém as alternativas mais previsíveis ainda são obtidas a partir da utilização dos vários tipos de enxertos ósseos. No entanto, os enxertos ósseos apresentam inconvenientes relacionados à obtenção de quantidade ideal de suprimento ósseo, disponibilidade limitada de material e morbidade cirúrgica da fonte doadora, no caso dos enxertos ósseos autógenos, ou, no caso dos enxertos homogêneos e heterogêneos, por apresentarem riscos de transmissão de infecção e de ativação imunológica do hospedeiro, além da desvantagem dos altos custos dos bancos de ossos (GOULET *et al.*, 1997; MOORE

et al., 2001; FINKEMEIER, 2002; IGNÁCIO *et al.*, 2002; BETTI, 2004; GAMRADT & LIEBERMAN, 2004; LEONEL *et al.*, 2004; YOSHIKAWA & MYOUI, 2005).

Um biomaterial pode ser definido como uma substância ou combinação de duas ou mais substâncias, de natureza sintética ou natural, farmacologicamente inerte, capaz de interagir com um organismo vivo e não induzir reações adversas no sítio de implantação ou mesmo sistemicamente, podendo ser utilizado de forma transitória ou permanente com intuito de melhorar, aumentar ou substituir, parcial ou inteiramente, tecidos ou órgãos (VITAL *et al.*, 2006).

Em geral, materiais biocompatíveis não devem ter uma resposta do tecido hospedeiro e, para tanto, devem se assemelhar quimicamente ao mesmo. Além disso, há o fato de a funcionalidade biológica só poder se manifestar caso a biocompatibilidade seja adequada. Características como a porosidade e a capacidade do material implantado de promover íons para o ambiente vizinho, são essenciais a um material que deverá substituir o tecido ósseo. Estas características são especialmente encontradas nos biopolímeros e nas biocerâmicas (CAMPOS *et al.*, 2005; HSU *et al.*, 2005; YOSHIKAWA & MYOUI, 2005).

Dessa forma, têm-se intensificado as pesquisas para o desenvolvimento de materiais de preenchimento que atendam fundamentalmente as seguintes características: biocompatibilidade, osteocondução, osteointegração, arquitetura interna favorável ao crescimento ósseo, resistência mecânica, elasticidade e estabilidade química e biológica e que superem as desvantagens da utilização dos demais enxertos ósseos (BAUER *et al.*, 2000; KAWACHI, 2000; CALIXTO *et al.*, 2001; LEONEL *et al.*, 2004; PEREIRA JUNIOR *et al.*, 2007).

O polímero derivado do óleo de mamona, desenvolvido em 1984 pelo Departamento de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros, da Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, possui uma fórmula molecular que tem mostrado compatibilidade com os tecidos vivos. Aspectos favoráveis quando implantados, como boa processabilidade, flexibilidade de formulação, versatilidade de temperatura de cura e controle de pico exotérmico na transição líquido-gel, excelentes propriedades estruturais e não liberação de vapores e radicais tóxicos tipificam a poliuretana de mamona como material eficaz no processo de reparo ósseo guiado (LAUREANO FILHO, 2001; MARIA *et al.*, 2003; FIGUEIREDO *et al.*, 2004; JACQUES *et al.*, 2004; LARANJEIRA *et al.*, 2004; PEREIRA JUNIOR, 2005; MENDONÇA *et al.*, 2006).

Uma das principais características apresentadas pelo polímero de mamona é a sua arquitetura interna porosa (LEONEL *et al.*, 2003). A existência de porosidade nos implantes, seu diâmetro, conformação e a presença de intercomunicação, são características importantes que regulam a migração vascular e celular para o interior destes implantes, permitindo a neoformação óssea (CAMPOS *et al.*, 2005). Sendo assim, poros com dimensões adequadas podem favorecer o crescimento do tecido através do material o que aumenta a resistência *in vivo* (YOSHIKAWA & MYOUI, 2005).

Vários tipos de biomateriais e suas associações experimentais com diversas substâncias vêm sendo estudados no processo de reparação óssea, considerando que o tecido ósseo é um dos poucos tecidos de mamíferos capaz de reconstituir a estrutura lesada em sua forma original com restauração da estrutura histológica e propriedades mecânicas (BURG, 2000; SICCA *et al.*, 2000; GOMIDE *et al.*, 2005).

O uso de biocerâmicas como materiais biocompatíveis tem se estendido desde o emprego isolado do material até outras formas de utilização, como por exemplo, no revestimento de próteses metálicas ou na associação com materiais poliméricos. Apresentam maior dureza e rigidez que aço, maior resistência a calor e corrosão que metais ou polímeros, são menos densas que a maioria dos metais e suas ligas e suas matérias primas são abundantes e de baixo custo (PAGANI *et al.*, 2003; CAMPOS *et al.*, 2005).

A porosidade, para materiais cerâmicos utilizados em implantes, surge também como uma característica importante destes materiais, apesar da quantidade de poros e fendas na sua estrutura acarretar em diminuição da resistência mecânica do material isoladamente. (FELÍCIO-FERNANDES, 2000; CAMPOS *et al.*, 2005; BRENTTEL *et al.*, 2006; DOURADO, 2006).

A Sílica (SiO_2) e a Zircônia (ZrO_2) são materiais cerâmicos que apresentam características físico-químicas como durabilidade e resistência à abrasão e mecânica (ANDRADE & DOMINGUES, 2006). A Sílica apresenta estabilidade química e transparência à luz visível, podendo ser usada como carga em resinas ortopédicas e odontológicas (TABATABAEI *et al.*, 2006). A Zircônia destaca-se entre as cerâmicas avançadas, apresentando excelentes resultados relacionados à tenacidade à fratura, biocompatibilidade, boa resistência à corrosão e ao desgaste, podendo ser usada em uma série de aplicações mecânicas (MANSUR *et al.*, 1998; HOFFMANN *et al.*, 2008).

Além das propriedades físico-químicas, a Zircônia e a Sílica apresentam propriedades bioinertes/biocompatíveis que permitem a aplicação destes materiais como carga em resinas compostas (VASCONCELOS *et al.*, 1999; CHRASKA *et al.*, 2000).

Atualmente, pouco se sabe sobre a interferência de cerâmicas nanoparticuladas sobre a estrutura de materiais poliméricos no que diz respeito à osteogênese.

Desta forma, o estudo do comportamento do polímero de mamona como material de preenchimento de defeito diafisário no fêmur de ratos frente a alterações secundárias à associação com nanopartículas de sílica e zircônia justifica-se com base na preparação de uma nova classe de materiais semelhante estruturalmente a tecidos vivos (nanocompósitos polímero-cerâmica) para aplicações médicas e odontológicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido Ósseo

O osso é um tipo especializado de tecido conjuntivo de sustentação, formado por células e por material extracelular calcificado e caracteriza-se por sua rigidez e resistência a pressão, resultado da interação entre os componentes orgânicos e minerais da matriz óssea (FREITAS, 2001; CROCI *et al.*, 2003; LINARI, 2004).

A matriz orgânica é composta principalmente por fibras de colágeno do tipo I (que compõe cerca de 90-95% do peso seco do material orgânico) e é sintetizada pelos osteoblastos, células portanto, responsáveis pela formação óssea, que inicialmente, recebe o nome de “tecido osteóide”, “osso imaturo” ou “pré-osso”. O remanescente 5%, um meio homogêneo denominado substância fundamental amorfa, é composto por proteoglicanas e proteínas não colágenas (BETTI, 2004; LANDA, 2005; CORSETTI, 2005).

Além do colágeno tipo I, que proporciona ao tecido grande resistência às forças tensionais, a matriz óssea é permeada por sais de cálcio e fosfato na forma de cristais de hidroxiapatita (HA) – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, que conferem ao osso grande dureza e resistência, especialmente sob condições que envolvem carga. Esses elementos minerais representam a porção inorgânica da matriz, que constitui 67% do peso total da matriz óssea (FREITAS, 2001; CROCI, 2003; LINARI, 2004; CORSETTI, 2005).

Assim como os demais tecidos musculoesqueléticos, o tecido ósseo é composto por células com características peculiares, derivadas da linha de células osteoprogenitoras, conhecidas como osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (BUCKWALTER, 1987; VIEIRA, 1999; BETTI, 2004; LANDA 2005; CONEGLIAN, 2007).

Os osteoblastos são células jovens, ricas em fosfatase alcalina, organizadas em uma camada contínua sobre o osteóide e que possuem intensa atividade metabólica. São células responsáveis pela síntese e secreção dos componentes orgânicos da matriz óssea, formada principalmente pelo colágeno tipo I (CORSETTI, 2005; PRETEL, 2005).

Após a maturação dos osteoblastos que se inserem na matriz óssea mineralizada, ocorre a transformação dessas células, o metabolismo se altera, cessam a síntese de matriz óssea e elas passam a ser chamadas de osteócitos. À medida que os osteoblastos são circundados pela matriz óssea que secretam, deixam de ser células poligonais e desenvolvem extensões longas e delgadas. O processo de formação óssea, iniciado pelos osteoblastos é denominado osteogênese (FREITAS, 2001; LINARI, 2004).

Os osteócitos são células adultas, que atuam na manutenção e vitalidade dos componentes químicos da matriz óssea. Situam-se em cavidades ou lacunas dentro de trabéculas ósseas no interior da matriz, mas mantêm comunicação entre si através de projeções citoplasmáticas, que se intercalam e estabelecem vias de transporte de nutrientes e metabólitos. Ambas as células tem a função de formação óssea, diferenciando-se em sua localização (BURGUER *et al.*, 1995; LANDA, 2005; PRETEL, 2005).

Já os osteoclastos são células gigantes, multinucleadas, capazes de erodir o tecido ósseo ao atacar a matriz, reabsorvendo o osso e formando depressões na superfície óssea conhecidas como lacunas de Howship, em resposta a fatores liberados pelos osteoblastos, participando, desta forma, do remodelamento ósseo e da regulação dos níveis plasmáticos de cálcio (BORBA *et al.*, 2003; CORSETTI, 2005).

O tecido ósseo se apresenta macroscopicamente sob duas formas: trabecular, uma estrutura de aspecto esponjoso; e cortical, mais sólido, compacto, formado por lamelas ósseas (CROCI *et al.*, 2003; BETTI, 2004; LINARI, 2004).

O osso cortical é compacto, denso, e com a matriz de colágeno organizada em forma de lamelas concêntricas, geralmente ao redor de um canal vascular central constituindo o sistema de Havers. Localiza-se nas diáfises dos ossos longos e na superfície externa dos ossos chatos, podendo ser dividido em duas formas anatômicas e funcionais: periósteeo e endósteeo (FREITAS, 2001).

O periósteeo possui uma camada externa constituída por fibras colágenas e fibroblastos e, uma porção mais profunda, constituídas por células osteoprogenitoras (CORSETTI, 2005). Possui importante papel no crescimento aposicional e no reparo de fraturas, pois provoca um desequilíbrio entre a formação óssea e a reabsorção para que ocorra com tempo o aumento da rede óssea. Já o endósteeo do osso

cortical tem um nível mais elevado de atividade de remodelamento, resultando de mais deformação mecânica (LINARI, 2004).

O osso esponjoso ou medular compreende a medula óssea, depositada em espaços constituídos de uma rede de placas finas e irregulares pobremente organizadas, denominadas trabéculas, separadas por espaços intercomunicantes porosos com aspecto esponjoso (BETTI, 2004; CORSETTI, 2005).

O osso trabecular é metabolicamente mais ativo por unidade de volume. Essas trabéculas, interconectadas num padrão de cacho de abelhas oferece grande resistência mecânica que garante adaptação máxima para o padrão de tensão dado. O osso esponjoso está localizado nas epífises, metáfises e na maioria dos ossos curtos e planos, que apresentam paredes relativamente finas de osso cortical com grandes volumes de osso esponjoso. Estas diferenças na distribuição de osso cortical e esponjoso causam diferenças na consolidação óssea (CROCI *et al.*, 2003; LINARI, 2004).

Os dois tipos ósseos podem ser diferenciados histologicamente pelas suas propriedades mecânicas, estruturais e biológicas em osso imaturo (primário, trabecular ou trançado) e maduro (ou secundário ou lamelar). Os dois tipos possuem as mesmas células e os mesmos constituintes da matriz óssea, porém, apresentam diferentes organizações tridimensionais em suas fibras colágenas (FREITAS, 2001; BETTI, 2004; LANDA, 2005).

O osso imaturo é um tecido altamente celular, relativamente pouco mineralizado que contém grande número de osteócitos irregularmente distribuídos no interior das trabéculas ósseas neo-formadas. Caracteriza-se por ter uma velocidade muito rápida de deposição e reabsorção óssea (30 a 50 μ m/dia ou mais) e por ter uma matriz de colágeno desorganizada sem a estrutura lamelar dos sistemas harvesianos (FREITAS, 2001; CORSETTI, 2005).

A freqüente formação em “colcha de retalhos” do osso trançado e o padrão de mineralização em focos criam uma aparência na radiográfica irregular que distingue o osso trançado encontrado no calo de fratura do osso lamelar. Em virtude da falta de orientação das suas fibrilas colágenas a mineralização irregular e a concentração relativamente alta de células e água, o osso trançado é menos rígido e mais facilmente deformado do que o osso lamelar (CROCI, 1997; CROCI *et al.*, 2003).

O tecido ósseo secundário substitui gradativamente o tecido ósseo primário pela deposição gradual de estratos ou camadas de matriz, que o transformam da

forma trabecular para lamelar. Caracteriza-se por ter formação lenta (0,6µm/dia), por ter alta resistência mecânica e por apresentar fibras colágenas organizadas em lamelas, dispostas paralelamente umas às outras, em camadas concêntricas em torno de um canal central, denominado canal de *Havers*, por onde ocorrem vasos sanguíneos e nervos. Cada conjunto dessas forma um sistemas de *Havers*. Este sistema é típico do tecido ósseo secundário. Os canais medulares de *Havers* comunicam-se entre si com a cavidade medular, e com a parte externa do osso por canais transversais ou oblíquos, os canais de *Volkman*. Por ser uma estrutura inervada e irrigada, os ossos apresentam grande sensibilidade e capacidade de regeneração (FREITAS, 2001; BETTI, 2004; CONEGLIAN, 2007).

2.1.1 Formação e Remodelamento ósseo

O processo de desenvolvimento e remodelamento ósseo se desenvolvem com base em dois processos antagônicos mas acoplados: formação e reabsorção ósseas. O acoplamento dos dois processos permite a renovação e remodelação ósseas e é mantido a longo prazo por um complexo sistema de controle que inclui hormônios, fatores físicos e fatores humorais locais (FRIEDLAENDER , 1987; BORBA *et al.*, 2003).

Durante a formação do osso, a síntese da matriz colágena precede a mineralização, coincidindo com uma maior produção de fosfatase alcalina, enquanto a mineralização coincide com maior produção de osteocalcina (STEIN & LIAN, 1993; VIEIRA, 1999).

A maturação do colágeno ocorre a partir da deposição das fibrilas colágenas na matriz extracelular que são estabilizadas pela interligação entre radicais lisina e hidroxilisina de diferentes cadeias. Assim, por ação da enzima lisil oxidase, moléculas de lisina e hidroxilisina da porção terminal (telopeptídeos) das moléculas de colágeno formam aldeídos e se condensam com o resíduo de molécula adjacente formando uma estrutura interligadora composta de três radicais hidroxilisina (piridinolina) ou uma lisina e duas hidroxilisinas (deoxipiridinolina) (VIEIRA, 1999; TAKEDA, 2008).

Após a fase inicial de maturação do colágeno, que se estende até o final da fase de cicatrização, ocorre a proliferação de células precursoras dos osteoblastos

que posteriormente deverão sedimentar a substância intercelular (ROCHA JÚNIOR *et al.*, 2006).

Concomitantemente à proliferação subperiosteal, ocorre a atividade celular dentro do canal medular onde as células que proliferam parecem ser derivadas do endóstio. À medida que o tecido celular cresce, este amadurece, e as células básicas dão origem aos osteoblastos, que depositam uma matriz intercelular de colágeno e polissacarídeos que logo se torna impregnada de sais de cálcio para formar o osso não amadurecido. Este, por sua vez, devido à sua textura foi denominado osso "primário" (TAKEDA, 2008).

O osso primário transforma-se gradualmente pela ação dos osteoblastos em um osso mais amadurecido, com estrutura lamelar típica. Quando a formação está completa, o osso recém formado sofre um processo imperceptível de remodelação constante em todos os ossos durante a vida toda, porém se torna especialmente acentuado e evidente após uma fratura (CORSETTI, 2005).

O remodelamento ósseo é um processo fisiológico contínuo, que permite a manutenção da resistência óssea através de sua "auto-modelagem", de acordo com as solicitações mecânicas a que o osso é submetido, e possibilita a substituição de um osso envelhecido e danificado por um tecido novo (BORBA *et al.*, 2003). Este processo contínuo é de tal precisão, que a partir da aquisição do pico de massa óssea, esta se mantém constante até a instalação da falência gonadal (MANOLAGAS & JILKA, 1995).

O remodelamento ósseo depende então da atividade integrada dos osteoblastos, para produção de tecido neoforado, dos osteócitos para a manutenção da resistência e dos osteoclastos, para destruição do tecido, ambos os eventos são cruciais ao processo no decorrer do crescimento ósseo normal, ou após lesão (FREITAS, 2001; NOBLE *et al.*, 2003).

A fase de remodelamento é iniciada pela ativação de precursores osteoclásticos, que iniciam a reabsorção óssea após tornarem-se osteoclastos multinucleados. Quando estas células reabsorvem o tecido ósseo, elas o fazem através da secreção de uma mistura de proteases ácidas e neutras, que agindo seqüencialmente degradam as fibrilas colágenas em fragmentos de diferentes tamanhos. Os produtos de degradação que são jogados em circulação variam desde amino ácidos livres até fragmentos carboxi e amino-terminais contendo interligadores (C e N-telopeptídeos) (TAKEDA, 2008).

Os fragmentos liberados pelos osteoclastos são adicionalmente metabolizados pelo fígado e rins, de maneira a resultar em fragmentos suficientemente pequenos para serem excretados pelos rins por simples filtração glomerular (VIEIRA, 1999).

Ao final da reabsorção, ocorre a invasão de pré-osteoblastos que se diferenciam em osteoblastos para formar a nova matriz, tornando-se subsequentemente mineralizada durante a contínua formação óssea, a medida que os osteócitos vão sendo aprisionados na matriz (BURGUER *et al.*, 1995; NOBLE *et al.*, 2003).

A orquestração do processo de ativação-reabsorção-formação sugere mecanismos bastante refinados e, embora muitos fatores interfiram isoladamente nos processos de reabsorção ou formação óssea, pouco se sabe sobre o mecanismo de integração entre estes dois processos, suprimindo as necessidades sistêmicas do organismo (BORBA *et al.*, 2003; TAKEDA, 2008).

2.1.2 Fratura e reparo do tecido ósseo

O osso é um tecido adaptativo que se desenvolve em sua estrutura e função em resposta a forças mecânicas e demandas metabólicas. A deposição do osso é parcialmente regulada pela quantidade de deformação que lhe foi imposta. Assim, quanto maior a deformação aplicada, maior a detecção pelos osteócitos e a ativação dos osteoblastos. Conseqüentemente, os ossos se tornam mais resistentes (CARVALHO *et al.* 2002; NOBLE *et al.*, 2003).

Entretanto, quando essa deformação se configura em lesão, a quebra da relação entre os reguladores locais e sistêmicos promove um desequilíbrio contínuo entre formação (osteoblastos) e reabsorção (osteoclastos) ósseas, desencadeando uma série de eventos intra e extracelulares, que culminam com o reparo do tecido lesado (GIORDANO, 1998; PADULA, *et al.*, 2003).

Embora em condições normais a maioria das fraturas não apresente problemas de consolidação, existem algumas situações em que o processo de reparo pode ser acelerado, assegurando rápido retorno da função músculo-esquelética (STEVENSON, 1998; GIORDANO *et al.*, 2001).

O processo natural de reparo ósseo inicia imediatamente após a lesão, e é dividido em duas fases: vascular e celular, caracterizando um estágio inflamatório. Uma vasoconstrição inicial forma coágulos que interrompem o fluxo sanguíneo local. Em seguida, os restos celulares e coágulos sanguíneos são removidos por macrófagos, começa então, a proliferação de células osteogênicas próximo ao local da lesão e os osteoblastos dão origem às trabéculas ósseas constituídas por tecido ósseo imaturo e desordenado que une provisoriamente as porções do osso fraturado, e que dão origem à formação do calo ósseo, por ossificação endocondral e intramembranosa (BETTI, 2004; LINARI, 2004; LANDA, 2005; CORSETTI, 2005).

O processo de ossificação intramembranosa ocorre a partir da diferenciação direta de células mesenquimais indiferenciadas e fibroblastos em células osteogênicas, essas dividem-se formando mais células osteogênicas e também diferenciando-se em osteoblastos, que por sua vez, secretam a matriz óssea e se deslocam ou são incluídos em lacunas e se tornam osteócitos (BURGUER *et al.*, 1995; LAUREANO FILHO, 2001).

A ossificação endocondral ocorre a partir de um modelo cartilaginoso. No local da fratura, forma-se um coágulo sanguíneo que é posteriormente substituído por um tecido colágeno altamente vascular (tecido de granulação), que torna-se progressivamente mais fibroso. Células mesenquimais diferenciam-se em condroblastos e substituem o tecido de granulação fibroso com cartilagem hialina, formando um calo provisório flexível. Este calo é fortalecido pela deposição de sais de cálcio dentro da matriz cartilaginosa, onde células osteoprogenitoras do endóstio e perióstio são ativadas e depositam osso entrelaçado ao redor e dentro do calo provisório. O calo provisório é então transformado em calo ósseo (BETTI, 2004; PRETEL, 2005).

O calo ósseo passa a ser remodelado e, a seguir, substituído por osso secundário ou lamelar. Concomitantemente, há necessidade de formação e/ou reconstituição dos vasos sanguíneos que irão suprir o tecido ósseo em processo de regeneração, através de brotamento de vasos pré-existentes. O processo é denominado angiogênese, e é acompanhado por intensa atividade dos osteoclastos. Estes se dispõem junto às trabéculas ósseas formando túneis, que serão revestidos por lâminas concêntricas de tecido ósseo maduro, constituindo o sistema Haversiano (FREITAS, 2001; CORSETTI, 2005).

