

**ANA CLAUDIA DE SOUZA**

**"Estudo *in vivo* do Cimento de Fosfato de Cálcio  
Acrescido de “Whiskers” de Wollastonita: Um Novo  
Biomaterial"**

**Campinas, 2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ANA CLAUDIA DE SOUZA

**"Estudo *in vivo* do Cimento de Fosfato de Cálcio  
Acrescido de "Whiskers" de Wollastonita:  
Um Novo Biomaterial"**

Este exemplar corresponde à redação final  
da Dissertação defendida pela candidata

*Ana Cláudia de Souza*

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Celular e Estrutural do Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual de  
Campinas para obtenção do Título de  
Mestra em Biologia Celular e Estrutural,  
na área de Anatomia.

Orientador: Dr. José Angelo Camilli

Campinas, 2014

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

So89e	Souza, Ana Claudia, 1989- Estudo <i>in vivo</i> do cimento fosfato de cálcio acrescido de "whiskers" de Wollastonita : um novo biomaterial / Ana Claudia de Souza. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.  Orientador: José Angelo Camilli. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.  1. Biomateriais. 2. Fosfato de cálcio. 3. Wollastonita. I. Camilli, José Angelo, 1963-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** *In vivo* study of calcium phosphate cement doped the "whiskers" of Wollastonite : a new biomaterial

**Palavras-chave em inglês:**

Biomaterials

Calcium phosphate

Wollastonite

**Área de concentração:** Anatomia

**Titulação:** Mestra em Biologia Celular e Estrutural

**Banca examinadora:**

José Angelo Camilli [Orientador]

Cintia Yuri Matsumura

Evelise Aline Soares

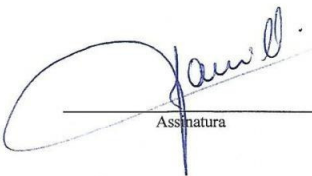
**Data de defesa:** 30-07-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 30 de julho de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Dr. José Angelo Camilli (Orientador)



Assinatura

Dra. Cintia Yuri Matsumura



Assinatura

Dra. Evelise Aline Soares



Assinatura

Dr. Gustavo Ferreira Simões

Assinatura

Dr. Celso Aparecido Bertran

Assinatura



## RESUMO

Os biomateriais podem ser utilizados em diversas áreas da bioengenharia regenerativa, sendo uma opção viável no reparo de lesões ósseas. Atualmente diferentes tipos de biomateriais têm sido estudados, dentre eles as cerâmicas que podem ser classificadas em três tipos: vidros bioativos, vitrocerâmicas e cerâmicas de fosfato de cálcio. As Cerâmicas de Fosfato de Cálcio podem ser subdivididas em Hidroxiapatita e em Cimentos Fosfatos de Cálcio (CFC). Os CFC tem se destacado pela sua fácil manipulação, capacidade de reabsorção e estimulação da osteogênese. No entanto, o CFC tem seu uso restrito como implante, pois possui baixa tenacidade a fratura comparada ao osso natural. Para reforçar o CFC algumas fibras como as de carbono, aramida e carbetto têm sido utilizadas. Outro tipo de reforço são os “whiskers” que compreendem fibras muito curtas. Neste estudo foi utilizado um CFC a base de  $\alpha$ -TCP reforçado com “whiskers” de Wollastonita, uma vitrocerâmica do complexo  $(CaSiO_3)$ , que assim como os vidros bioativos forma uma camada de hidroxiapatita se ligando firmemente aos ossos e tecidos adjacentes. O objetivo deste estudo foi avaliar a biocompatibilidade e o comportamento do CFC acrescido de “whiskers” de Wollastonita *in vivo*. Para obtenção dos cimentos os pós de  $\alpha$ -TCP com ou sem 10% de “whiskers” de Wollastonita foram adicionados a uma solução aquosa contendo 2,5% em massa de  $Na_2HPO_4$  (fosfato de sódio bibásico anidro). O biomaterial então se transformou em uma pasta a qual foi moldada no defeito crítico de 5 mm realizado no osso parietal de ratos Wistar. Foram utilizados 30 ratos divididos em dois grupos. O primeiro grupo recebeu o implante de  $\alpha$ -TCP (grupo TCP) e o segundo recebeu implante de  $\alpha$ -TCP acrescido de 10 % de “whiskers” de Wollastonita (grupo TCPW). Cinco animais de cada grupo foram eutanasiados no prazo de 30, 90 e 120 dias. As calvárias foram retiradas e submetidas a processamento histológico com Eosina e Hematoxilina e Tricrômio de Masson. A análise morfométrica foi realizada com auxílio do software *NIS-Elements: Advanced Research 3.0* no qual foi possível mensurar a área de osso neoformada nos diferentes períodos de tempo. Os resultados expressaram uma média de área de osso neoformado no grupo TCP de (2, 25%), (2,80%) e (2,93%) após 30, 90 e 120 dias após a implantação respectivamente. No grupo TCPW a área de osso neoformado foi de 4,53% aos 30 dias, 5, 08% aos 90 dias e 3,76% aos 120 dias. Para avaliação macroscópica da resposta do tecido á presença do biomaterial as calvárias de 120 dias foram submetidas ao