Apesar do restabelecimento da anatomia vascular ser um dos eventos precoces que ocorrem durante a osteogênese, em determinadas situações, a angiogênese pode estar associada à maior reabsorção osteoclástica da matriz óssea, atuando de forma reversa ao esperado (CROCI, *et al.*, 2003).

Sendo assim, se as condições forem favoráveis, o processo de reparo se dá por uma série de fases até que o osso esteja totalmente consolidado. Contudo, deve-se levar em conta que o tipo de consolidação não é o mesmo e constante em todas as circunstâncias (CROCI, *et al.*, 2003). Com o passar dos anos, estudos foram surgindo com o intuito de que métodos auxiliares pudessem ser usados para realçar a resposta inerente ao organismo vivo no que diz respeito ao processo da neoformação óssea (REZENDE *et al.*, 1996; CALIXTO *et al.*, 2001; IGNÁCIO *et al.*, 2002; LEONEL *et al.*, 2003; MARIA *et al.*, 2003; PEREIRA JUNIOR, 2005).

2.2 Enxertos ósseos

As indicações dos enxertos ósseos constituem, de modo geral, situações freqüentes da prática ortopédica, tais como: preenchimento de cavidades ósseas ou defeitos tumorais, realização de artrodeses, reconstrução de perdas segmentares ósseas pós-traumáticas, tratamento de retarde de consolidação ou pseudartroses, ou mesmo enchimento de defeitos em fraturas recentes ou osteotomias (REZENDE *et al.*, 1996). A aplicação adequada de um enxerto ósseo é, com freqüência, o fator crítico diferenciador entre o reparo bem sucedido de uma fratura e o desenvolvimento de uma não-união (PEREIRA JUNIOR, 2005).

É importante ressaltar que os enxertos ósseos são classificados de acordo com a diferença genética existente entre os organismos doadores e receptores, sendo classificados em autógenos (quando compostos por tecido do próprio receptor), homogêneos (obtidos de outro indivíduo da mesma espécie que o receptor) e heterogêneos ou xenogêneos (retirados de seres de uma espécie diferente do receptor) (CALIXTO, 2001; LARANJEIRA *et al.*, 2004; LEONEL *et al.*, 2004; MAEDA, 2005)

O enxerto ósseo autógeno tem sido apontado por diversos autores (SILVA *et al.*, 1997; AICHELMANN-REIDY & YUKNA, 1998; MARTINEZ & WALKER, 1999 ; FIGUEIREDO *et al.*, 2004) como sendo o material mais adequado para atingir o

preenchimento de um defeito com material que possa promover osteoindução e/ou osteocondução, e a conseqüente osteogênese reparativa.

No estágio atual do conhecimento, é consenso que o osso autógeno é o material mais adequado para atingir esse objetivo. A sua integração aos tecidos vizinhos e sua capacidade de osteogênese tem-se mostrado superiores a numerosos outros materiais utilizados com o mesmo propósito (TSONIS, 2002; JACQUES *et al.*, 2004; MAEDA, 2005).

Mas apesar de o enxerto ósseo esponjoso autógeno ser superior do ponto de vista da osteogênese, por ter excelente biocompatibilidade tecidual, possui limitações de uso, como a alta morbidade do sítio doador, reabsorção, complicações pós-operatórias, maior tempo cirúrgico, dificuldade de uma conformação exata ao defeito, necessidade de dois procedimentos cirúrgicos, e a quantidade insuficiente quando a fonte doadora é escassa, como nas crianças e em pacientes já submetidos a cirurgias anteriores que exauriram áreas potencialmente doadoras de osso (SILVA *et al.*, 1997; AICHELMANN-REIDY & YUKNA, 1998; MARTINEZ & WALKER, 1999; CALIXTO, 2001; MOORE *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2003; FIGUEIREDO *et al.*, 2004; LEONEL *et al.*, 2004; PEREIRA JÚNIOR, 2005; MENDONÇA *et al.*, 2006).

Assim, a procura de um material substituto do osso autógeno continua sendo um desafio. O substituto ou implante ósseo ideal não deve causar modificação física no tecido, deve ser quimicamente inerte, não deve causar reação alérgica ou tipo corpo estranho, além de poder ser obtido na quantidade e forma necessárias para preencher o defeito ósseo (BUCHOLZ, 2002; JACQUES *et al.*, 2004).

2.3 Biomateriais

Diante da busca constante de um substituto ideal para tecidos humanos, em virtude da complexidade do tratamento reparador, destaque tem sido dado a materiais de origem sintética ou natural, conhecidos como aloplásticos, que englobam diversos metais ou ligas metálicas inertes, cerâmicas, compósitos e polímeros (MOORE, 2001; IGNÁCIO, 2002; LEONEL, 2003; CORSETTI, 2005).

O registro histórico da primeira utilização dos biomateriais se refere a materiais de sutura e datam de 4000 a.C. Existem registros da utilização de placas

metálicas por egípcios para reparos em lesões cranianas e membros artificiais. Estas práticas também já eram conhecidas desde a época do império romano até a idade média (SILVER 1989; CAMPOS *et al.*, 2005).

Os primeiros biomateriais procuravam essencialmente propor um reparo mecânico de lesões teciduais, providenciando suportes não-tóxicos, inertes e bem tolerados. A implantação das próteses ortopédicas representa, ainda, um exemplo amplamente utilizado destes procedimentos. A extensão de tal modelo de terapia envolveu materiais que estimulam a integração do implante com os tecidos adjacentes, provocando a mobilização e ativação celular, bem como a subsequente produção da matriz extracelular intimamente associada com o material implantado (VASCONCELOS *et al.*, 1999).

A definição clássica de biomaterial é “parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo” (HELMUS E TWEDEN, 1995).

Um biomaterial, em sentido amplo, também pode ser definido como qualquer material farmacologicamente inerte capaz de interagir com um organismo vivo, não induzindo reações adversas no sítio de implantação ou mesmo sistemicamente (CALIXTO, 2001; CAMPOS *et al.*, 2005; MENDONÇA, 2005).

A escolha de um material que possa ser utilizado como implante biológico passa necessariamente pela análise de um conjunto de requisitos que atendam fundamentalmente às seguintes características: ser biocompatível, ou seja, sua presença não deve causar efeitos nocivos no local do implante ou no sistema biológico; não deve sofrer alteração no meio implantado; deve ser biofuncional, osteocondutor, osteoindutor, resistentes a forças compressivas e à tração, e passível de esterilização. Os biomateriais podem ainda ser classificados de acordo com o seu comportamento fisiológico, como sendo biotoleráveis, bioinertes, bioativos e biodegradáveis (CALIXTO, 2001; CORSETTI, 2005; MAEDA, 2005).

O desenvolvimento de materiais bioativos e biodegradáveis visa, além de substituir tecidos lesionados, promover a recuperação do tecido danificado através da atuação em metabolismos intra e extracelulares responsáveis pela reprodução celular e propagação dos tecidos em crescimento (VASCONCELOS *et al.*, 1999).

De acordo com Vert *et al.* (1992), biodegradável é a designação utilizada para polímeros e dispositivos sólidos que, em função da degradação macromolecular, sofrem dispersão *in vivo* mas sem a eliminação dos produtos e subprodutos pelo

organismo. Polímeros biodegradáveis podem ser atacados por elementos biológicos de forma que a integridade do sistema seja afetada, formando-se fragmentos ou outros subprodutos de degradação, que podem ser removidos do seu local de ação, mas não necessariamente do organismo (BARBANTI, 2005).

Sendo assim, materiais biodegradáveis são biomateriais capazes de substituir tecidos danificados por um certo período de tempo, durante o qual o processo de reparo natural da área afetada estaria sendo promovido. O material ideal para esta função, além de biodegradável, estimularia a regeneração do tecido matriz e teria uma cinética de degradação das propriedades mecânicas compatível com a cinética de reparo do tecido. Dessa forma, o novo tecido iria progressivamente substituindo o implante nas funções requeridas (PEREIRA *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2006).

A osteoindução pode ser definida como processo pelo qual as células tronco mesenquimais, presentes no tecido circunjacente ao leito receptor, são induzidas à diferenciação em células de linhagem osteogênica (ALEXANDER, 1987; ALBREKTSSON & JOHANSSON, 2001).

A osteocondução é a propriedade do material em servir como arcabouço para a proliferação e migração de células osteoprogenitoras e a sua posterior diferenciação terminal em osteoblastos, no entanto este tipo de material não promove formação óssea quando implantado em tecido mole (GROSS, 1997; ALBREKTSSON & JOHANSSON, 2001).

A osteocondução ao longo da superfície do implante pode somente ocorrer quando a vanguarda de células migratórias alcança a sua superfície. A matriz óssea é depositada sobre a superfície do implante, orientando a formação óssea entre a espícula formada e o osso na superfície do implante (FRIEDLAENDER, 1987).

Esta ênfase sobre migração celular como mecanismo crítico na osteocondução tem dois motivos. Primeiro, a migração celular durante o reparo da ferida está associada ao fenômeno de contração da ferida (e tem implicação com a retenção do coágulo à superfície do implante). Segundo, as células que migram não são somente osteoblastos, mas qualquer célula com potencial osteogênico (PONZONI, 2004).

Assim, a capacidade osteocondutiva da superfície pode ser governada pela habilidade de retenção da rede de fibrina do coágulo e a resistência a forças retrativas geradas pela atividade migratória de diferentes células osteogênicas que são requeridas para osteocondução (MASTERS, 1988; SANADA *et al.*, 2003).

Implantes de polímeros orgânicos ou de materiais mineralizados absorvíveis permitem um reparo permanente, mobilizando as células que normalmente participam na renovação da mesma estrutura, fenômeno este já abordado e conhecido como osteocondução. Com o tempo, o implante pode ser substituído integralmente pelo material endógeno, resolvendo o problema da descontinuidade das interfaces (LEE *et al.*, 2006).

2.3.1 Polímero de mamona

A pesquisa de biomateriais tem apresentado uma variedade de implantes, sintéticos ou naturais, desenvolvidos para uso biológico. A descoberta de novos polímeros e copolímeros tem contribuído significativamente para a evolução no campo dos biomateriais (CALIXTO, 2001; LARANJEIRA *et al.*, 2004).

Os polímeros constituem uma classe de materiais biocompatíveis, podendo ser processados por diferentes modos de elaboração em fibras, materiais de sutura, hastes, parafusos, placas e grampos. Apresentam como vantagens o fato de serem pré-fabricados, disponíveis em grande quantidade e não necessitarem de um segundo local cirúrgico (região doadora), reduzindo o tempo de cirurgia (CALIXTO, 2001; IGNÁCIO *et al.*, 2002).

Os conhecimentos sobre biopolímeros evoluíram muito nas últimas décadas, principalmente com o advento da primeira classe de poliuretanos, quando foi comprovada a superioridade das uretanas vegetais sobre as resinas derivadas de minerais (BOLSON *et al.*, 2005). As resinas poliuretanas vegetais surgiram em 1937, sendo formadas por cadeias de polímeros de uretana, que constituem o produto da reação química entre um grupo isocianato e uma hidroxila (IGNÁCIO *et al.*, 2002).

Em 1984, o Departamento de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros, da Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo desenvolveu uma resina poliuretana extraída do óleo da mamona (*Ricinus communis* – divisão *Magnoliophyta*, classe *Magnoliopsida*, sub-classe *Rosidae*, ordem *Euforbiales* e família *Euforbiceae*). O óleo de mamona é na realidade um poliéster, formado por três moléculas do ácido ricinoléico (ácido 12-hidroxi-oléico), cada uma com um grupo hidroxila no carbono 12, propício para a polimerização por meio de ligações uretana. Os grupos hidroxila do ácido ricinoléico reagem com os grupos isocianato do pré-

polímero para formar as poliuretanas (MARIA *et al.*, 2003; LEONEL *et al.*, 2003; ZILIOOTTO *et al.*, 2003; FIGUEIREDO *et al.*, 2004; JACQUES *et al.*, 2004; LARANJEIRA *et al.*, 2004; LEONEL *et al.*, 2004; MENDONÇA *et al.*, 2006; LAUREANO FILHO *et al.*, 2007; PEREIRA JUNIOR *et al.*, 2007).

A inclusão do carbonato de cálcio facilita a troca iônica na interface osso-resina, aumenta os níveis de dissolução celular, permite a formação de poros e confere melhor padrão de resistência e elasticidade em relação ao tecido ósseo (IGNÁCIO *et al.*, 2002; MARIA *et al.*, 2003).

A reação dispensa a presença de catalisadores, tem pico exotérmico máximo de 42° C, não emite vapores tóxicos e não libera monômeros livres residuais como o metilmetacrilato e não sofre alterações ao ser submetido à radiação (BOLSON *et al.*, 2005; MARIA *et al.*, 2003; MENDONÇA *et al.*, 2006).

O polímero de mamona é um biomaterial, com módulo e elasticidade similar ao osso humano, que apresenta os aspectos favoráveis de processabilidade; flexibilidade de formulação; versatilidade de temperatura de cura e controle de pico exotérmico na transição líquido-sólido; excelentes propriedades estruturais; ausência de emissão de vapores irritantes ou tóxicos; bom poder de adesão a metais; não liberador de radicais tóxicos quando implantada e baixo custo (IGNÁCIO *et al.*, 2002; LEONEL *et al.*, 2003; LEONEL *et al.*, 2004; MARIA *et al.*, 2004).

O fato do polímero de mamona apresentar excelentes propriedades estruturais é de suma importância para o sucesso encontrado após a sua utilização. Entre estas propriedades, deve ser citada a presença de poros irregulares em meio a sua estrutura, permitindo assim sua incorporação aos tecidos vivos e favorecendo a regeneração dos defeitos ósseos (MARIA *et al.*, 2003; PEREIRA JUNIOR *et al.*, 2007).

Desta forma, a existência de porosidade nos implantes, seu diâmetro, conformação e a presença de intercomunicação, são características importantes que regulam a migração vascular e celular para o interior destes implantes, permitindo ou não a neoformação óssea (LEONEL *et al.*, 2003) .

Apesar de diversos estudos experimentais (OHARA *et al.*, 1995; CALIXTO *et al.*, 2001; MARIA *et al.*, 2003; LEONEL *et al.*, 2003; FIGUEIREDO *et al.*, 2004; JACQUES *et al.*, 2004; LEONEL *et al.*, 2004; BOLSON *et al.*, 2005; MENDONÇA *et al.*, 2006; PEREIRA JUNIOR *et al.*, 2007) comprovarem o potencial da poliuretana, para utilização no tratamento de afecções ortopédicas, com ênfase especial na sua

biocompatibilidade e poder de osteocondução, somente em 1999 o produto foi aprovado pelo Ministério da Saúde do Brasil (registro Anvisa nº 10171110079) e no ano de 2003 pela *Food and Drug Administration* (FDA) (PEREIRA JUNIOR *et al.*, 2007).

Bolson *et al.* (2005), após avaliação clínica, observou a ausência de rejeição ao implante da poliuretana em codornas domésticas e constatou a sua biocompatibilidade a partir de dados resultantes de análises clínicas, radiológicas, macroscópicas e histológicas. Semelhantes condições foram também observadas por Ignácio *et al.*, 2002 e Maria *et al.*, 2003 em cães; Mendonça *et al.*, 2006 em coelhos; Leonel *et al.*, 2003 e Leonel *et al.*, 2004 em ratos.

Calixto *et al.* (2001), demonstraram a biocompatibilidade dos implantes de flocos de resina poliuretana na cavidade alveolar de ratos, sendo capaz de certo grau de osteointegração direta, observado por acúmulo progressivo de tecido ósseo em maturação, sem sinais de resposta inflamatória persistente.

Leonel *et al.* (2004), ao avaliar a importância da porosidade do polímero na neoformação tecidual em ratos, observou uma acentuada neoformação óssea com presença de restos de polímero rodeados por osso neoformado e tecido conjuntivo denso após 120 dias de estudo. Segundo os pesquisadores, os poros dos fragmentos do polímero encontravam-se preenchidos por tecido conjuntivo denso, rico em células clásticas, que promoviam a reabsorção ativa do polímero, visando assim o completo preenchimento do defeito por tecido ósseo.

2.3.2 Biocerâmicas

A utilização de cerâmicas como materiais biocompatíveis remonta a 1894, quando o alemão Dreesman relatou o uso de gesso ($\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$) como um possível substituto para o preenchimento de cavidades ósseas, porém o material apresenta uma resistência mecânica muito baixa e é completamente reabsorvido pelo organismo, resultando em uma rápida fragmentação e degradação. Tais propriedades pouco atrativas praticamente excluíram a utilização do gesso como biocerâmica implantável (CANO *et al.*, 1999; KAWACHI *et al.*, 2000).

Em 1969, Larry L. Hench, engenheiro especializado em cerâmicas, iniciou trabalhos com vitrocerâmicas e apresentou um tipo de vidro que se integrava tão bem ao tecido ósseo de ratos, que os pesquisadores não conseguiam separá-los.

Aparentemente o vidro que Hench havia desenvolvido atraía as células ósseas (HENCH & JONES, 2005).

A década de 70 marcou o início do uso mais intenso de materiais cerâmicos com propriedades que possibilitam a sua classificação como biocerâmicas. A primeira biocerâmica com uso muito difundido neste período foi a alumina densa (α -Al₂O₃). Este material, devido a sua boa biocompatibilidade e elevada resistência mecânica, vem sendo usado com frequência até hoje em próteses ortopédicas que substituam ossos ou parte deles que são submetidos, na sua atividade funcional, a esforços elevados (KAWACHI *et al.*, 2000).

Em função do aumento do número de materiais cerâmicos utilizados como biomateriais e os diversos aspectos envolvidos na interação com os tecidos vivos, tem-se procurado classificá-los em diversos grupos. Assim, em termos gerais, as biocerâmicas são classificadas em bioinertes e bioativas. Entretanto, de acordo com a Conferência da Sociedade Européia para Biomateriais realizada na Inglaterra em 1986, o termo bioinerte não é adequado, já que todo material induz algum tipo de resposta do tecido hospedeiro, mesmo que mínima, devendo, por este motivo, ser evitado. (HENCH, 1991; KAWACHI *et al.*, 2000).

O termo bioatividade foi utilizado inicialmente para descrever a habilidade que certas composições de vidros, desenvolvidos no fim da década de 60 e início da de 70, têm de se conectarem ao tecido ósseo circundante ao implante, induzindo a formação de uma camada de hidroxiapatita (HA) em sua superfície. Hoje, sabe-se que outros materiais cerâmicos como a HA sintética, o fosfato tri-cálcio sinterizado e algumas vitro-cerâmicas também podem ser bioativos sob certas condições de síntese (HENCH, 1991; ANDRADE & DOMINGUES, 2006; BRENTEL *et al.*, 2006).

Biocerâmicas estão disponíveis como microesferas, camadas ou coberturas finas em implantes metálicos, redes porosas, compostos com componentes polímeros, grandes superfícies bem polidas (OH *et al.*, 2006). Materiais que podem ser classificados como biocerâmicas incluem alumina, zircônia, fosfatos de cálcio, vidros ou vidros cerâmicos a base de sílica, carbonos pirolíticos (KAWACHI *et al.*, 2000; PAGANI *et al.*, 2003; CAMPOS *et al.*, 2005).

O sucesso da aplicabilidade clínica de uma biocerâmica está fortemente ligado as suas propriedades físico-químicas e mecânicas, que devem ser perfeitamente adequadas a sua função *in vivo*. Dependendo do tipo de aplicação, a biocerâmica deve ser estável permanecendo longo tempo no paciente ou

reabsorvível, sendo substituídas rapidamente pelo osso recém formado. As cerâmicas porosas são processadas quando as aplicações exigem materiais osteocondutores. Entretanto, existem controvérsias quanto à implantação biológica de cerâmicas com estruturas porosas acreditando-se que as mesmas podem oferecer como desvantagens o fato de serem frágeis, restringindo assim sua aplicação (DOURADO, 2006; OH *et al.*, 2006).

A associação de materiais cerâmicos com biopolímeros tem como principais características biológicas a biocompatibilidade, a osteocondução e a biodegradação, propriedades estas encontradas devido à presença de poros em meio a sua estrutura, que favorecem a neoformação tecidual dentre os mesmos (LEONEL *et al.*, 2003; OH *et al.*, 2006). Desta forma, para os autores que defendem a presença de poros em materiais cerâmicos, a porosidade e a capacidade do material implantado de promover íons para o ambiente vizinho são as mais importantes características associadas a um material que deverá substituir um tecido ósseo (CAMPOS *et al.*, 2005; YOSHIKAWA & MYOUI, 2005; BRENTEL *et al.*, 2006; DOURADO, 2006).

2.3.2.1 Cerâmicas de zircônia

A zircônia é uma cerâmica polimorfa que possui três estruturas cristalinas: monoclinica, cúbica e tetragonal. A zircônia pura tem a estrutura monoclinica na temperatura ambiente e é estável até 1.170°C. Entre esta temperatura e 2.370°C, ela se transforma em zircônia tetragonal, e, acima de 2.370°C, em zircônia cúbica. Após o processamento, durante o resfriamento, a tetragonal se transforma em monoclinica a uma temperatura de 970°C, aproximadamente. Esta fase de transformação está associada a 3% a 4% de expansão volumétrica (PICONI & MACCAURO, 1999).

Apesar da elevada dureza, biocompatibilidade e estabilidade química, a zircônia pura monoclinica é frágil e inadequada para a fabricação de materiais para uso biológico. Esta deficiência é contornada com a adição de estabilizantes da fase tetragonal a temperatura ambiente (SANTOS *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2008).

A adição de certos óxidos estabilizantes é imprescindível para manter as fases polimórficas de temperaturas elevadas, em temperatura ambiente. Destes

óxidos, o de ítrio (Y_2O_3) se destaca como estabilizante adequado para a estabilização da fase tetragonal da zircônia, o qual é conhecido como fase tenaz e dura à temperatura ambiente, o que possibilita o uso deste material como cerâmica avançada (NONO, 1990; KUMAR *et al.*, 2004; KURANAGA, 2005). Desta forma, a fase tetragonal pode existir na temperatura ambiente após a sinterização (PICONI & MACCAURO, 1999).

A zircônia destaca-se entre as cerâmicas avançadas, apresentando excelentes resultados relacionados principalmente à tenacidade a fratura, e pode ser utilizada em uma série de aplicações biológicas com ênfase nas suas propriedades mecânicas. Trata-se de um material biocompatível, com boa resistência à corrosão e ao desgaste (CHRASKA *et al.*, 2000; HUANG *et al.*, 2000; LIANG & DUTTA, 2001; KONDOH *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2005).

Os primeiros estudos utilizando cerâmicas de zircônia para o aumento da resistência mecânica e da tenacidade à fratura foram iniciados por Garvie *et al.* (1975), onde foram testadas a expansão e a tensão de cisalhamento desenvolvida na transformação da fase tetragonal para monoclinica (ASSIS, 2007).

De forma a obter uma tenacidade à fratura máxima, a fração volumétrica de inclusões de zircônia deve ser otimizada. Isto porque a tenacidade irá aumentar com a fração volumétrica até atingir-se um máximo, acima da qual as microtrincas geradas pelas partículas de zircônia irão interagir umas com as outras resultando em um decréscimo na resistência mecânica (ASSIS, 2007). A fração volumétrica máxima para a ocorrência do aumento da tenacidade, conforme cálculos termodinâmicos feitos por Evans e Faber (1984), situa-se em torno de 0,3% em volume.

Segundo Pierri *et al.* (2005), a presença de pequenas quantidades de zircônia (1% em volume) em matriz de Al_2O_3 é suficiente para promover uma inibição do crescimento de grãos de alumina, permitindo ao mesmo tempo que o processo de sinterização sem aplicação de pressão possa resultar em altas densidades finais. Isso mostra que a utilização de pequenas quantidades de inclusões nanométricas de zircônia pode ser uma solução interessante para a obtenção de corpos com microestrutura mais refinada e homogênea, favorecendo o aumento nas propriedades mecânicas do compósito.

2.3.2.2 Cerâmicas de Sílica

Dentre os materiais biocompatíveis mais promissores utilizados como substitutos ósseos, destacam-se as cerâmicas bioativas que, por serem sintéticas, podem ser produzidas em grande quantidade e com controle dos parâmetros físico-químicos como pureza, porosidade, área superficial e tamanho de grãos (ANDRADE E DOMINGUES, 2006). No entanto, mecanismos envolvidos no processo de formação da camada de hidroxiapatita em materiais expostos a diferentes fluidos fisiológicos ainda são controversos.

A sílica é um polímero inorgânico formado por grupos siloxanos (Si-O-Si) em seu interior e de grupos silanóis em sua superfície (AIROLDI & FARIAS, 2000) e desempenha um papel importante na biomineralização de muitos organismos, inclusive dos corais (BORUM *et al.*, 2003).

A alta densidade dos grupos silanóis (Si-OH) existentes na superfície da sílica amorfa, por ex., é considerada responsável pelo crescimento da HA e pela formação de osso em vitro-cerâmicas. Os grupos silanóis presentes em vidros induzem a formação da HA em maior extensão que as superfícies de sílica cristalinas ou tratadas termicamente (LI *et al.*, 1992; ANDRADE E DOMINGUES, 2006).

Pereira *et al.* (1999), ao estudarem o desenvolvimento de materiais que apresentam níveis controláveis de reatividade a partir da combinação a nível nanométrico ou molecular de fases poliméricas e inorgânicas, concluíram que híbridos com fases inorgânicas com composições ricas em sílica ou ricas em cálcio se mostraram resistentes à dissolução, possuindo pequenos graus de inchamento.

Os mecanismos de nucleação e crescimento da HA nos substratos de sílica gel são controversos. A importância relativa da composição, dos grupos silanóis na estrutura, de defeitos na superfície, do tamanho e volume dos poros e da adsorção de íons silicatos dissolvidos dos géis de sílica são alguns dos parâmetros mais estudados.

Kokubo *et al.* (2003), concluíram que certos vidros bioativos que não continham cálcio e fósforo em sua composição também podem ser bioativos. Segundo os autores, a formação de uma camada de sílica hidratada na superfície de um tipo de vidro bioativo é a característica que mais influencia a bioatividade do material, sendo atribuída à sílica a capacidade de bioatividade.

Martin *et al.* (2004), estudaram a utilização de nanopartículas de sílica na auto-organização de redes celulares e constataram que as nanopartículas de sílica podem auxiliar na organização e crescimento celular, interagindo com os fluidos corpóreos, podendo ser empregada também como reforço em matrizes biocerâmicas para aplicações biomédicas.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar o comportamento biológico do polímero de mamona como substituto ósseo em defeito diafisário no fêmur de ratos frente a alterações secundárias à associação com nanopartículas de sílica e zircônia em diferentes tempos de evolução.

3.2 Específicos

- Avaliar histologicamente a biocompatibilidade e as respostas inflamatórias no tecido ósseo após a implantação do polímero de mamona dopado com as nanopartículas de SiO_2 e ZrO_2 .
- Analisar o potencial osteogênico e a capacidade osteocondutora do polímero de mamona com e sem a adição das nanopartículas de sílica e zircônia.
- Verificar o potencial osteoindutor da sílica nanométrica dissolvida no polímero de mamona.
- Comparar, em diferentes períodos de observação, a qualidade do tecido ósseo neoformado ao redor e no interior dos materiais implantados, e a interação do polímero de mamona dopado com as nanopartículas de SiO_2 e ZrO_2 às células ósseas.
- Correlacionar a influência da morfologia da superfície do polímero de mamona associado ou não dos dopantes com processo de formação óssea.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais de Experimentação

Foram utilizados 36 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem WISTAR, com peso corpóreo variando entre 230 e 350 gramas, adultos procedentes do Biotério Central da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal – UNIDERP, Campo Grande, MS.

Os animais ficaram confinados em gaiolas de 0,15m², e mantidos em fotoperíodo de 12 horas, temperatura e umidade mantidas por ar condicionado, ruídos mínimos, ração sólida e água “ad libitum”, ficando sob observação por um período de dois dias, antes da utilização no experimento.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foram apreciados e aprovados pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS** em reunião de 17 de maio de 2007 com protocolo nº 141/2007.

4.2 Grupos Experimentais

Os animais disponíveis foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais assim denominados:

Grupo 1 (N = 9): Defeito ósseo preenchido com polímero de mamona acrescido de carbonato de cálcio

Grupo 2 (N = 9): Defeito ósseo preenchido com polímero de mamona acrescido de carbonato de cálcio e dopado com 5% de nanopartículas de Sílica (SiO₂).

Grupo 3 (N = 9): Defeito ósseo preenchido com polímero de mamona acrescido de carbonato de cálcio e dopado com 10% de nanopartículas de Sílica (SiO₂).

Grupo 4 (N = 9): Defeito ósseo preenchido com polímero de mamona acrescido de carbonato de cálcio e dopado com 5% de nanopartículas de Zircônia (ZrO₂).

Todos os grupos foram ainda subdivididos em 3 subgrupos em função do tempo de observação (15, 30 e 60 dias), com 3 animais em cada subgrupo, conforme ilustrado na figura 1.

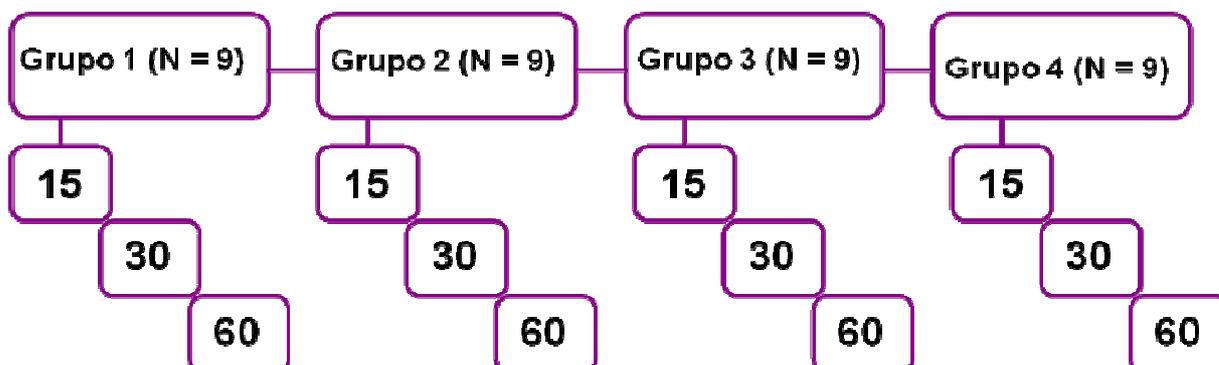


Figura 1 – Organograma representativo da divisão dos grupos e períodos de observação.

4.3 Preparo dos blocos pré-moldados do polímero da mamona

Os implantes foram preparados conforme as instruções recomendadas pelo fabricante (BIOMECÂNICA Ind. e Com. de Prod. Ortopédicos Ltda). Inicialmente, os três componentes necessários para a formação do polímero de mamona foram alocados em recipientes separados para em seguida serem pesados na proporção correta e misturados.

Foi utilizada para a pesagem dos componentes uma balança eletrônica de precisão da Marca *Tecnal*, Modelo *Mark 210 A* (Figura 2), com capacidade máxima de 210g., acondicionada no laboratório de preparação química da UFMS.



Figura 2 – balança eletrônica de precisão *Tecnal, Mark 210 A*.

Para a confecção do polímero de mamona que serviu de base para todos os grupos, seguiu-se o mesmo procedimento. Misturou-se 2,0g de pré-polímero (fração líquida 1) à 2,0g de carbonato de cálcio (fração pó) e posteriormente foi acrescentado 1,8g de poliol (fração líquida 2).

Após a mistura dos três componentes básicos, adicionou-se 0,290g de nanopartículas de SiO₂ à poliuretana correspondente ao grupo 2; para a confecção da poliuretana dopada com Óxido de Silício com concentração de 10% acrescentou-se 0,580g de nanopartículas de SiO₂ (grupo 3); e para o grupo 4, foram acrescentadas 0,290g de ZrO₂ nanoparticulado à poliuretana de mamona.

As nanopartículas foram preparadas pelo grupo de Materiais da UFMS através do processo sol-gel e pelo método de Pechini modificado.

A produção de nanopartículas de sílica foi por micro-emulsão. A obtenção da zircônia nanocristalina estabilizada por Pr³⁺ na fase tetragonal se deu a partir de acetato de zircônia. Tanto para a zircônia quanto para a sílica, o controle de tamanho de partículas foi feito pelo uso de surfactantes.

Aproximadamente dez minutos após a mistura o produto atingiu o estado manipulável, com alta adesividade. Em seguida o biomaterial foi prensado entre duas placas de polietileno revestidas com teflon, sendo estas separadas entre si por duas lâminas de vidro medindo 1,00mm de espessura e 7,5cm de comprimento,

obtendo-se assim, uma placa uniforme do polímero da mamona com 1,00mm de espessura.

Após a completa polimerização do material, o mesmo permaneceu por mais 48 horas no laboratório e com uma Furadeira ortopédica DREMEL® 300 Séries e uma broca trefina de uso cirúrgico de 2,00mm de diâmetro interno (Figura 3), perfurou-se a placa rígida do polímero, obtendo-se blocos uniformes em forma de discos de 1,00mm de diâmetro por 2,00mm de espessura.



Figura 3 - Furadeira DREMEL® 300 Séries, trefina cirúrgica e polímero de mamona

Os blocos assim obtidos foram esterilizados individualmente por óxido de etileno para serem utilizados no procedimento operatório (Figura 4).



Figura 4 – bloco pré-fabricado do polímero de mamona esterilizado individualmente por óxido de etileno.

4.4 Produção dos defeitos ósseos

O experimento foi realizado no laboratório de fisiologia animal da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal – UNIDERP, em Campo Grande – MS, no período compreendido entre os meses de julho e dezembro de 2008.

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de solução da associação de Cloridrato de Xilazina 2% (Sepso Ind. E Com. Ltda, Jacareí, SP) e Cloridrato de Cetamina 10% (Sepso Ind. E Com. Ltda, Jacareí, SP), na proporção 1:2, em doses de 0,10-0,15 ml/100g de peso corporal.

No pré-operatório todos os animais foram inspecionados a fim de se verificar o estado da pele, presença de secreção nas narinas e características das fezes, para certificarmos se os mesmos encontravam-se com boa saúde, caso contrário, seriam rejeitados.

Após o procedimento anestésico, foi realizada a tricotomia da face lateral da coxa direita, em extensão suficiente para permitir a visualização da região a ser abordada. Somente após a obtenção do plano anestésico, constatada através da ausência do reflexo córneo-palpebral ao estímulo digital, realizou-se a tricotomia.

O animal foi então, posicionado em decúbito ventral, prendendo-se as patas dianteiras e traseiras em abdução, e o local da incisão preparado com anti-sepsia (álcool-iodado).

A incisão de acesso ao fêmur direito foi realizada com um bisturi. Após a incisão da fáscia lata, foi localizada a diáfise femoral e na face crânio-lateral, a aproximadamente 5,00mm da epífise proximal, realizou-se um defeito ósseo de 2,00mm de diâmetro empregando uma broca diamantada do tipo esférica nº 1016 (KG Sorensen) acopladas a uma furadeira da marca DREMEL® 300 Séries a 5.000 RPM sob irrigação constante com soro fisiológico perfurando a cortical óssea até atingir o canal medular.

O defeito ósseo criado na face crânio-lateral da diáfise femoral foi preenchido pelo polímero de mamona acrescido de carbonato de cálcio em blocos pré-moldados de 2,00mm de diâmetro por 1,00mm de espessura, implantados sob pressão (Figura 5).

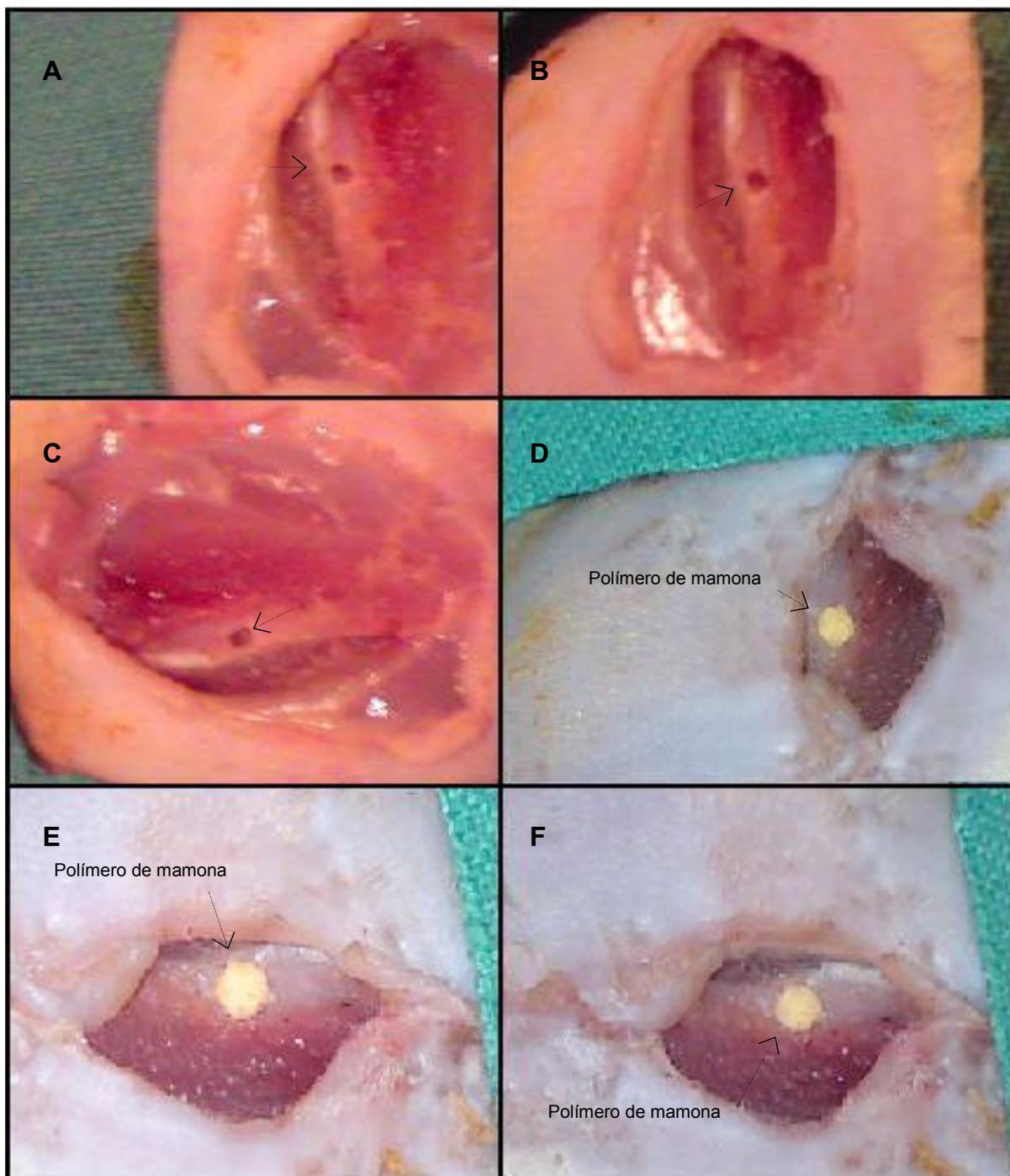


Figura 5 – Montagem das fotografias que ilustram a produção dos defeitos ósseos no fêmur do rato. A, B e C: Falha óssea com 2,00mm de diâmetro. D, E e F: Polímero de mamona ocupando a falha óssea, implantado sob pressão.

Posteriormente à implantação da poliuretana derivada do óleo de mamona foi realizada a síntese por planos com nylon poliamida 0,30 agulhado.

4.5 Eutanásia

Decorrido o período de observação de 15, 30 e 60 dias, os animais foram submetidos à eutanásia com injeção intraperitoneal letal da associação de solução injetável de Cloridrato de S(+) Cetamina (Cristália – Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. – Campinas, SP) e Tiopental Sódico (Cristália – Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. – Campinas, SP) pó estéril diluído em Solução Fisiológica de Cloreto de Sódio a 0,9% em concentração de 100mg/ml.

Após terem sido cuidadosamente dissecados os tecidos moles suprajacentes, os fêmures dos animais foram desarticulados, removidos, e em seguida as peças foram imersas em frascos de vidros herméticos, individuais, com formol tamponado a 10% e encaminhadas para estudo histológico.

4.6 Procedimentos Histológicos

O processo histológico foi iniciado após 24 horas de imersão no formol tamponado a 10%. As peças obtidas foram lavadas em água corrente para retirar o excesso de fixador (formol tamponado a 10%) e posteriormente, foram imersas em solução descalcificante de Etileno Diamino Tetra Acetato (EDTA): 5,5g; água: 90mL; e formol 37-40%: 10mL, para remoção da parte mineral da matriz óssea mineralizada. Sete dias após, as peças foram lavadas em água corrente para retirada do excesso de EDTA e submetidas à desidratação em álcool etílico em diferentes concentrações (80%, 90%, 95% e 100%, consecutivamente), diafanização em xilol *p.a.* e inclusão em parafina histológica.

O processamento de desidratação, diafanização e inclusão em parafina histológica seguiu o seguinte protocolo:

1. lavagem em água corrente por 24 horas;
2. banho de imersão em álcool etílico a 80% por 24 horas;
3. banho de imersão de uma hora em álcool etílico a 90%;
4. banho de imersão de uma hora em álcool etílico a 95%;
5. quatro sessões de imersão de uma hora cada em álcool etílico 100%;
6. banho de imersão de 30 min em solução contendo 50% de xilol e 50% de álcool etílico 100%;

7. duas sessões de banho de imersão de uma hora em xilol;
8. três sessões de banho de imersão de duas horas cada em parafina;
9. inclusão em parafina fundida a 60° em pequenos blocos.

Após a inclusão na parafina, os blocos foram submetidos a cortes sagitais de 5 µm de espessura. As fitas obtidas a partir do micrótomo foram transferidas para um banho-maria, com o auxílio de uma pinça, para serem distendidas. Nesta etapa, foram retiradas as dobras e evitadas as bolhas abaixo da fita. Após a distensão, os cortes foram separados individualmente utilizando-se lâminas de vidro previamente limpas com detergente, estocadas em álcool 80% e previamente secas.

Os cortes obtidos foram colocados em uma estufa a 60° para a desparafinização por aproximadamente 12 horas e coradas com Hematoxilina e Eosina. O processo de coloração foi realizado a partir de uma seqüência de banhos em xilol, álcool e água, inversamente ao procedimento executado na etapa de inclusão. As etapas da coloração estão descritas abaixo:

1. Banho de imersão em xilol por 5min;
2. Banho de imersão em xilol por 2min;
3. Banho de imersão em xilol por 1min;
4. Banho de imersão em Álcool 100% por 1min;
5. Banho de imersão em Álcool 95% por 1min;
6. Banho de imersão em Álcool 70% por 1min;
7. Lavagem em Água por 2min.

Após a hidratação, os cortes foram corados com hematoxilina-eosina seguindo o seguinte protocolo:

1. imersão em hematoxilina por 10min;
2. lavagem em água corrente por 10min;
3. imersão em eosina entre por 5min;
4. lavagem em água e desidratação em álcool 70% rapidamente;
5. diafanização em xilol;
6. deposição da resina líquida sobre o corte aderido à lâmina e cobri-lo com a lamínula.

As imagens de cada campo foram obtidas a partir de um microscópio de luz Olympus® Japan - BX41 acoplado a uma câmera fotográfica semi-automática PM-10AK (*Olympus Auto Exposure Control Unit PM-CBK-3*) com objetiva de imersão e aumento final de 1000X (Figura 6).



Figura 6 - microscópio de luz acoplado à câmera fotográfica (aberta).

Os aspectos avaliados na análise microscópica basearam-se na presença de células características do processo inflamatório, macrófagos, tipo de tecido na área de transição implante-osso, presença de fibroblastos (fibrose), formação de pseudocápsula fibrosa ao redor do material implantado, trabéculas de tecido ósseo neoformado (infiltração de tecido ósseo para o interior do polímero), presença de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos.

A avaliação histológica dos eventos foi feita de forma descritiva, utilizando um método semi-quantitativo, onde ficou estabelecida a seguinte classificação: (Ø) ausência, (+) discreta, (++) moderada, e (+++) intensa presença dos itens analisados. Considerou-se discreta quando a presença de determinado item ocupou até 25% da lâmina, moderada de 25% a 50% e intensa acima de 50%.

4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras encaminhadas para a MEV foram posicionadas em suportes metálicos (*stubs*), fixadas com fita dupla-face de carbono e, para auxiliar na condutividade, uma estreita camada de prata líquida foi colocada abaixo do material.

Posteriormente, as amostras foram inseridas em uma evaporadora (*Sputter*) da marca Denton Vacuum, modelo Desk III[®] (Figuras 6 e 7), recobertas com um filme de ouro pulverizado depositados na sua superfície para em seguida serem encaminhadas para o microscópio eletrônico.



Figura 7 – evaporadora (*Sputter*) Denton Vacuum – Desk III[®].



Figura 8 – Equipamento utilizado para deposição metálica sobre as amostras.

O microscópio eletrônico de varredura utilizado foi um Jeol JSM-6380LV (Scanning Electron Microscope), operando com a tensão de aceleração típica de 15 kV (Figura 9 e 10).



Figura 9 – Vista geral do microscópio eletrônico de varredura (MEV).



Figura 10 – Coluna ótico-eletrônica, detector e câmara de amostras.

5 RESULTADOS

As medidas das variáveis foram expressas em média \pm desvio padrão. Os resultados foram tabulados de maneira a se observar a disposição dos valores quantificados da presença de neoformação óssea, fibroblastos, pseudocápsula fibrosa, reação inflamatória, macrófagos, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos entre os grupos (G1, G2, G3 e G4) e entre os vários períodos analisados (15, 30 e 60 dias).

A magnitude de variação entre as variáveis e grupos estudados foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis, e quando houve diferença significativa entre os grupos foi aplicado o *post hoc test* de Student-Neuman-Keuls.

Consideraram-se como estatisticamente significativas as comparações com $p < 0,05$. Para tabulação dos dados foi utilizado o *software* Microsoft Office Excel 2007 e a análise estatística foi realizada com o programa Bioestat 5.0.

A comparação entre a quantificação dos achados histológicos e os grupos e períodos analisados estão representados nas tabelas 1 a 11.

5.1 Avaliação microscópica

5.1.1 Grupo 1 – 15 dias

Nos animais do grupo 1 – 15 dias, observou-se poros em diâmetros variados na superfície do material sendo preenchidos por osso. Ao redor de alguns fragmentos de polímero pode-se notar pequena atividade fibroblástica com discreta reação inflamatória e presença de células gigantes. Na interface implante-osso observou-se pequena presença de tecido conjuntivo denso fibroso bem organizado, com ausência da pseudocápsula fibrosa envolvendo o implante. A presença moderada de osteoblastos e discreta de osteoclastos sugere início do processo de formação-reabsorção óssea, sendo observada aposição de tecido ósseo neoformado nas margens do defeito ósseo com atividade osteogênica no interior do material implantado. Entretanto, a ausência de osteócitos configura a formação de uma matriz óssea imatura (Figura 11).

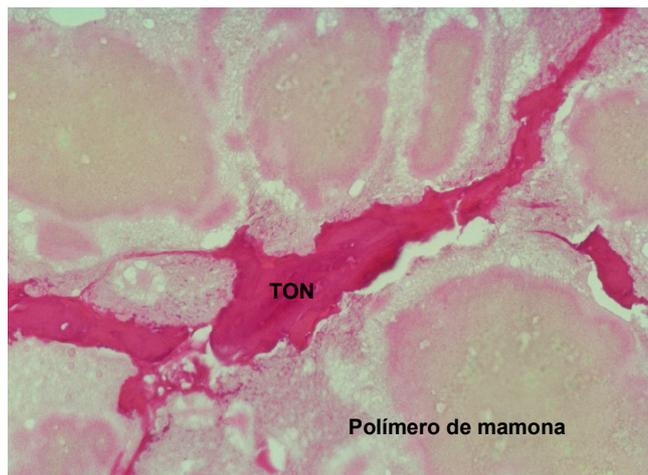


Figura 11 – Fotomicrografia da lâmina obtida dos animais do G1 após 15 dias da realização dos defeitos ósseos: Notar o tecido ósseo neoformado (TON) infiltrando por entre os poros do polímero e envolto por grandes fragmentos do biomaterial. HE, 200X.

5.1.2 Grupo 1 – 30 dias

Já os animais do grupo 1 – 30 dias, apresentavam maior quantidade de aposição óssea nas margens e no interior do defeito à qual invaginava-se para o interior do implante. Pode ser observada moderada atividade osteoblástica e alguns osteoclastos ao redor da matriz óssea recém formada. A presença de osteócitos aprisionados nas lacunas dentro de trabéculas ósseas no interior da matriz indica a maturação do tecido ósseo neoformado. Não foram observadas atividade fibroblástica ou reação inflamatória próxima à área do material implantado ou mesmo na região de aposição óssea (Figura 12).

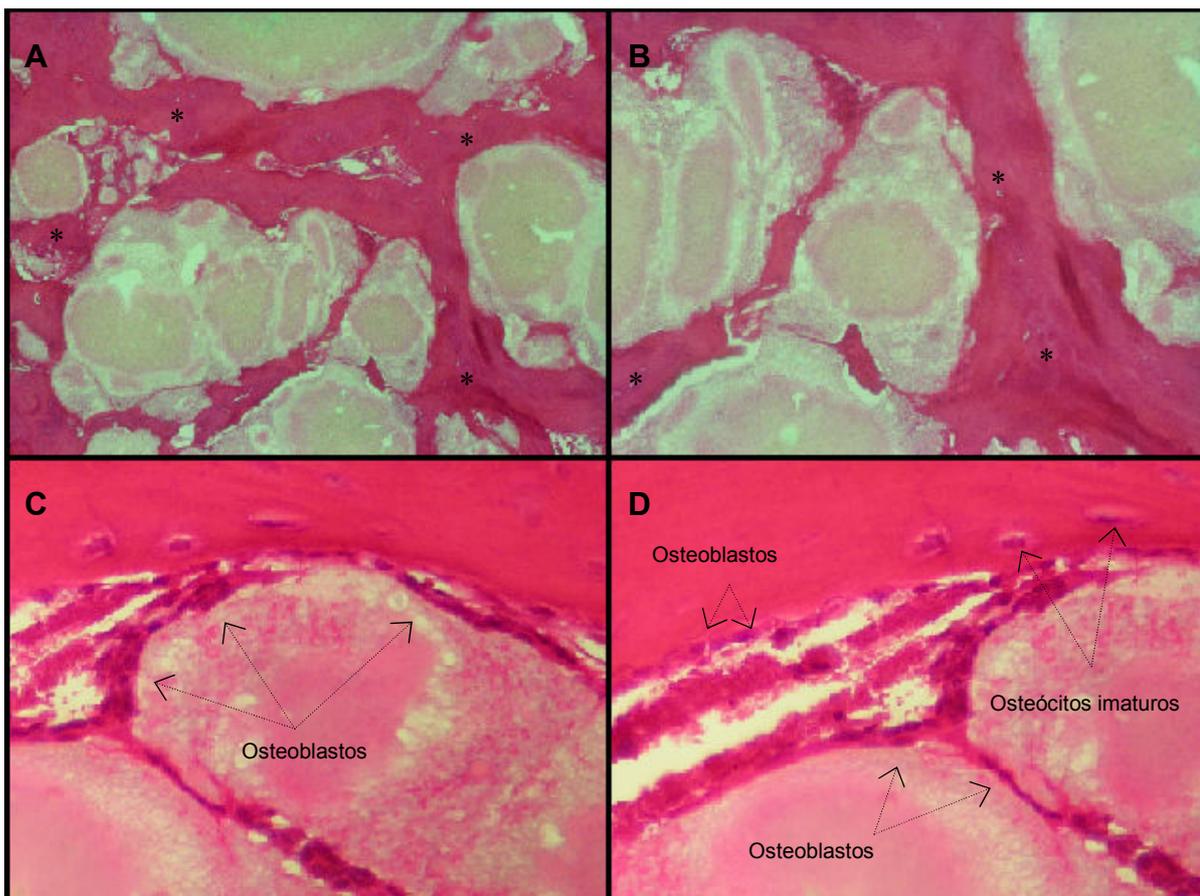


Figura 12 – Montagem das fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do G1 após 30 dias da realização dos defeitos ósseos: A - Notar o intenso crescimento ósseo por entre os poros do material (*). HE, 100X. B – Neoformação óssea (*). HE, 200X. C e D - Observar a presença de osteoblastos e osteócitos imaturos caracterizando processo de formação-maturação do tecido ósseo. HE, 400X.

5.1.3 Grupo 1 – 60 dias

Nos animais do grupo 1 – 60 dias, foi observado processo inflamatório leve, presença de fibroblastos irregularmente distribuídos e células em plena atividade da síntese de colágeno, que provavelmente servirá de base para a deposição óssea. Nota-se discreta quantidade de tecido conjuntivo fibroso na interface implante-osso rodeando alguns pequenos fragmentos do polímero. Nas margens e no interior do defeito observou-se uma grande área contendo tecido ósseo maduro, de aspecto lamelar, abundantes trabéculas e uma maior quantidade de poros preenchidos e interligados. Há ainda maior quantidade de osteócitos maduros e observa-se manutenção da atividade osteoblástica na matriz óssea neoformada (Figura 13).

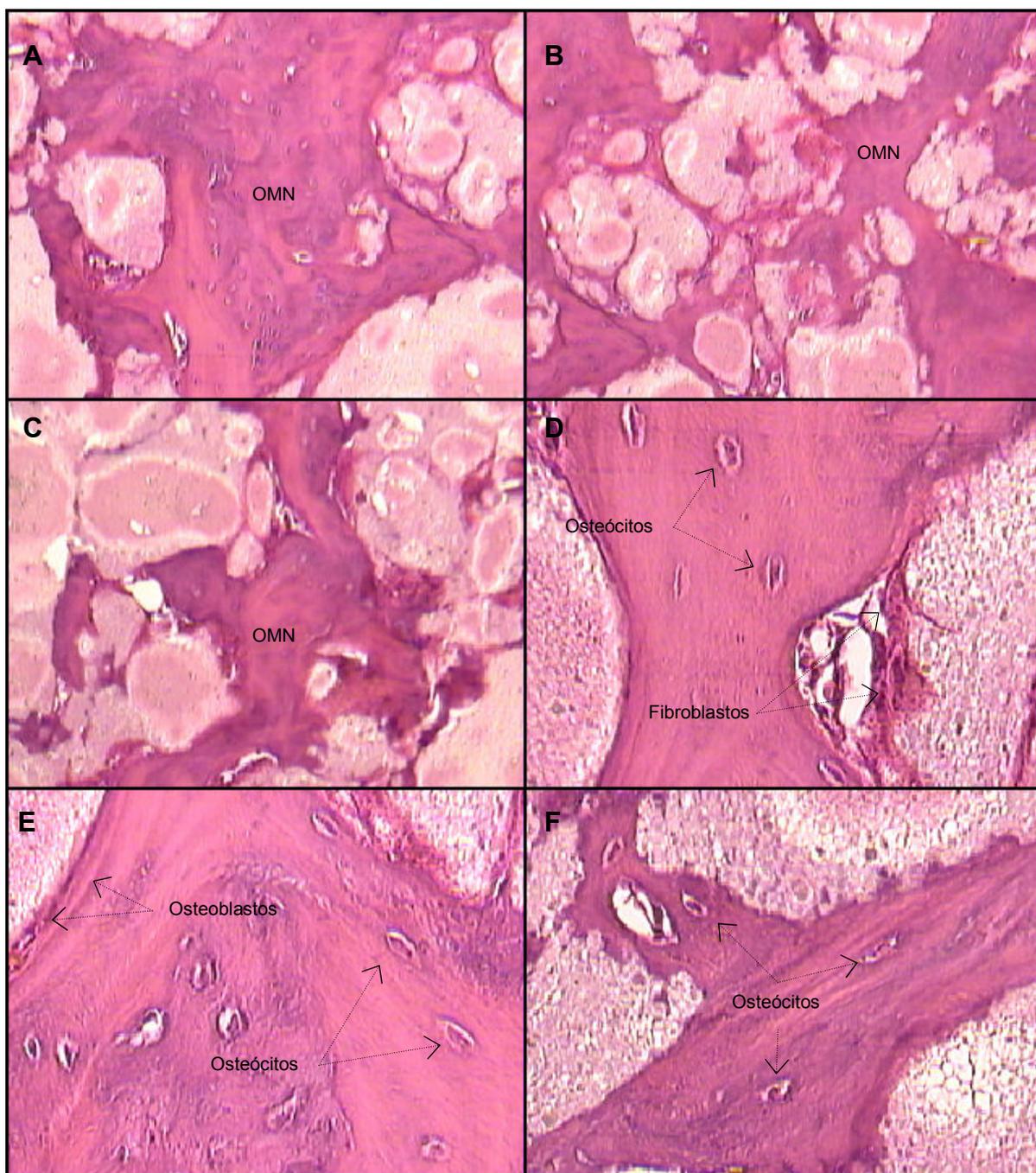


Figura 13 - Montagem das fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do grupo 1 após 60 dias da realização dos defeitos ósseos: A, B e C - observar a presença de osso maduro neoformado (OMN) invadindo e degradando o polímero de mamona. HE, 100X. D, E e F - observar a presença de fibroblastos, osteoblastos promovendo a neoformação óssea e intensa pavimentação osteocitária, caracterizando osso maduro, secundário. HE, 400X

Tabela 1 – Distribuição das médias das variáveis obtidas da análise histológica entre os diferentes períodos analisados para o Grupo 01(G1), 2009. (n = 03)

	15 dias	30 dias	60 dias	p	
Neoformação óssea	1,7±0,6	2,7±0,6	3,0±0,0	0,056	...
Fibroblastos	1,0±1,0	0,0±0,0	1,0±0,0	0,126	...
Pseudocápsula fibrosa	∅	∅	∅	-	-
Reação Inflamatória	1,0±1,0	0,0±0,0	0,7±0,6	0,276	...
Células Gigantes	0,3±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,741	...
Osteoblastos	2,0±0,0	2,0±1,0	2,3±0,6	0,739	...
Osteócitos	0,0±0,0	1,0±1,0	2,0±0,0	0,065	...
Osteoclastos	1,0±1,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,000	...

5.1.4 Grupo 2 – 15 dias

A avaliação histológica dos animais que receberam implante de polímero de mamona dopado com 5% de sílica mostrou que o material permaneceu encapsulado por tecido conjuntivo fibroso denso, com infiltrado inflamatório moderado, impedindo a neoformação óssea e proliferação celular para o interior do material. Observa-se que a cápsula fibrosa é rica em fibroblastos e fibras colágenas que, posteriormente podem ser gradativamente substituídas por tecido ósseo. Apesar da pseudocápsula fibrosa ao redor do implante, não foram observadas reações inflamatórias locais ou sistêmicas intensas durante o período de experimentação (Figura 14).

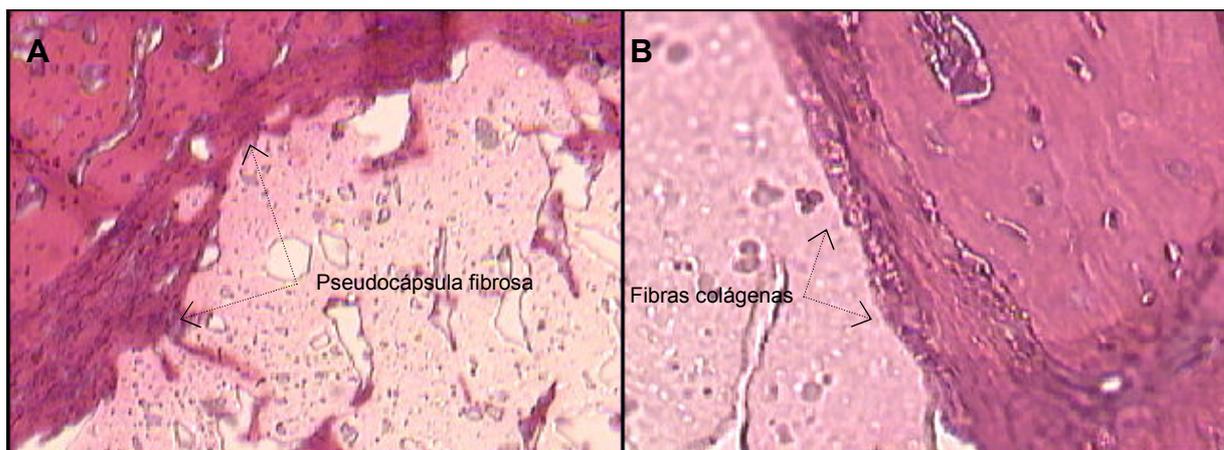


Figura 14 - Montagem das fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do grupo 2 após 15 dias da realização dos defeitos ósseos: A - observar a presença da pseudocápsula fibrosa envolvendo o polímero de mamona e poros sem preenchimento ósseo. HE, 100X. B - notar a intensa presença de fibras colágenas na interface osso-polímero. HE, 400X.

5.1.5 Grupo 2 – 30 dias

Aos 30 dias observa-se a ausência da pseudocápsula fibrosa que envolvia o polímero de mamona, redução do processo inflamatório e pouca presença de fibroblastos em meio ao leito ósseo. Nota-se a progressão da proliferação óssea com preenchimento de poros isolados e invasão de tecido ósseo e fibroso para o interior do polímero através de poros comunicantes. A presença moderada de macrófagos indica que o material está aos poucos sendo degradado e reabsorvido favorecendo a expansão óssea (Figura 15).

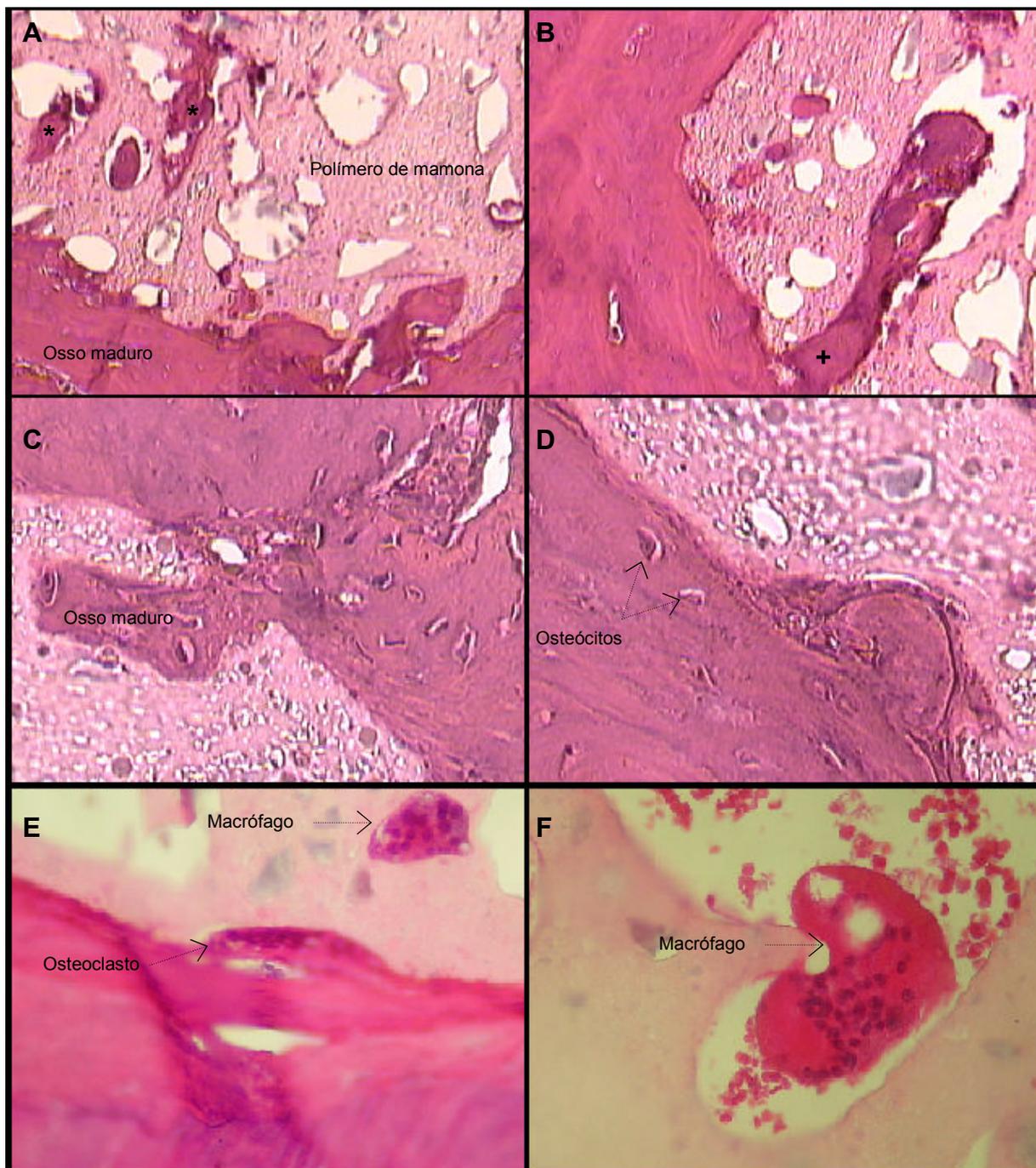


Figura 15 - Montagem das fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do grupo 2 após 30 dias da realização dos defeitos ósseos: A e B - observar a invasão óssea para o interior do material (+), o preenchimento de pequeno poros (*) e a ausência da pseudocápsula fibrosa envolvendo o polímero de mamona. HE, 100X. C e D - notar a presença de osteócitos e tecido ósseo maduro rodeando e penetrando no polímero. HE, 400X. E - Observar a presença de osteoclasto e macrófago. HE, 400X. F - célula gigante multinucleada (macrófago) erodindo o biomaterial. HE, 400X.

5.1.6 Grupo 2 – 60 dias

Aos 60 dias pode-se notar que alguns poros isolados encontram-se preenchidos por osso de aspecto trabecular, imaturo. Na interface osso-implante nota-se crescimento ósseo gradual com áreas de maior deposição óssea. Entretanto, observou-se redução da atividade das células gigantes que promovem a reabsorção do material, indicando a dificuldade de substituição do material por osso (Figura 16).

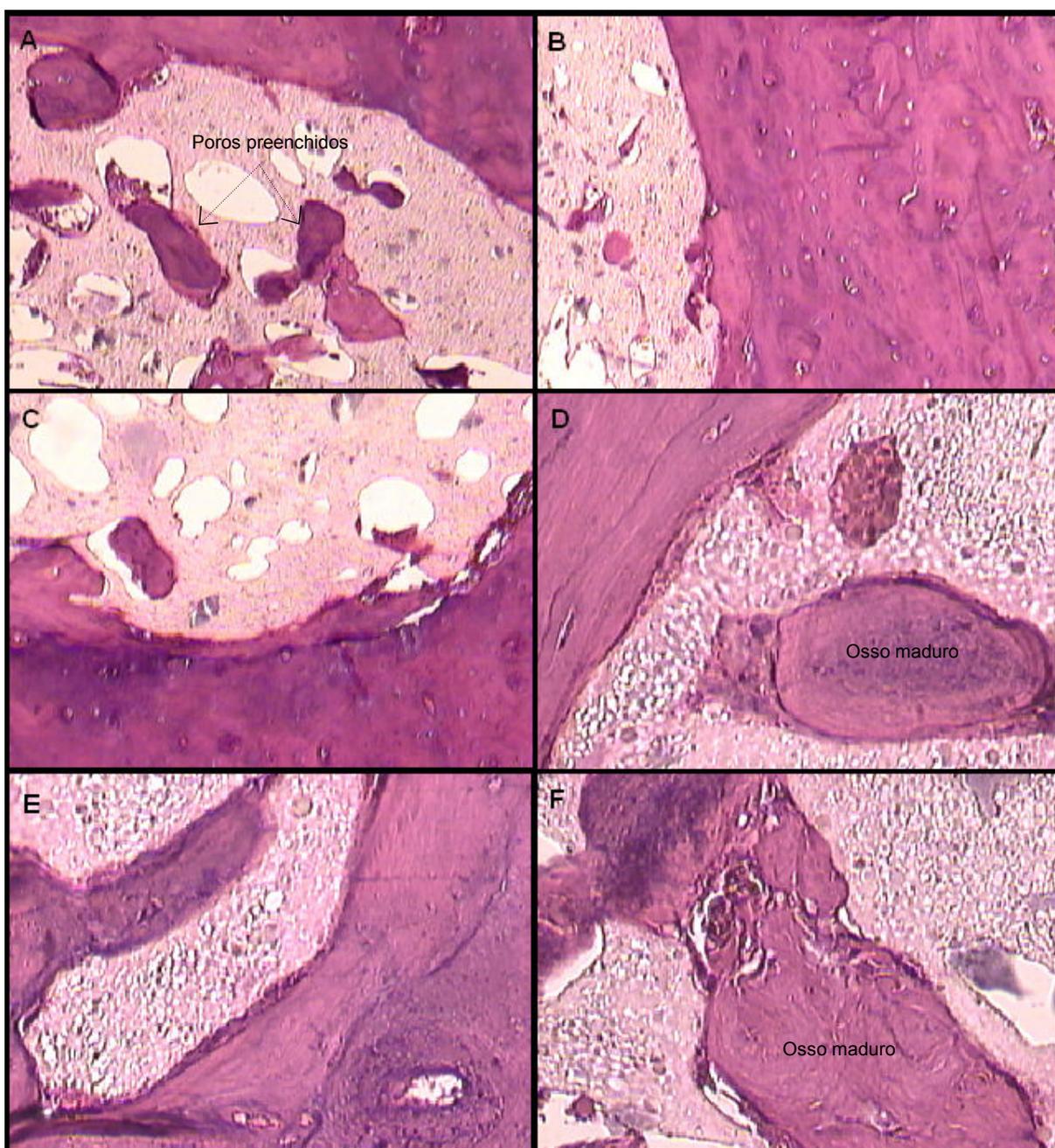


Figura 16 - Montagem das fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do grupo 2 após 60 dias da realização dos defeitos ósseos: A, B e C - observar o preenchimentos e invasão óssea para o interior dos poros isolados do material, e

áreas com maior crescimento ósseo. HE, 100X. D, E e F – observar a morfologia do tecido formado no interior do material com características de osso lamelar. HE, 400X.

Tabela 2 – Distribuição das médias das variáveis obtidas da análise histológica entre os diferentes períodos analisados para o Grupo 02(G2), 2009. (n = 03)

	15 dias	30 dias	60 dias	p	
Neoformação óssea	0,0±0,0	2,0±0,0	2,0±0,0	0,022*	15X30 (0,04) 15X60 (0,04)
Fibroblastos	3,0±0,0	1,0±1,0	1,0±0,0	0,047*	15X30 (0,04) 15X60 (0,04)
Pseudocápsula fibrosa	+	∅	∅	-	-
Reação Inflamatória	2,0±1,0	1,0±0,0	0,3±0,6	0,073	...
Células Gigantes	1,0±1,0	2,7±0,6	0,3±0,6	0,067	...
Osteoblastos	0,0±0,0	1,0±0,0	2,0±0,0	0,021*	15X60 (0,01)
Osteócitos	0,0±0,0	1,0±1,0	2,0±0,0	0,122	...
Osteoclastos	0,0±0,0	0,7±0,6	1,3±0,6	0,081	...

5.1.7 Grupo 3 – 15 dias

Nos animais do grupo 3 – 15 dias, observou-se moderado crescimento ósseo ao redor e no interior do implante, com atividade integrada dos osteoblastos, osteócitos e dos osteoclastos, orquestrando o processo de ativação-reabsorção-formação óssea. Foi observada pequena atividade fibroblástica produzindo a matriz colágena que precede a mineralização óssea. É possível notar uma discreta reação inflamatória e a ausência da pseudocápsula fibrosa envolvendo o implante (Figura 17).

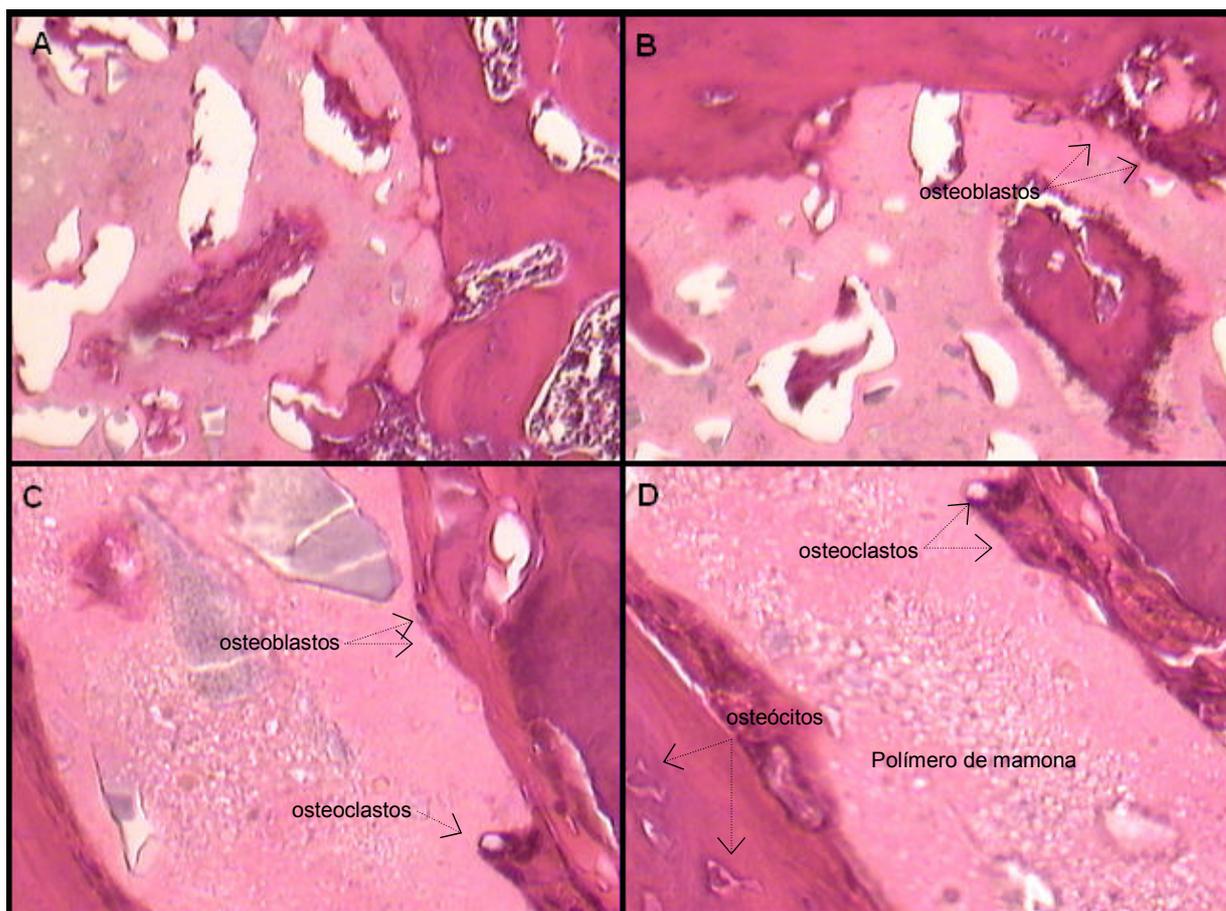


Figura 17 – Montagem de fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do G3 após 15 dias da realização dos defeitos ósseos: Notar a atividade celular e a presença de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos promovendo a ativação-reabsorção-formação de tecido ósseo sobre a poliuretana. A e B - HE, 100X; C e D – HE, 400X.

5.1.8 Grupo 3 – 30 dias

Os achados histológicos referentes ao grupo 3 no período de 30 dias são semelhantes aos observados aos 15 dias. Contudo, observou-se maior aposição de tecido ósseo neoformado nas margens do defeito ósseo com atividade osteogênica também no interior do material implantado. A contínua atividade fibroblástica e a deposição discreta de fibras colágenas no leito receptor antecipam a neoformação/maturação óssea. A reação inflamatória ainda persiste de maneira discreta e novamente pôde-se constatar a ausência de células gigante (Figura 18).

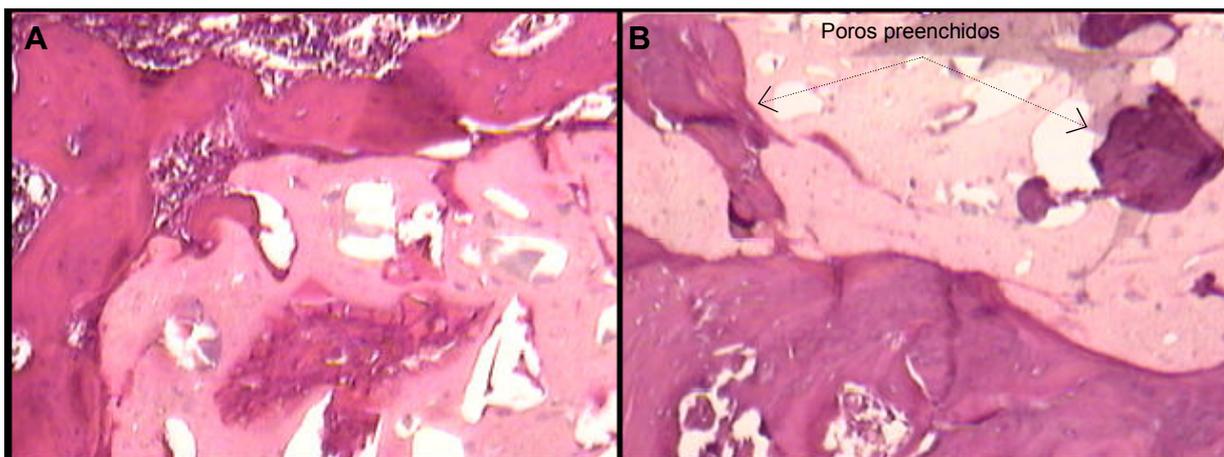


Figura 18 – Montagem das fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do G3 após 30 dias da realização dos defeitos ósseos: A e B - Notar a presença de poros preenchidos por tecido ósseo. HE, 100X.

5.1.9 Grupo 3 – 60 dias

Aos 60 dias observou-se discreta reação inflamatória e continuidade no processo de ativação-reabsorção-formação óssea, porém, a ausência de células gigantes atribui aos osteoclastos a função individual de reabsorção óssea. Os resultados histológicos destacam a presença e aumento gradual de células osteoprogenitoras nos três períodos analisados, característica esta encontrada somente no grupo onde o implante recebeu 10% de nanopartículas de sílica em sua estrutura, supondo que a cerâmica possui propriedades osteoindutoras (Figura 19).

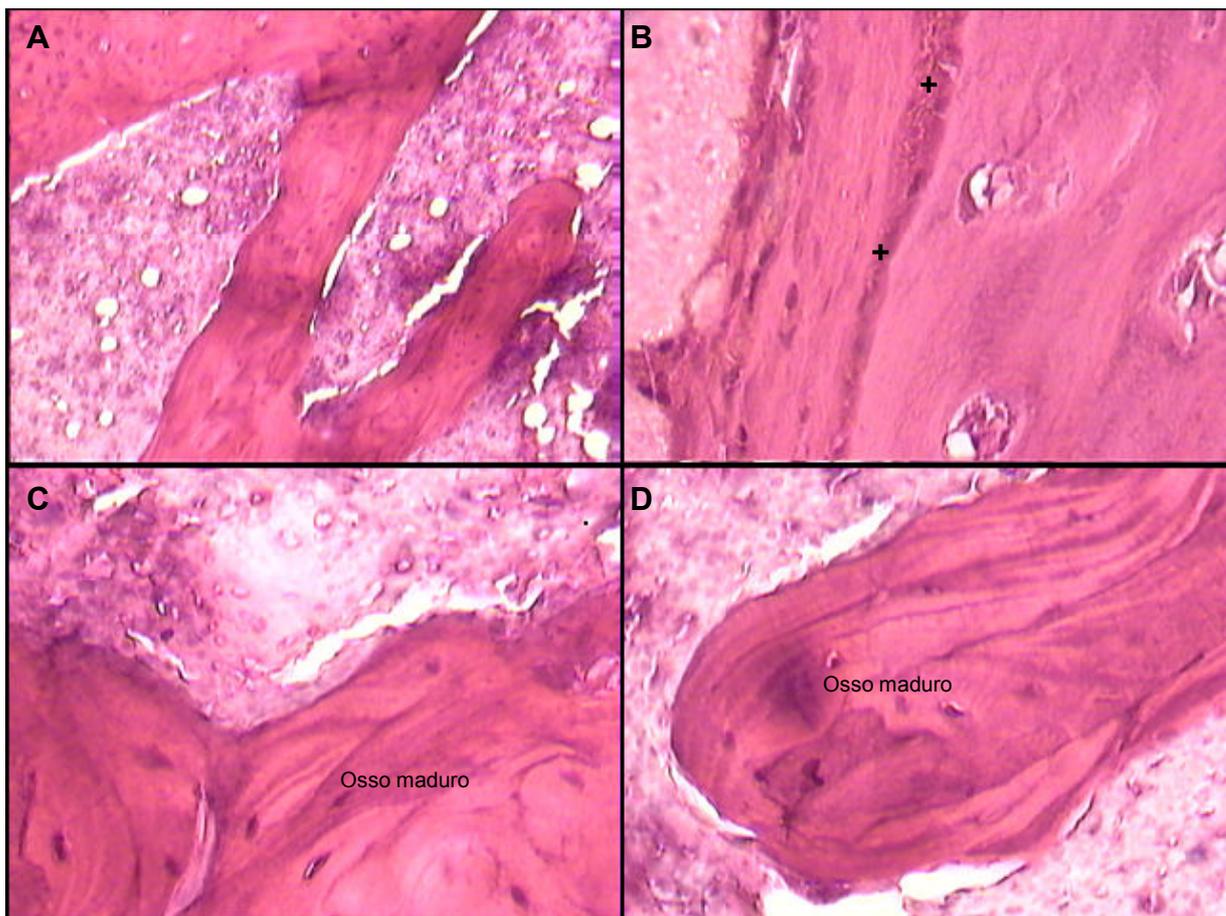


Figura 19 – Montagem das fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do G3 após 60 dias da realização dos defeitos ósseos: A - Notar abundante crescimento e invasão do tecido ósseo para interior do polímero. HE, 100X. B - interposição de fibras colágenas em diferenciação na interface polímero-osso (+). HE, 400X. C e D – Osso de aspecto lamelar no interior do polímero de mamona. HE, 400X.

Tabela 3 – Distribuição das médias das variáveis obtidas da análise histológica entre os diferentes períodos analisados para o Grupo 03(G3), 2009. (n = 03)

	15 dias	30 dias	60 dias	p	
Neoformação óssea	1,0±0,0	2,0±0,0	2,3±0,6	0,03*	15X60 (0,02)
Fibroblastos	1,3±0,6	1,3±0,6	2,0±0,0	0,201	...
Pseudocápsula fibrosa	∅	∅	∅	-	-
Reação Inflamatória	1,0±0,0	1,0±0,0	0,7±0,6	0,368	...
Células Gigantes	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	1,000	...
Osteoblastos	1,0±1,0	1,3±0,6	3,0±0,0	0,052	...
Osteócitos	0,3±0,6	1,0±0,0	2,3±0,6	0,033*	15X60 (0,01)
Osteoclastos	0,7±0,6	1,0±0,0	2,0±0,0	0,03*	15X60 (0,03)

5.1.10 Grupo 4 – 15 dias

Nos animais do grupo 4 no período de 15 dias, observou-se que o material implantado sofreu um pseudoencistamento de tecido conjuntivo fibroso denso, com presença discreta de infiltrado inflamatório. No entanto, não foram observadas reações do tipo corpo estranho mesmo com a formação da pseudocápsula fibrosa que englobou o implante. Houve discreta neoformação tecidual com preenchimento de alguns pequenos poros do polímero por estruturas acidófilas. Entre estas estruturas, observou-se áreas basófilas e fusiformes (núcleos celulares de fibroblastos) sugerindo a presença de células em plena atividade da síntese de proteínas (colágeno), que poderá ser a base para a deposição óssea (Figura 20).

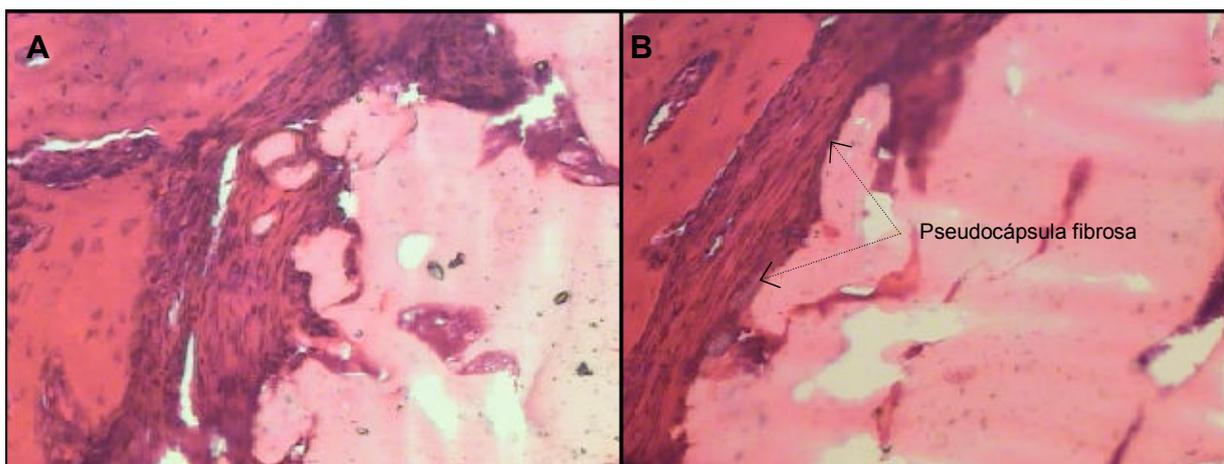


Figura 20 – Montagem das fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do G4 após 15 dias da realização dos defeitos ósseos: A e B - observar a presença da pseudocápsula fibrosa envolvendo o polímero de mamona e intensa presença de fibras colágenas na interface osso-polímero. A - HE, 100X; B - HE, 400X.

5.1.11 Grupo 4 – 30 dias

Aos 30 dias não foi observada a pseudocápsula de tecido fibroso como no subgrupo anterior, porém ainda persistiu discreto processo inflamatório com ausência de células gigantes. Nas margens do material observou-se a presença de tecido ósseo maduro que se infiltrava para o interior do polímero que apresentava ainda uma pequena quantidade de poros isolados preenchidos por tecido fibroso em diferenciação. O material encontrava-se bem adaptado e com osso neoformado em sua periferia e fibroblastos na interface dando continuidade ao processo de osteogênese (Figura 21).

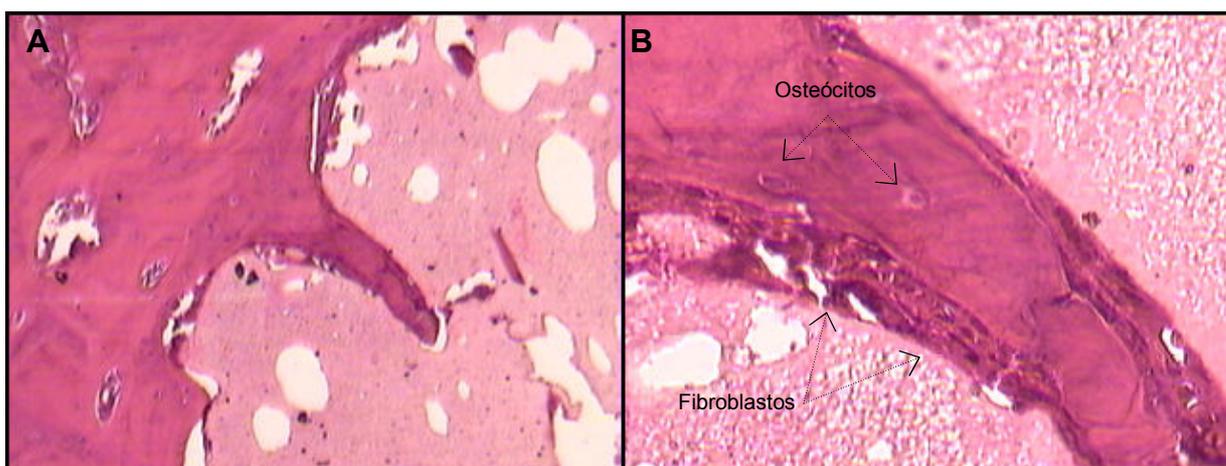


Figura 21 – Montagem das fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do G4 após 30 dias da realização dos defeitos ósseos: A e B - observar a presença de tecido ósseo maduro crescendo no interior do material com fibroblastos em diferenciação a frente do processo de neoformação óssea. A - HE, 100X; B - HE, 400X.

5.1.12 Grupo 4 – 60 dias

Os achados histológicos referentes ao grupo 4 no período de 60 dias evidenciam a presença moderada de neoformação óssea, com maior quantidade de poros preenchidos por osso de aspecto lamelar. Na interface osso-implante nota-se aposição de fibroblastos e células gigantes promovendo a degradação do material implantado, e crescimento ósseo gradual com áreas de maior deposição óssea. Entretanto, observou-se redução da atividade das células gigantes que promovem a reabsorção do material, indicando a dificuldade de substituição do material por osso (Figura 22).

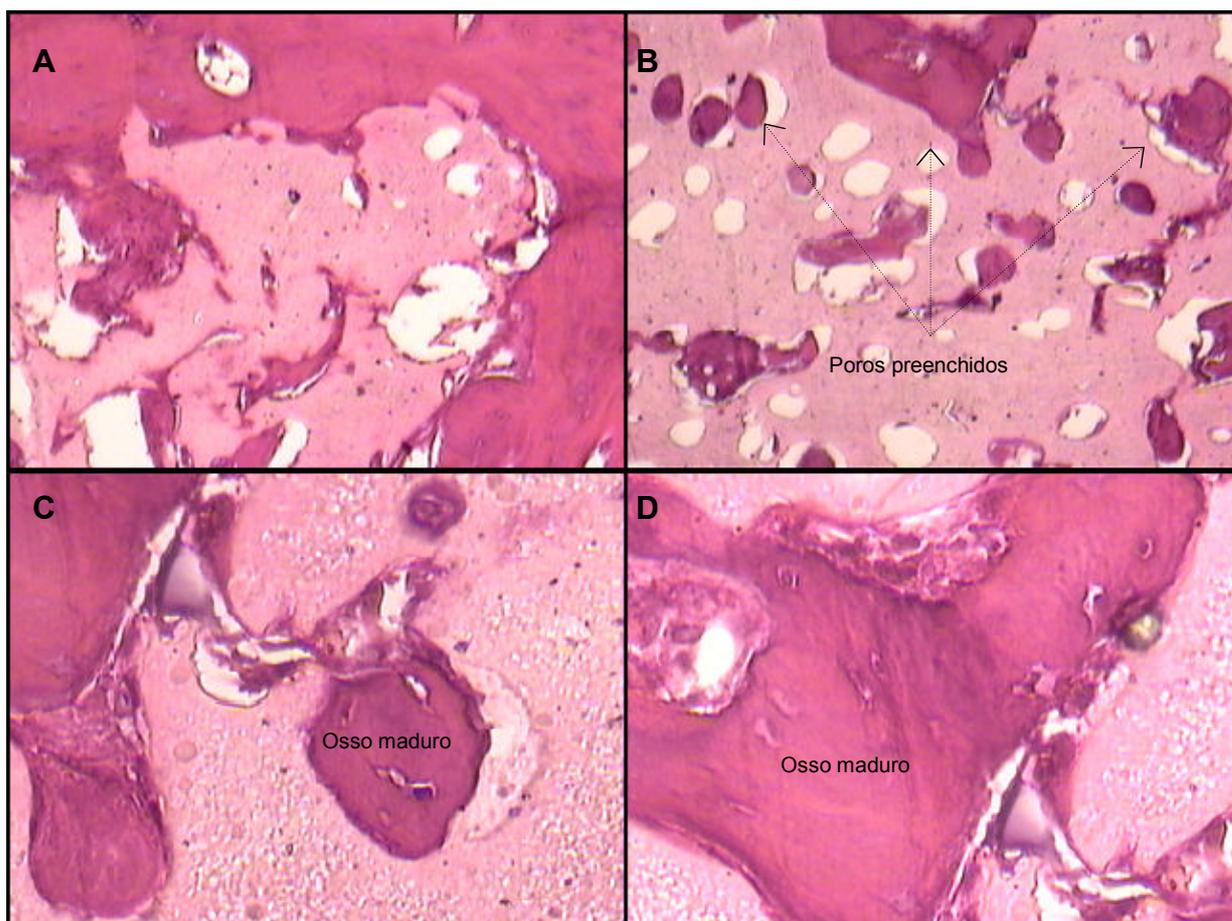


Figura 22 – Montagem das fotomicrografias das lâminas obtidas dos animais do G4 após 60 dias da realização dos defeitos ósseos: A e B – Notar a ocupação de osso neoformado preenchendo diversos poros do material de tamanhos diferentes. HE, 100X. C e D - Tecido ósseo maduro no interior do material. HE, 400X.

Tabela 4 – Distribuição das médias das variáveis obtidas da análise histológica entre os diferentes períodos analisados para o Grupo 04(G4), 2009. (n = 03)

	15 dias	30 dias	60 dias	p	
Neoformação óssea	0,3±0,6	1,7±0,6	2,0±0,0	0,046*	15X60 (0,03)
Fibroblastos	3,0±0,0	1,7±0,6	1,7±0,6	0,046*	15X30 (0,04) 15X60 (0,04)
Pseudocápsula fibrosa	+	∅	∅	-	-
Reação Inflamatória	2,0±1,0	0,3±0,6	1,0±0,0	0,073	...
Células Gigantes	0,0±0,0	0,0±0,0	1,0±0,0	0,061	...
Osteoblastos	0,3±0,6	1,7±0,6	2,0±0,0	0,046*	15X60(0,03)
Osteócitos	0,0±0,0	1,3±0,6	1,3±0,6	0,051	...
Osteoclastos	0,3±0,6	1,0±0,0	1,0±0,0	0,105	...

A quantificação individual de cada variável estudada histologicamente, e a comparação entre os grupos e períodos analisados estão representados nas tabelas 5 a 11.

Tabela 5 – Distribuição das médias da quantificação da presença de neoformação óssea para os grupos G1, G2, G3 e G4 entre os vários períodos analisados, 2009. (n = 12)

	G1	G2	G3	G4	p	
15 dias	1,7±0,6	0,0±0,0	1,0±0,0	0,3±0,6	0,044*	G1XG2(0,01)
30 dias	2,7±0,6	2,0±0,0	2,0±0,0	1,7±0,6	0,107	...
60 dias	3,0±0,0	2,0±0,0	2,3±0,6	2,0±0,0	0,041*	G1XG2(0,04) G1XG4(0,04)

Tabela 6 – Distribuição das médias da quantificação da presença de fibroblastos para os grupos G1, G2, G3 e G4 entre os vários períodos analisados, 2009. (n = 12)

	G1	G2	G3	G4	p	
15 dias	1,0±1,0	3,0±0,0	1,3±0,6	3,0±0,0	0,021*	G1XG2(0,03) G1XG4(0,03)
30 dias	0,0±0,0	1,0±1,0	1,3±0,6	1,7±0,6	0,103	...
60 dias	1,0±0,0	1,0±0,0	2,0±0,0	1,7±0,6	0,037*	G1XG3(0,04) G2XG3(0,04)

Tabela 7 – Distribuição das médias da quantificação da presença de reação inflamatória para os grupos G1, G2, G3 e G4 entre os vários períodos analisados, 2009. (n = 12)

	G1	G2	G3	G4	p	
15 dias	1,0±1,0	2,0±1,0	1,0±0,0	2,0±1,0	0,305	...
30 dias	0,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	0,3±0,6	0,052	...
60 dias	0,7±0,6	0,3±0,6	0,7±0,6	1,0±0,0	0,455	...

Tabela 8 – Distribuição das médias da quantificação da presença de células gigantes para os grupos G1, G2, G3 e G4 entre os vários períodos analisados, 2009. (n = 12)

	G1	G2	G3	G4	p	
15 dias	0,3±0,6	1,0±1,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,438	...
30 dias	0,0±0,0	2,7±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,099	...
60 dias	0,0±0,0	0,3±0,6	0,0±0,0	1,0±0,0	0,125	...

Tabela 9 – Distribuição das médias da quantificação de osteoblastos para os grupos G1, G2, G3 e G4 entre os vários períodos analisados, 2009. (n = 12)

	G1	G2	G3	G4	p	
15 dias	2,0±0,0	0,0±0,0	1,0±1,0	0,3±0,6	0,079	...
30 dias	2,0±1,0	1,0±0,0	1,3±0,6	1,7±0,6	0,306	...
60 dias	2,3±0,6	2,0±0,0	3,0±0,0	2,0±0,0	0,041*	G2XG3(0,04) G3XG4(0,04)

Tabela 10 – Distribuição das médias da quantificação da presença de osteócitos para os grupos G1, G2, G3 e G4 entre os vários períodos analisados, 2009. (n = 12)

	G1	G2	G3	G4	p	
15 dias	0,0±0,0	0,0±0,0	0,3±0,6	0,0±0,0	0,819	...
30 dias	1,0±1,0	1,0±1,0	1,0±0,0	1,3±0,6	0,911	...
60 dias	2,0±0,0	2,0±0,0	2,3±0,6	1,3±0,6	0,117	...

Tabela 11 – Distribuição das médias da quantificação de osteoclastos para os grupos G1, G2, G3 e G4 entre os vários períodos analisados, 2009. (n = 12)

	G1	G2	G3	G4	p	
15 dias	1,0±1,0	0,0±0,0	0,7±0,6	0,3±0,6	0,41	...
30 dias	1,0±0,0	0,7±0,6	1,0±0,0	1,0±0,0	0,392	...
60 dias	1,0±0,0	1,3±0,6	2,0±0,0	1,0±0,0	0,012*	G1XG3(0,04) G2XG3(0,04) G3XG4(0,04)

5.2 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura

As modificações morfológicas e estruturais do polímero de mamona, o grau de orientação e a distribuição em nível microestrutural dos poros e da rugosidade do material estão representados na figura 23.

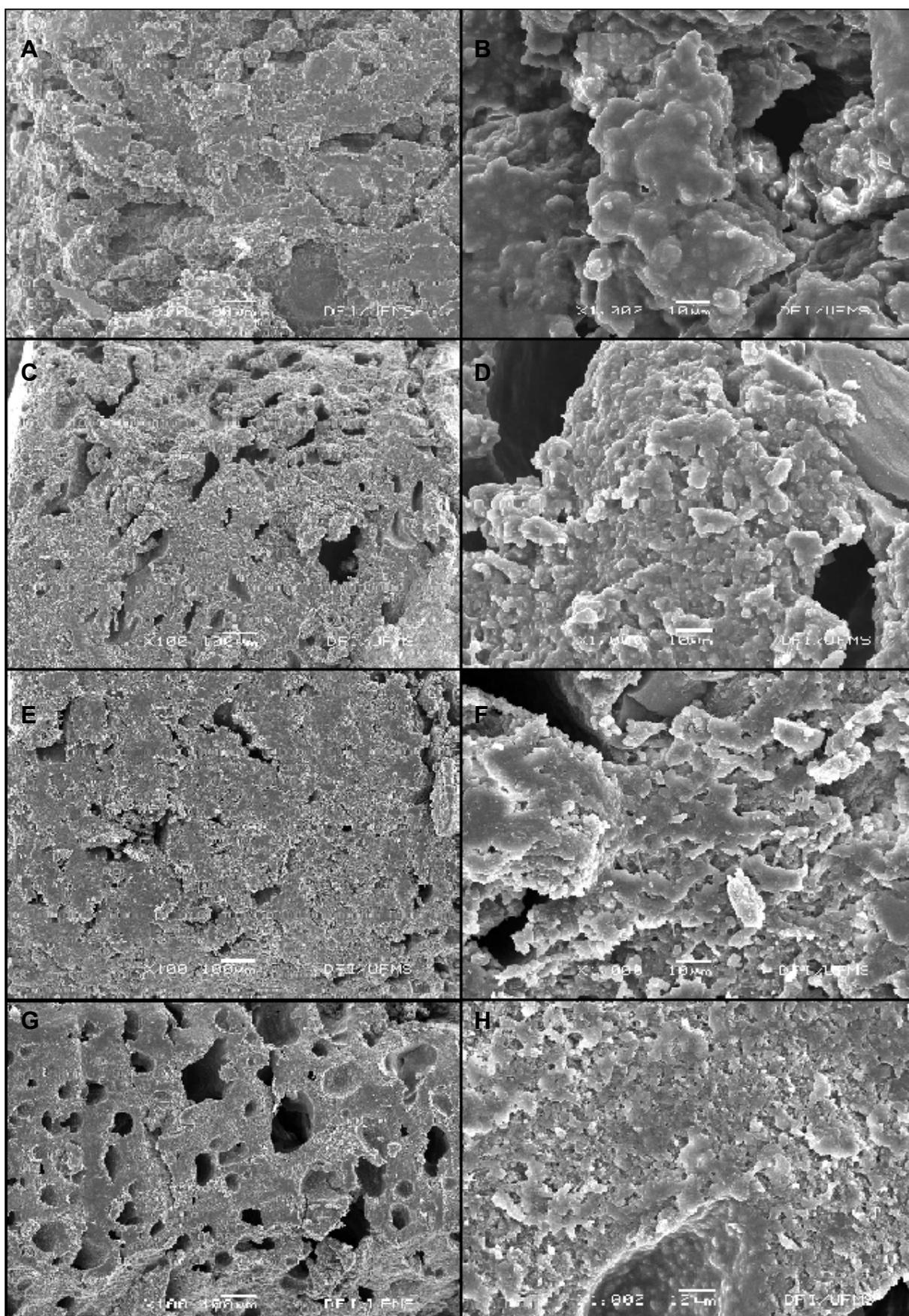


Figura 23 – Montagem de fotomicrografia típica de MEV obtida do polímero de mamona não implantado. A e B – Polímero de mamona sem dopante. Notar a superfície irregular, assimétrica e rugosa. C e D - Polímero de mamona

correspondente ao G2. Superfície densa, com pequenas saliências e reentrâncias (poros) morfológicamente mais regulares que o grupo anterior. E e F - Polímero de mamona correspondente ao G3. Superfície menos porosa, pouco rugosa e com pequenos poros irregulares distantes uns dos outros. G e H - Polímero de mamona correspondente ao G4. Superfície menos rugosa, com poros regulares, próximos e de diferentes diâmetros.

As imagens obtidas do polímero de mamona pré-implantado através da MEV revelaram importantes diferenças morfológicas entre os diferentes grupos estudados.

O polímero de mamona acrescido apenas de carbonato de cálcio, que corresponde ao grupo 1 apresentou estrutura bastante rugosa, irregular, apresentando proeminências e sulcos de tamanhos variados e que podem ter favorecido a agregação de tecido ósseo ao material.

O aspecto estrutural do polímero de mamona correspondente ao G2 caracteriza-se por apresentar pequenas saliências e reentrâncias em sua superfície densa, pouco rugosa e morfológicamente mais regular que o material implantado nos animais do G1.

Já o polímero de mamona acrescido de carbonato de cálcio e com 10% de sílica mostrou-se morfológicamente semelhante ao material implantado nos animais do grupo 2, apresentando em sua superfície pequenas irregularidades microgeométricas, que configuram um padrão estrutural com pouca rugosidade e com poros menores e irregulares, distantes uns dos outros.

A superfície do polímero de mamona correspondente ao G4 tem como características principais, pouca rugosidade, caracterizando-se por ser morfológicamente mais liso e regular, e poros concêntricos, regulares e de diferentes diâmetros.

6 DISCUSSÃO

O conhecimento dos fatores que determinam a biocompatibilidade de um material pode contribuir significativamente para desvendar os mecanismos de interação entre o tecido vivo e o implante, possibilitando o desenvolvimento e o aumento da vida útil dos biomateriais, e a criação de bases para a escolha de materiais adequados para cada caso (KAWACHI *et al.*, 2000).

A pesquisa envolvendo polímeros biodegradáveis apresenta horizonte bastante amplo, uma vez que é possível trabalhar o desenho molecular destes biomateriais visando alterar as suas propriedades físicas. Assim, um mesmo polímero pode ser produzido com a rigidez necessária para compor um dispositivo de osteossíntese ou com a porosidade exigida para constituir membranas coadjuvantes do preenchimento de falhas ósseas (KFURI JR *et al.*, 2001).

No presente estudo, a produção da biomassa de poliuretana e a confecção de blocos pré-fabricados padronizados permitiram o encaixe e a adaptação do material na falha óssea produzida, sem expansão e conseqüente aumento de volume. Entretanto, a manipulação do polímero sem a adição dos dopantes teve de ser mais cautelosa, pois o mesmo dissolvia-se, fragmentava-se com maior facilidade, dificultando assim a sua implantação no sítio receptor. Além disso, durante o processo de polimerização da poliuretana de mamona ocorre uma reação exotérmica. Embora esta reação exotérmica seja relativamente baixa, entre 42 e 45°C (JACQUES *et al.*, 2004), optamos por utilizar o polímero na forma de blocos para não correr o risco de haver queimaduras nos tecidos adjacentes ao implante.

Resultados semelhantes relacionados à forma de apresentação do polímero implantado, em blocos pré-polimerizados, foram encontrados por diversos autores, que demonstraram que o material permitia ser modelado conforme o fragmento ósseo removido, sendo facilmente integrado ao leito receptor (IGNÁCIO *et al.*, 1997; FIGUEIREDO *et al.*, 2001; KFURI JR *et al.*, 2001; LEONEL *et al.*, 2003; MARIA *et al.*, 2003; LEONEL *et al.*, 2004; MARIA *et al.*, 2004; BOLSON *et al.*, 2005; FRAZILIO *et al.*, 2006; MENDONÇA *et al.*, 2006).

A escolha dos animais de experimentação baseou-se no fato de que estes animais permitem a obtenção de quantidades representativas de tecido para os mais variados procedimentos, possibilitando a padronização do experimento. Os ratos

melhor representam o sistema mamífero, são de fácil manipulação em razão de sua docilidade, apresentam um custo relativamente baixo e requerem menor espaço para manutenção, são animais de rápida obtenção, uma vez que apresentam curto período de procriação e permitem um bom controle genético eliminando fatores como deficiências imunes (CONEGLIAN, 2007).

Contudo, Hammerle *et al.* (1996) ponderam que a transposição dos efeitos obtidos em modelos experimentais realizados em animais deve ser feita com precaução, considerando-se as diferenças morfofisiológicas destes animais com humanos. Moretton *et al.* (2000), afirmam que o metabolismo do rato é extremamente acelerado quando comparado ao dos seres humanos, sendo que um mês de vida do rato corresponde a 30 meses em humanos.

No que se refere à biocompatibilidade, o óleo de mamona é um triglicerídeo de um ácido graxo, com aproximadamente 90% do ácido ricinoléico cuja estrutura molecular é semelhante aos ácidos graxos presentes no corpo humano, a presença de quantidades previamente balanceadas e calculadas de cadeias uretanas no polímero de mamona atraem o cálcio orgânico e substituem o cálcio inorgânico no processo de interação óssea (MENDONÇA *et al.*, 2006).

Neste estudo observamos grande aceitação orgânica do polímero de mamona implantado, não havendo sinais de foco inflamatório importante e nenhuma reação granulomatosa tipo corpo estranho, demonstrando assim, que o material é biocompatível e possui certo grau de osteointegração.

Ignácio *et al.* (2002), concluíram que o polímero de mamona foi biocompatível, porém comportou-se como um espaçador biológico, preenchendo uma cavidade e permanecendo biotolerante ao longo do tempo. Os autores observaram ainda a presença de uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso que se interpunha ao redor dos implantes, tanto porosos quanto compactos, na interface osso-polímero, em todos os períodos analisados.

A presença de tecido conjuntivo fibroso ao redor do implante, formando uma pseudocápsula que envolvia o material, foi evidenciada nos animais dos grupos 2 e 4 apenas no período inicial de avaliação (15 dias), característica natural desta fase de regeneração.

O tecido conjuntivo denso encontrado ao redor do polímero de mamona nos períodos iniciais de observação não deve ser confundido com aquele tecido fibroso responsável por isolar corpos não biocompatíveis. A principal diferença entre estes

dois tecidos reside em suas morfologias, sendo que a cápsula fibrosa é constituída exclusivamente por fibras colágenas, enquanto que o tecido conjuntivo denso, semelhante ao encontrado neste estudo, possui em sua composição tanto fibras colágenas como uma grande população celular, que posteriormente poderão se diferenciar em células osteoprogenitoras (LEONEL *et al.*, 2004).

Maria *et al.* (2003) verificaram inicialmente uma camada conjuntiva fibrosa ao redor do implante, porém, aos 40 dias, este tecido transformou-se em osso, com abundantes osteoblastos e trabéculas ósseas neoformadas que preencheram as porosidades da poliuretana.

Leonel *et al.* (2004) constataram com 15 e 30 dias de observação a presença de tecido conjuntivo denso ao redor do polímero de mamona, que promovia a continuidade do tecido ósseo no leito receptor e que preenchia vários poros do material. O tecido neoformado constituía-se por fibras colágenas, fibroblastos, capilares sangüíneos e alguns macrófagos, sem associação com células inflamatórias.

O encistamento do polímero de mamona implantado na mandíbula de ratos por tecido conectivo fibroso também foi encontrado por Leite *et al.* (2008) nos períodos iniciais de observação. De acordo com os autores, as fibras de colágeno que rodeavam o material estavam em processo de maturação, alterando-se a gradativamente a sua forma estrutural para lamelas de matriz óssea orgânica.

A presença de tecido conjuntivo fibroso na interface osso-polímero, com ou sem regiões estabelecendo contato direto do tecido ósseo com o implante, também pode ser observada em diversos estudos por vários autores (IGNÁCIO *et al.*, 1997; CALIXTO *et al.*, 2001; FIGUEIREDO *et al.*, 2001; LEONEL *et al.*, 2004; MARIA *et al.*, 2004; PEREIRA JUNIOR, 2005; FRAZILIO *et al.*, 2006; MENDONÇA *et al.*, 2006).

Em nossos achados, a presença de células típicas de processo inflamatório foi observada em pequena quantidade em todos os grupos e períodos analisados, não havendo diferença estatística significativa na comparação entre os grupos e os períodos analisados.

Células gigantes, especialmente os macrófagos, foram pouco encontradas neste estudo, no entanto, apenas os animais do G2 apresentavam estas células próximas a fragmentos do polímero de mamona em todos os períodos analisados.

Chierici (1994) sugeriu através de observações de estudos citoquímicos, que o polímero de mamona é identificado pelo organismo como sendo um lipídio. Isto

implicaria em um processo enzimático que não requer a participação e conseqüentemente, a presença de células gigantes geradas por um processo inflamatório, constituindo-se em uma resposta tecidual indesejada no processo de regeneração dos tecidos.

Entretanto, Leonel *et al.* (2004) afirmam que os macrófagos são capazes de liberar substâncias que fazem com que células mesenquimais se acumulem e proliferem no local do defeito, sendo portanto, úteis na degradação do material implantado.

Para Sassioto *et al.* (2004), a ocorrência de reação inflamatória fisiológica associada à presença de células gigantes multinucleadas em função da presença de um biomaterial implantado é desencadeada em qualquer situação que exija cicatrização.

Já Coneglian (2007) afirma que os macrófagos são os principais responsáveis pela digestão e remoção dos detritos celulares e da fibrina coagulada, pois liberam citocinas e fatores de crescimento que, posteriormente, promoverão migração, proliferação e diferenciação das células osteoprogenitoras.

No presente estudo o processo de neoformação óssea ocorreu gradativamente, e fez-se de forma centrípeta, ou seja, da periferia para o centro da cavidade preenchida pelo polímero de mamona, em todos os grupos estudados.

De forma geral, observamos, através da análise histológica, que todos os materiais testados influenciaram positivamente na neoformação óssea dos defeitos. Em todos os grupos experimentais, a osteocondução foi a via principal para a regeneração óssea.

Segundo Yoshikawa & Myoui (2005), o princípio fundamental para o desenvolvimento de biomateriais utilizados em reparo do tecido ósseo é capacidade osteocondutora com interconexão porosa em combinação com partículas com potencial osteogênico e osteoindutor.

O biomaterial osteocondutivo promove aposição de tecido ósseo em sua superfície, funcionando, em parte, como um arcabouço receptivo que facilita a formação óssea (Bauer & Smith, 2002). Para Greenwald *et al.* (2001), a osteocondução é uma facilitação da incursão de vasos sangüíneos e osso neoformado para dentro de um arcabouço que deve fornecer, principalmente, um substrato no qual células osteoblásticas possam crescer, se diferenciar e depositar matriz óssea extra-celular.

A porosidade em suportes poliméricos pode modular as taxas de adesão e proliferação celular, pois os poros representam um aumento na superfície de contato para com as células e ainda, servem como uma matriz artificial temporária até que as células sintetizem a sua própria (KOSE *et al.*, 2003).

Segundo Holmes *et al.* (1986) e Yoshikawa & Myoui (2005), a presença de poros com interconexões e estrutura química semelhante à do tecido ósseo são fatores importantes do implante para permitir a osteocondução e posterior osteointegração, a interconexão porosa na estrutura do material de implante é essencial para a introdução de células ósseas entre os poros favorecendo o crescimento do tecido ósseo no interior do biomaterial.

Gauthier *et al.* (1998), constataram que o percentual de macroporosidade e o diâmetro dos poros são características ideais para a proliferação de osteoblastos sobre a superfície de diferentes biocerâmicas. Segundo os autores, poros variando de 300µm à 540µm possibilitaram crescimento ósseo, porém melhor desempenho foi observado nos poros de maior diâmetro.

Contudo, Kawachi *et al.* (2000) afirmam que para que um biomaterial seja considerado macroporoso é necessário que ele apresente poros da ordem do diâmetro Harvesiano (50 a 250 µm), e ponderam que apesar do aumento da porosidade diminuir a resistência mecânica do material isoladamente, a existência de poros com dimensões adequadas pode favorecer o crescimento de tecido através deles, fazendo com que ocorra um forte entrelaçamento do tecido com o implante, aumentando, por conseguinte, a resistência do material *in vivo*.

O polímero de mamona acrescido apenas de carbonato de cálcio apresentou ao final do período estudado (60 dias) uma extensa área contendo tecido ósseo de aspecto lamelar e uma grande quantidade de poros interligados ocupados por osso maduro. A manutenção da atividade osteoblástica na matriz óssea neoformada no interior do material e a grande quantidade de osteócitos maduros depositados nesta matriz tipificam o padrão lamelar característico do osso secundário encontrado permeando os poros do polímero de mamona.

O sucesso do ponto de vista biológico do polímero de mamona contendo em 10% de sílica em sua composição pode ser atribuído ao fato de que esta biocerâmica possui além de propriedades indutoras, capacidade de promover erros microgeométricos que possibilitaram a grande rugosidade observada por meio da

MEV. Aspectos estes não foram encontrados no grupo contendo menor quantidade de sílica (5%).

Albrektsson & Johansson (2001) definem osteoindução como capacidade do material estimular células mesenquimais pluripotentes indiferenciadas a se diferenciarem em uma linhagem de células formadoras de tecido ósseo, ou seja, é o processo pelo qual osteogênica é induzida.

Para Borum (2003) e Andrade & Domingues (2006), a Sílica tem papel fundamental em certos vidros bioativos, pois desempenha função importante na biomineralização de muitos organismos, sendo a ela atribuída a capacidade de indução de células osteoprogenitoras para o local da lesão.

Em nosso estudo, a presença de células osteogênicas foi predominantemente maior nos animais que receberam implante de polímero de mamona contendo 10% de sílica em sua composição. Durante todos os períodos avaliados observou-se maior número de fibroblastos, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos ao redor e no interior do implante quando comparado aos demais grupos.

De acordo com Lee *et al.* (2004) e Lossdorfer (2004), a interação da sílica com organismos vivos ocorre inicialmente com uma troca de íons com concomitante dissolução do dióxido de silício. Posteriormente, inicia a formação de um gel de silício que serve como núcleo para a formação de uma camada de fosfato de cálcio (CaP). Essa camada cristaliza em uma estrutura de apatita, onde colágeno, sulfato de condroitina e glicosaminoglicanos do microambiente local são incorporados por essa camada crescente, o que produz uma ligação mecânica muito forte entre o material implantado e o tecido do hospedeiro.

Diversos estudos sugerem que a ligação do colágeno ao gel de silício ocorre muito rapidamente, sendo esse um dos fatores importantes para a bioatividade destas cerâmica (HENCH & WILSON, 1984; SHAPOFF *et al.*, 1997; KARATZAS *et al.*, 1999; SILVER *et al.*, 2001; LOSSDÖRFER, 2004).

Apesar das controvérsias a respeito da capacidade osteoindutora, estudos indicam grande eficácia de utilização das biocerâmicas no tratamento de vários defeitos ósseos, mesmo conhecendo-se apenas partes dos mecanismos pelos quais elas atuam (Zaffe, 2005).

No presente estudo, o polímero de mamona foi analisado quanto a sua morfologia por microscopia eletrônica de varredura. O material correspondente ao grupo 1 mostrou superfície bastante rugosa, irregular, com saliências e reentrâncias

que sugerem que a adesão e o crescimento do tecido ósseo dependem da rugosidade da superfície. Resultado semelhante, porém menos significativo, foi encontrado na estrutura do material dopado com 10% de sílica, que apresentou em sua superfície proeminências e sulcos de tamanhos variados que, associada à capacidade osteoindutora da cerâmica podem ter favorecido a agregação celular e a neoformação óssea na interface osso-implante.

Segundo Bowers (1992), propriedades como porosidade e rugosidade tornam a superfície dos implantes capazes de otimizar o crescimento ósseo e elevar a resistência na interface implante-osso.

A interação e agregação das células e tecidos com o implante é afetada pela topografia do material tanto em níveis macroscópicos (HALLAB *et al.*, 2001) como nanométricos (CHUN *et al.*, 2009), portanto, espera-se que com o aumento da área superficial do implante, aumente o número de sítios para as células se ligarem, facilite o crescimento dos tecidos e aumente a estabilidade mecânica (KOKUBO, 1990, MA *et al.*, 2007). No entanto, os fibroblastos parecem evitar as superfícies rugosas, e se acumulam em regiões mais lisas. Em contrapartida, macrófagos exibem rugofilia, ou seja, preferem superfícies rugosas. As células epiteliais são mais atraídas por superfícies rugosas do que por superfícies lisas, assim como células osteoblásticas aderem com maior facilidade a superfícies rugosas do que em superfícies polidas (BOWERS, 1992; MUSTAFA *et al.*, 2001; NASATZKY *et al.*, 2003).

Diversos métodos de modificação de superfícies para permitir a fixação permanente de implantes sem cementação tem sido desenvolvidos com o objetivo de otimizar o crescimento ósseo com consequente fixação implante-osso. Segundo Silva *et al.* (2005), propriedades como porosidade e rugosidade tornam a superfície dos implantes capazes de atingir tais objetivos.

Na bioengenharia ou engenharia de tecidos, destaque tem sido dado às cerâmicas microporosas, também denominadas de cerâmicas de baixa densidade, por apresentarem arquitetura microestrutural com elevada superfície de área que serve de arcabouço para a formação e regeneração do tecido ósseo (BELLINI, 2007).

Atualmente, o desenvolvimento de nanocompósitos cerâmicos tem sido amplamente estudado (PEREIRA *et al.*, 1999; CAMPOS, 2005; GOMIDE *et al.*, 2005; PIERRI *et al.*, 2005; ANDRADE & DOMINGUES, 2006; DOURADO, 2006;

LEE *et al.*, 2006;) no sentido de oferecer uma alternativa de tratamento de biocerâmicas porosas que associem elevada resistência mecânica à bioatividade e capacidade de osteocondução e osteoindução. A síntese de uma nova geração de biomateriais compósitos pode evoluir consideravelmente até a criação de materiais que contemplem as características necessárias para a obtenção de um substituto ósseo ideal (EL-GHANNAM, 2005).

Modificações importantes na morfologia e estrutura do polímero de mamona associado com nanopartículas de sílica e zircônia como rugosidade e porosidade foram observadas neste estudo.

A microestrutura da amostra do polímero de mamona dopado com 5% de ZrO_2 , correspondente ao grupo 4, apresentou certo grau de polimento, com pouca rugosidade, poros concêntricos e de diferentes diâmetros, caracterizando-se por ser morfologicamente liso e mais regular, propriedade importante nas cerâmicas com bons valores de tenacidade à fratura e resistência à flexão.

Segundo Santos *et al.* (2007), as propriedades mecânicas de materiais cerâmicos dependem do tamanho e distribuição de defeitos microestruturais na forma de trincas, porosidades e impurezas, ou seja, quanto maior o tamanho do defeito na superfície ou no interior do cerâmico, menor a tenacidade e maior a probabilidade de fratura. A existência de defeitos na forma de microtrincas e microporosidades é responsável pela fratura dos cerâmicos, mesmo em baixos níveis de tensões (MORAES *et al.*, 2004).

As principais vantagens dos materiais dopados com zircônia são os elevados valores de resistência mecânica e tenacidade à fratura, os quais são obtidos devido a transformação de fase da zircônia, de tetragonal para fase monoclinica (SANTOS *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2008). Todavia, a resistência mecânica de um material, depende fortemente da microestrutura final do corpo, a qual deverá ser biocompatível e capaz de permitir osteocondução.

A síntese de uma nova geração de biomateriais compósitos pode evoluir consideravelmente até a criação de materiais que contemplem as características necessárias para a obtenção de um substituto ósseo ideal (EL-GHANNAM, 2005).

Sendo assim, os requisitos necessários para o desenvolvimento de um arcabouço ideal em regeneração óssea são a biocompatibilidade, osteocondutividade, estrutura porosa interligada, adequada resistência mecânica,

morfologia de superfície com rugosidade capaz de promover a agregação de células ósseas, osteoindução e capacidade de biodegradação.

7 CONCLUSÕES

A associação do polímero de mamona com nanopartículas de Óxido de Silício e Zircônio é viável uma vez que tanto a Sílica como Zircônia mostraram-se biocompatíveis, não havendo sinais de reação inflamatória ou granulomatosa tipo corpo estranho importantes.

A osteocondução foi a via principal para a regeneração óssea, o polímero de mamona comportou-se como um arcabouço receptivo que facilita a neoformação óssea, especialmente nos animais com implantes de polímero de mamona sem dopante, onde observou-se maior quantidade estimada de tecido ósseo maduro.

O polímero de mamona acrescido de 10% de nanopartículas de sílica apresentou maior presença de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos em todos os períodos observados, sendo capaz de promover a indução de células osteoprogenitoras ao leito receptor. A adição de 10% de sílica ao polímero favoreceu a agregação e diferenciação celular, fazendo persistir a atividade integrada dos três tipos de células envolvidas no processo de ativação-reabsorção-formação óssea.

A rugosidade pode ser uma característica morfológica importante nos materiais estudados no que diz respeito à agregação e crescimento ósseo. O polímero de mamona sem dopante possui superfície bastante rugosa e irregular, característica que pode ter favorecido a neoformação óssea.

A microestrutura da superfície do polímero de mamona dopado com 5% de ZrO_2 , mostrou-se pouco rugosa, com poros concêntricos e de diferentes diâmetros, propriedade importante nas cerâmicas com bons valores de tenacidade à fratura e resistência à flexão, porém parece ter dificultado a osteocondução.

Pesquisas envolvendo o controle da porosidade e do nível de rugosidade do polímero de mamona dopado com nanopartículas de sílica e zircônia, a adição de diferentes concentrações de sílica ou zircônia ao polímero e o acréscimo de outras nanopartículas de biocerâmicas à poliuretana de mamona devem ser exploradas com o objetivo de potencializar as qualidades mecânicas e biológicas do compósito quando implantados e usados como substituto ósseo.

REFERÊNCIAS

Aichelmann-Reidy ME, Yukna RA. Bone replacement grafts: the bone substitutes. *Dent Clin North Am* 1998; 42(3):491-503.

Airoidi C, Farias RF. Síntese e reatividade de sílica lamelar. *Quím Nova* 2000; 23(1):88-93.

Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 2001;10:96–101.

Alexander JW. Bone grafting. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1987; 17(4):811-819.

Andrade AL, Domingues RZ. Cerâmicas bioativas – Estado da arte. *Quím Nova* 2006; 29(1):100-104.

Assis JMK. Estudo comparativo de compósitos aluminazircônia tetragonal e de cerâmicas de alumina aditivada com nióbia para aplicações estruturais. [Dissertação - Mestrado]. São José dos Campos: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais; 2007.

Barbanti SH, Zavaglia CAC, Duek EAR. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros* 2005; 15(1):13-21.

Bauer TW, Muschler GF. Bone Graft Materials: an Overview of the Basic Science. Clin Orthop Relat Res 2000; 371(1):10-27.

Bauer TW, Smith ST. Bioactive Materials in Orthopaedic Surgery: Overview and Regulatory Considerations. Clin Orthop Relat Res 2002; 395:11-22.

Bellini OJ. Síntese e caracterização de uma matriz óssea de fosfato de cálcio e nanocompósitos fosfato de cálcio/sio₂n para substituição e regeneração óssea. [Dissertação - Mestrado]. Joinville: Universidade do Estado de Santa Catarina; 2007.

Betti LV. Análises microscópica e radiográfica do reparo de defeitos confeccionados em fêmures de coelhos preenchidos com matriz óssea bovina medular em bloco ou cortical em microgrânulos. [Tese - Doutorado]. Bauru: Universidade de São Paulo; 2004.

Bolson J, Schossler JE, Ornes RC, Mottin V, Alberti T. Análise clínica, radiológica, macroscópica e histológica do úmero de codornas domésticas (*Coturnix japonica*), submetido ao implante da poliuretana derivada do polímero de mamona (*Ricinus communis*). Cienc Rural 2005; 35(5):1123-1130.

Borba VZC, Kulak CAM, Lazaretti-Castro M. Controle Neuroendócrino da Massa Óssea: Mito ou Verdade? Arq Bras Endocrinol Metab 2003; 47(4):453-57.

Borum L, Wilson Jr OC. Surface modification of hydroxyapatite. Part II. Silica. Biomaterials 2003; 24(21):3681-3688.

Bowers KT. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast response. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1992; 7:302-312.

Brentel AS, Vasconcellos LMR, Oliveira MV, Graça MLA, Vasconcellos LGO, Cairo CAA, Carvalho YR. Histomorphometric analysis of pure titanium implants with porous surface versus rough surface. *J Appl Oral Sci.* 2006;14(3):213-18.

Brighton CT, Wang W, Seldes R, Zhang G, Pollack S. Signal transduction in electrically stimulated bone cells. *J Bone Joint Surg* 2001;83-A(10):1514-23.

Bucholz RW. Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes. *Clin Orthop Relat Res* 2002; 395:44-52.

Buckwalter JA, Cooper RR. Bone structure and function. *Instr Course Lect* 1987; 36:27-48.

Burg KJL, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2000; 21:2347-59.

Burguer EH, Klein-Hulend J, Van Der Plast A, Nijweide PJ. Function of Osteocytes in Bone - Their Role in Mechanotransduction. *J Nutr* 1995;125(7):2020-23.

Calixto RFE, Teófilo JM, Brentegani LG, Lamano Carvalho TL. Implante de um floculado de resina de mamona em alvéolo dental de rato. *Pesqui Odontol Bras* 2001; 15(3):257-262.

Calixto RFE. Implante de um floculado de resina derivada do óleo de mamona (*Ricinus communis*) em alvéolo de rato imediatamente após a extração dental. Avaliações histológica e histométrica da biocompatibilidade e da cronologia do reparo ósseo. [Dissertação - Mestrado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2001.

Campos SD, Campos EA, Silveira CB, Bini RA. Biomateriais à base de Na₂O-CaO-SiO₂-P₂O₅ preparados com serragem e com glucose de milho: influência na porosidade e na cristalinidade. *Cerâmica* 2005; 51(319):274-279.

Cano JM, Hachem A, Ruzafa AG, Rodriguez D, Sabate AF, Santos LA. Sulfato de cálcio associado à gentamicina como material de substituição óssea. *Rev Bras Ortop* 1999; 34(5):355-360.

Carvalho DCL, Rosim GC, Gama LOR, Tavares MR, Tribioli RA, Santos IR e Cliquet Jr A. Tratamentos não farmacológicos na estimulação da osteogênese. *Rev Saúde Pública* 2002; 36(5):647-54.

Chierice GO. Pesquisa e desenvolvimento de biomateriais baseados em poliuretanas derivadas do óleo de mamona. SNM-PADCT-II. P.76, 1994.

Chraska T, King AH, Berndt CC. On the size-dependent phase transformation in nanoparticulate zirconia. *Materials Science and Engineering A* 2000; 286(1):169-178.

Chun YW, Khang D, Haberstroh KM and Webster TJ. The role of polymer nanosurface roughness and submicron pores in improving bladder urothelial cell density and inhibiting calcium oxalate stone formation. *Nanotechnology* 2009; 20(8):85-104.

Corsetti A. Avaliação do reparo ósseo em fêmures de ratos após implante de blocos de cimento de fosfato de cálcio e enxerto ósseo autógeno. [Dissertação - Mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.

Croci AT, Camargo OP, Bitar G, Pereira SLB, Moreira M, Freitas Jr S. Efeito do Concentrado de Plasma em Falhas Ósseas Provocadas em Fêmures de Camundongos como Estimulação de Formação Óssea. Estudo Experimental. Acta Ortop Bras 2003; 11(4):203-39.

Croci AT. Retardo de consolidação e pseudoartrose. Acta Ortop Bras 1997; 5:26-34.

Dourado ER. Preparação e caracterização de hidroxiapatita nanoestruturada dopada com estrôncio. [Dissertação - Mestrado]. Rio de Janeiro: Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas; 2006.

El-Ghannam A. Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering. Expert Rev Med Devices. 2005; 2(1):87-101.

Elias CN, Lima JHC, Meirelles LA. Variação da osseointegração com a rugosidade dos implantes odontológicos. In: Simpósio Matéria 2000. Matéria 2002;1:1-9.

Evans AG, Faber KT. Crack-growth resistance of microcracking brittle materials. J Am Cer Soc 1984; 67(4):255-260.

Felício-Fernandes G, Laranjeira MCM. Calcium phosphate biomaterials from marine algae. Hydrothermal synthesis and characterisation. Quim nova 2000; 23(4):441-46.

Figueiredo AS, Fagundes DJ, Novo NF, Inouye CM, Takita LC, Sassioto MCP. Osteointegração de osso bovino desvitalizado, hidroxiapatita de coral, poliuretana de mamona e enxerto ósseo autógeno em coelhos. *Acta Cir Bras* [serial online] 2004 Jul-Ag;19(4). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>.

Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg* 2002; 84(3):454-65.

Frazilio FO, Rossi R, Negrini Neto JM, Facco GG, Ovando TM, Fialho MPF. Use of castor oil polyurethane in an alternative technique for medial patella surgical correction in dogs. *Acta Cir Bras* 2006;21(4):74-79.

Freitas IGF. Ação do laser de HeNe na osteogênese. [Tese - Doutorado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2001.

Friedlaender GE. Bone grafts. The basic science rationale for clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*. 1987;69:786-790.

Gamradt SC, Lieberman JR. Genetic Modification of Stem Cells to Enhance Bone Repair. *Ann Biomed Eng* 2004; 32(1):136–147.

Garvie RC, Hannink RH, Pascoe RT. Ceramic Steel? 1975; 258(5537):703-704.

Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, Pilet P, Daculsi G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: Influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials* 1998;19:133–139.

Giordano V, Knackfuss IG, Gomes RC, Giordano M, Mendonça RG, Coutinho F. Influência do laser de baixa energia no processo de consolidação de fratura de tíbia: estudo experimental em ratos. *Rev Bras Ortop* 2001; 36(5):174-78.

Goldberg VM, Stevenson S. Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop* 1987; 225:7–16.

Gomide VS, Fagury-Neto E, Menezes RR, Zavaglia CAC. Estudo da utilização do dispersante Darvan C no processamento da α -Alumina e do compósito biocerâmico hidroxiapatita-zircônia. *Rev Mat* 2005; 10(1):37-42.

Goulet JA, Senunas LE, Silva GL, Greenfield ML. Autogenous iliac crest bone graft. Complications and functional assessment. *Clin Orthop* 1997;339:76–81.

Greenwald A, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN. Bone-Graft Substitutes: Facts, Fictions, and Applications. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83:98-103.

Hallab NJ, Bundy KJ, O'Connor K, Moses RL, Jacobs JJ. Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion. *Tissue Engineering* 2001; 7(1): 55-71

Hämmerle CH, Schmid J, Olah AJ, Lang NP. A novel model system for the study of experimental guided bone formation in humans. *Clin Oral Implants Res* 1996;7(1):38-47.

Hench LL & Wilson J. Surface-active biomaterials. *Science* 1984; 226:630-640.

Hench LL, Jones JR. Biomaterials, artificial organs and tissue engineering. Woodhead publishing limited. Cambridge England: 2005.

Hench LL. Bioceramics: from concept to clinic. J Am Ceram Soc 1991; 74(7):1487-1510.

Hoffmann O, Angelov N, Gallez F, Jung RE, Weber FE. The Zirconia implant-bone interface: a preliminary histologic evaluation in rabbits. International Journal of Oral and Maxillofacial Implants 2008; 23(4):691-695.

Holmes RE, Bucholz RW, Mooney V. Porous hydroxyapatite as a bone-graft substitute in metaphyseal defects. A histometric study. J Bone Joint Surg 1986; 68:904-911.

Huang C, Tang Z, Zhang Z, Gong J. Study on a new, environmentally benign method and its feasibility of preparing nanometer zirconia powder. Materials Research Bulletin 2000; 35(9):1503-1508.

Hsu FY, Tsai SW, Lan CW, Wang YJ. An *in vivo* study of a bone grafting material consisting of hydroxyapatite and reconstituted collagen. J Mater Sci: Mater Med 2005; 16(4):341-345.

Ignácio H, Mazzer N, Barbieri CH, Chierice GO. Uso da poliuretana derivada do óleo de mamona para preencher defeitos ósseos diafisários segmentares do rádio. Rev Bras Ortop 1997; 32(10):815-821.

Ignácio H, Mazzer N, Barbieri CH, Chierice GO. Utilização da poliuretana da mamona nas formas compacta e porosa no preenchimento de falha óssea: estudo experimental em cães. *Rev Bras Ortop* 2002; 37(5):187-94.

Inoue K, Ohgushi H, Yoshikawa T, Okumura M, Sempuku T, Tamai S. The effect of aging on bone formation in porous hydroxyapatite: Biochemical and histological analysis. *J Bone Miner Res* 1997; 12:989–994.

Jacques JW, Fagundes DJ, Figueiredo AS, Inouye CM, Scapulatempo RP, Sassioto MCP, et al. O papel da poliuretana de mamona como substituto do enxerto ósseo autógeno em coelhos. *Rev Col Bras Cir* 2004; 31(4):236-241.

Jacques JW. Estudo comparativo entre enxerto ósseo autógeno e poliuretana de mamona em coelhos [Tese de Mestrado]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina. UNIFESP – 2001.

Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005; 26:5474–5491.

Karatzas S, Zavras A, Greenspan D, Amar S. Histologic observations of periodontal wound healing after treatment with PerioGlas in nonhuman primates. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1999;19:489-499.

Karsenty G. The central regulation of bone remodeling. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11:437-9.

Kawachi EY, Bertran CA, Reis RR, Alves OL. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Quím nova* 2000; 23(4):518-522

Kfuri Jr M, Paccola CAJ, Chierice GO, Shimano AC. Comparação entre pinos absorvíveis de poliparadioxanona e de poliuretana da mamona na fixação de segmentos osteocondrais do fêmur distal de coelhos. *Rev Bras Ortop* 2001; 36(4):125-131.

Kokubo T. Surface Chemistry of Bioactive Glass-Ceramics. *J Non-Cryst Solids* 1990; 120:138-151.

Kokubo T, Kim HM, Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials* 2003; 24(13):2161-2175.

Kondoh J, Shiota H, Kawachi K, Nakatani T. Yttri concentration dependence of tensile strength in yttria-stabilized zirconia. *J Alloys Compounds* 2004; 365:253-258.

Köse GT, Ber S, Korkusuz F, Hasirci V. Poly (3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) based tissue engineering matrices. *J Mater Sci: Mater Med* 2003; 14(2):121-126.

Kumar AS, Durai AR, Sornakumar T. Yttria ceramics: cutting tool application. *Materials Letters* 2004; 58(11):1808– 1810.

Kuranaga C, Ribeiro FSA, Filgueira M. Estudo da sinterização da zircônia dopada com óxidos de terras raras a 5 GPa de pressão. *Cerâmica* 2005; (51):163-167.

Landa LV. Estudo comparativo entre terapia com laser de baixa potência e terapia ultra-sônica na promoção da osteogênese em rádio de coelhos. [Dissertação - Mestrado]. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba; 2005.

Laranjeira MG, Rezende CMF, Sá MJC, Silva CM. Implantes de resina de poliuretana vegetal (*Ricinus communis*) na tração linear, fixação e fusão vertebral no cão. Estudo experimental. Arq Bras Med Vet Zootec 2004; 56(5):602-609.

Laureano Filho JR, Branco BLC, Andrade ESS, Barbosa JRA. Histological comparison of demineralized bone matrix and the *Ricinus communis* polymer on bone regeneration. Rev. bras. otorrinolaringol 2007; 73(2):186-192.

Lee JH, Lee CK, Chang BS, Ryu HS, Seo JH, Hong KS, et al. In vivo study of novel biodegradable and osteoconductive CaO-SiO₂-B₂O₃ glass-ceramics. Wiley Periodicals, Inc. 2006:362-369.

Leite FRM, Ramalho LTO. Bone regeneration after demineralized bone matrix and castor oil (*ricinus communis*) polyurethane implantation. J appl oral sci. 2008;16(2):122-6.

Leonel ECF, Andrade Sobrinho J, Oliveira Ramalho LT, Porciúna HF, Mangilli R. A ação do polímero de mamona durante a neoformação óssea. Acta Cir. Bras 2004; 19(4):342-350.

Leonel ECF, Mangilli PD, Ramalho LTO, Andrade Sobrinho J. A importância da porosidade interna do polímero de mamona durante a neoformação óssea - estudo em ratos. Cienc Odontol Bras 2003; 6(3):19-25.

Li P, Ohtsuki C, Kokubo T, Nakanishi K, Soga N, Nakamura T, Yamamuro T. Apatite Formation Induced by Silica Gel in a Simulated Body Fluid. *J Am Ceram Soc* 1992; 75(8):2094-2097

Liang Y, Dutta SP. Application trend advanced ceramic technologies. *Technovations* 2001; 21(1):61-65.

Lima AFM, Rahal SC, Muller SS, Correa MCE, Padovani CR. Propriedades mecânicas do cimento ósseo e da poliuretana de mamona com e sem catalisador. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2008; 60(5):1061-1068.

Lirani APR e Lazaretti-Castro M. Evidências da Ação de Agentes Físicos Sobre o Metabolismo do Tecido Ósseo e Seus Potenciais Usos Clínicos. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2005; 49(6):891-96.

Lirani APR. Estudo comparativo dos efeitos do ultra-som e do laser de baixa intensidade no reparo ósseo de tibia de rato. [Dissertação - Mestrado]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2004.

Lossdörfer S, Schwartz Z, Lohmann CH, Greespan DC, Ranly DM & Boyan BD. Osteoblast response to bioactive glasses in vitro correlates with inorganic phosphate content. *Biomaterials* 2004; 25:2457-2555.

Luger EJ, Rochkind S, Wollman Y, Kogan G, Dekel S. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. *Laser Surg Med* 1998; 22(2):97-102.

Ma Z, Mao Z, Gao C. Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2007;15;60(2):137-57.

Maeda ST. Avaliação microscópica da resposta tecidual de cavidades cirúrgicas em fêmures de coelho preenchidas com sulfato de cálcio. [Tese - Doutorado]. Bauru: Universidade de São Paulo; 2005.

Maniopoulos CJ, Sodek AH, Melcher. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res* 1988; 254:317–330.

Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow cytokines, and bone remodeling – Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 1995; 332:305-11.

Mansur C, Pope M, Pascucci MR and Shivkumar S. Zirconia-calcium phosphate composites for bone replacement. *Ceramics International* 1998; 24(1):77-79

Maria PP, Padilha Filho JG, Canola JC, Castro MB. Poliuretana de mamona (*Ricinus communis*) para desvio da crista tibial no cão. *Ciência Rural* 2004; 34(3):821-827.

Maria PP, Padilha Filho JG, Castro MB. Análise macroscópica e histológica do emprego da poliuretana derivada do óleo de mamona (*Ricinus communis*) aplicada na tibia de cães em fase de crescimento. *Acta Cir Bras* [serial online] 2003 Jul-Ago;18(4). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>.

Martin CP, Blunt MO, Moriarty P. Nanoparticle networks on silicon: Self-organized or disorganized? *Nano letters* 2004; 4(12):2389-2392

Martinez SA, Walker T. Bone grafts. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1999; 29(5):1207-19.

Masters DH. Implants. Bone and bone substitutes. *Calif Dent Ass J* 1988; 16:56-65.

Mendonça JCG, Rossi R, Inouye CM, Bazan DRP, Monteiro JCC, Mendonça JP. Morphology of autogenous bone graft and castor oil polyurethane in the infraorbital rim of rabbits: a comparative study. *Acta Cir Bras* 2006; 21(5):341-47.

Mendonça JCG. Estudo Morfológico Comparativo do Enxerto Ósseo Autógeno e o Polímero de Mamona em Rebordo Infra-Orbitário, em Coelhos. [Dissertação - Mestrado]. Campo Grande: Universidade de Brasília; 2004.

Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *Anz J Surg* 2001; 71:354-361.

Moraes MCCSB, Elias CN, Dualib Filho J, Oliveira LG. Mechanical Properties of Alumina-Zirconia Composites for Ceramic Abutments. *Materials Research* 2004; 7(4):643-649.

Moretton TR, Brown JrCE, Legan JJ, Kafrawy AH. Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement. *J Biomed Mater Res*, 2000; 52(3):528-33.

Mustafa K, Wennerberg A, Wroblewski J, Hultenby K, Lopez BS, Arvidson K. Determining optimal surface roughness of TiO₂ blasted titanium implant material for

attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. *Clin Oral Implants Res* 2001;12(5):515-25.

Nade, SL, Armstrong, E. McCartney, B. Baggaley. Osteogenesis after bone and bone marrow transplantation. The ability of ceramic materials to sustain osteogenesis from transplanted bone marrowcells: Preliminary studies. *Clin. Orthop.* 181:255–263, 1983.

Nasatzky E, Gultchin J, Schwartz Z. The role of surface roughness in promoting osteointegration. *Refuat Hapeh Vehashinayim.* 2003; 20(3):8-19.

Noble BS, Peet N, Stevens HY, Brabbs A, Mosley JR, Reilly GC, Reeve J. Mechanical loading: biphasic osteocyte survival and targeting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;284:934–943.

Nono MCA. Cerâmicas de zircônia tetragonal policristalina do sistema CeO₂-ZrO₂ (Ce-TZP). 1990. 140f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto Tecnológico de Aeronáutica – ITA, Comando-Geral de Tecnologia Aeroespacial, São José dos Campos, SP, 1990.

Oh S, Oh N, Appleford M, Ong JL. Bioceramics for Tissue Engineering Applications – A Review. *Am. J. Biochem. & Biotechnol.* 2006; 2(2):49-56.

Ohara GH, Kojima KE, Rossi JC, Telles M, Soares TVC, Salomão C, Sanda M. Estudo experimental da biocompatibilidade do polímero poliuretano da mamona implantada intra-óssea e intra-articular em coelhos. *Acta Ortop Bras* 1995; 3(2):62-68.

Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI. Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats. *Acta Orthop Scand* 1989; 60:334–339.

Okubo Y, Bessho K, Fujimura K, Iizuka T, Miyatake SI. Osteoinduction by bone morphogenetic protein-2 via adenoviral vector under transient immunosuppression. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267(1):382–387.

Padula EOC, Andrade ML, Giordano V, Ramalho MV. Aspectos morfológicos do processo de consolidação de fratura em ratos diabéticos. *Rev Bras Ortop* 2003; 38(3):127-36.

Pagani C, Miranda CB, Bottino MC. Avaliação da tenacidade à fratura de diferentes sistemas cerâmicos. *J Appl Oral Sci* 2003; 11(1): 69-75.

Pereira-Júnior OC, Rahal SC, Iamaguti P, Felisbino SL, Pavan PT, Vulcano LC. Comparison Between Polyurethanes Containing Castor Oil (Soft Segment) and Cancellous Bone Autograft in the Treatment of Segmental Bone Defect Induced in Rabbits. *J Biomater Appl* 2007;21(3):283-97.

Piconi C, Maccauro G. Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials* 1999; 20(1):1-25.

Pierri JJ, Maestrelli SC, Pallone EMJA, Tomasi R. Dispersão de nanopartículas de ZrO₂ visando produção de nanocompósitos de ZrO₂ em matriz de Al₂O₃. *Cerâmica* 2005; (51):08-12.

Ponzoni D. Avaliação da osseointegração promovida por implantes jateados por Al_2O_3 : análises histológica e histométrica em cães. [Tese - Doutorado]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2004.

Pretel H. Ação de biomateriais e laser de baixa intensidade na reparação tecidual óssea. Estudo histológico em ratos. . [Dissertação - Mestrado]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista; 2005.

Restrepo LL, Marzola C, Consolaro A, Costa Pereira AA, Toledo Filho JL, Andreo JC. Avaliação de implantes de osso bovino liofilizado "Osseobond[®]" e membrana reabsorvível de osso bovino liofilizado. Rev Bras Implant 1998; 4:8.

Rezende MR, Mesquita IV, Ribak S, Dalapria R, Toledo CS, Andrade D. Nova técnica para obtenção de enxerto de osso esponjoso. Estudo anátomo-clínico. Rev Bras Ortop 1996; 31(5):419-23.

Rocha Júnior AM, Oliveira RG, Farias RE, Andrade LCR, Aarestrup FM. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. An Bras Dermatol 2006; 81(2):150-56.

Sanada JT, Rodrigues JGR, Canova C, Cestari TM, Taga EM, Taga R, et al. Análise histológica, radiográfica e do perfil de imunoglobulinas após implantação de enxerto de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco em músculo de ratos. J Appl Oral Sci 2003; 11(3): 209-15.

Santos C, Souza RC, Habibe AF, Maeda LD, Barboza MJR, Elias CN, et al. Mechanical properties of Y-TPZ ceramics obtained by liquid phase sintering using bioglass as additive. Mat Sci Eng A 2008;478:257-263.

Santos C, Teixeira LHP, Sudo DMB, Strecker K, Elias CN. Influência da temperatura de sinterização nas propriedades das cerâmicas biocompatíveis ZrO_2 e Y_2O_3 . In: 49º Congresso de cerâmica. São Pedro-SP, 2005.

Santos C, Ribeiro S, Daguano JKMF, Rogero SO, Strecker K, Silva CRM. Development and cytotoxicity evaluation of SiAlONs Ceramics. *Mat Sci Eng C* 2007; 27:148-153.

Sartori AR, Moreira J, Santos AMM, Cintra DEC, Sartori LR, Baraúna MA, et al. Comparação do processo de reparo ósseo em tíbias de ratas normais e osteopênicas. *Acta Ortop Bras*. [periódico na Internet]. 2008; 16(1):37-40.

Sassioto MCP, Inouye CM, Aydos RD, Figueiredo AS, Pontes ERJC, Takita LC, et al. Estudo do reparo ósseo com matriz óssea bovina desvitalizada e calcitonina em ratos. *Acta Cir Bras* [serial online] 2004 Set-Out. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb> [também em CD-ROM].

Shapoff CA, Alexander DC & Clark AE. Clinical use of a bioactive glass particulate in the treatment of human osseous defects. *Compendium* 1997; 18:352-63.

Sicca CM, Oliveira RC, Silva TL, Cestari TM, Oliveira DT, Buzalaf MAR. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito do tamanho da partícula. *Rev. FOB* 2000; 8(1/2):1-10.

Silva AM, Del Carlo RJ, Vilorio MIV, Silva AS, Filgueiras RR. Matriz óssea homóloga desmineralizada na preparação de falhas ósseas segmentares produzidas no rádio de coelhos. *Ciência Rural* 2003; 33(3):539-545.

Silva MJA, Tavano O, Guimarães SAC, Gomes MF. Estudo do comportamento do tecido ósseo frente ao implante do polímero de mamona em raios de coelhos, pela análise quantitativa das radiopacidades nas imagens radiográficas convencionais. Rev FOB 1997; 5:69-77.

Silva SN, Pereira MM, Branco JRT, Rocha HA, Rezende CMF. Desenvolvimento de recobrimentos bioativos sobre ligas metálicas (aço inoxidável 316L e titânio). Rev On Line UnilesteMG 2005; 1:1-16.

Silver IA, Deas J& Ereciska M. Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro: effects of 45S5 Bioglass, and 58S and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability. Biomaterials 2001; 22:175-185.

Souza RC, Santos C, Barboza MJR., Baptista CARP, Strecker K., Elias CN. Performance of 3Y-TZP Bioceramics under Cyclic Fatigue Loading. Materials Research 2008; 11(1):89-96.

Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. Endocrin Rev 1993;14:424-42.

Stevenson S. Enhancement of fracture healing with autogenous and allogeneic bone grafts. Clin Orthop 1998; 355:239-246.

Tabatabaei S, Shukohfar A, Aghababazadeh R, Mirhabibi A. Experimental study of the synthesis and characterisation of silica nanoparticles via the sol-gel method. Journal of Physics: Conference Series 2006; 26:371–374.

Takeda S. Central Control of Bone Remodelling. J Neuroend 2008; 20:802–807.

Tsonis PA. Regenerative biology: the emerging field of tissue repair and restoration. *Differentiation* 2002; 70(8):397-409.

Vasconcelos VL, Pereira APV, Oréface RL. Novos Biomateriais: Híbridos Orgânico-Inorgânicos Bioativos. *Polímeros* 1999; 9(4):104-109.

Vert M, Li MS, Spenlehauer G, Guerin P. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *J Mater Sci.* 1992; 3:432-446.

Vieira GHV. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. *Arq Bras Endocrinol Metab* 1999; 43(6):415-422.

Vital CC, Borges APB, Fonseca CC, Tsiomis AC, Carvalho TB, Fontes EB. Biocompatibilidade e comportamento de compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2006; 58(2):175-183.

Wang L, Li Y, Zuo Y, Zhang L, Zou Q, Cheng L, Jiang H. Porous bioactive scaffold of aliphatic polyurethane and hydroxyapatite for tissue regeneration. *Biomed Mater* 2009;4(2):25003.

Yamamoto TT, Kawakami M, Sakuda M. Defects of the rat premaxilla as a model of alveolar clefts for testing bone-inductive agents. *J Oral Maxillofac Surg* 1993; 51(8):887-891.

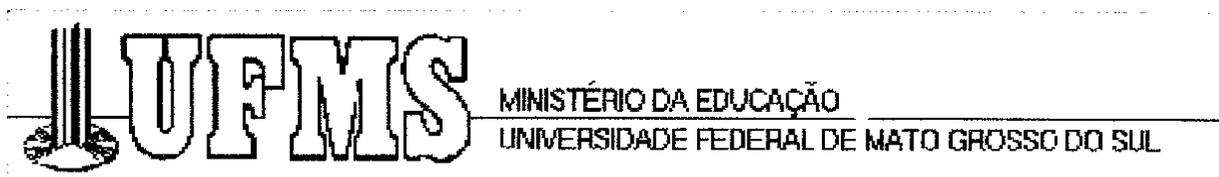
Yoshikawa H, Myoui A. Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. *J Artif Organs* 2005; 8:131-36.

Zaffe D. Review- Some considerations on biomaterials and bone. *Micron* 2005; 36:583-592.

Ziliotto L, Fantinatti AP, Daleck CR, Padilha Filho JG, Souza AP, Diniz PPVP. A limb sparing surgery with the use of a cortical allograft preserved in glicerín: an experimental study in dogs. *Acta Cir Bras* 2003; 18(2):107-115.

ANEXOS

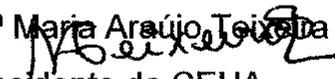
ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 141/2007, do Mestrando Renato Silva Nacer, sob a Orientação da Profª Ângela Antônia Sanches Tardivo Delben, referente ao protocolo **“Estudo do comportamento do polímero de mamona no reparo de lesão óssea em ratos submetidos à terapia laser de baixa potência”**, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião de 17 de maio de 2007, e seu título emendado para **“Estudo do comportamento de polímeros de mamona contendo nanopartículas de óxidos de zircônio e titânio implantados no fêmur de ratos”** em 12 de novembro de 2008.

Campo Grande (MS), 12 de novembro de 2008.

Drª Maria Araújo Teófilo

Presidente da CEUA