processo de maceração com Peróxido de Hidrogênio. Concluí se que o  $\alpha$ -TCP acrescido de 10% de “whiskers” de Wollastonita é uma alternativa viável para engenharia tecidual óssea, pois se mostrou biocompatível e capaz de estimular a neoformação óssea.

**Palavras – chave:** Biomateriais, fosfato de cálcio e wollastonita.



## ABSTRACT

Biomaterials can be used in various areas of regenerative bioengineering, being a viable option in the repair of bone lesions. Currently different kinds of biomaterials have been studied, including ceramics that can be classified into three types: bioactive glasses, glass ceramics and ceramics of calcium phosphate. The calcium phosphate ceramics can be subdivided into Hydroxyapatite and Calcium Phosphate Cement (CFC). The CFC has been highlighted for its easy handling capacity of resorption and stimulation of osteogenesis. However, CFCs have restricted its use as an implant because it has low fracture toughness compared to natural bone. To reinforce CFCs carbon fibers, aramid and carbide have been used. Another type of reinforcement are the "whiskers" that comprise very short fibers. In this study we used a CFC-based  $\alpha$ -TCP reinforced with "whiskers" of Wollastonite, a ceramic complex ( $\text{CaSiO}_3$ ), so as bioactive glasses form a layer of hydroxyapatite firmly linking the bones and surrounding tissues. The aim of this study was to evaluate the biocompatibility and the behavior of CFC doped "whiskers" of Wollastonite in vivo. To obtain the cement powder of  $\alpha$ -TCP with or without 10% "whiskers" of Wollastonite was added to an aqueous solution containing 2.5 wt%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (bibasic sodium phosphate anhydrous). The biomaterial is then transformed into a paste which was shaped in the critical defect of 5 mm held in Wistar rat parietal bone. Were used 30 rats divided into two groups. The first group received implantation of  $\alpha$ -TCP (TCP group) and the second received implantation of  $\alpha$ -TCP doped 10% of "whiskers" of Wollastonite (TCPW group). Five animals from each group were euthanised within 30, 90 and 120 days. The calvaria were removed and sent for histological analysis with hematoxylin and eosin and Masson Trichrome. The morphometric analysis was performed using NIS-Elements software: Advanced Research 3.0 in which it was possible to measure the area of newly formed bone in the different periods of time. The results expressed an average area of newly formed bone in the TCP group (2, 25%), (2.80%) and (2.93%) after 30, 90 and 120 days after implantation, respectively. TCPW group in the area of new bone formation was 4.53% at day 30, 5, 08% at 90 days and 3.76% at 120 days. For macroscopic evaluation of the tissue response to the presence of the biomaterial calvarial 120 days were subjected to maceration process with Hydrogen Peroxide. Concluded that the  $\alpha$ TCP doped 10% of "whiskers" of

Wollastonite is a viable alternative for bone tissue engineering because it showed biocompatible and capable of stimulating bone formation.

**Key – words:** Biomaterials, calcium phosphate and wollastonite.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2. LITERATURA.....</b>	<b>03</b>
2.1 Tecido Ósseo.....	03
2.1.2 Células do Tecido Ósseo.....	04
2.1.3 Osteoclastogênese.....	06
2.2 Ossificação Intramembranosa.....	07
2.3 Ossificação Endocondral.....	08
2.4 Biomateriais.....	09
2.4.1 Alfa Fosfato Tricálcio ( $\alpha$ TCP).....	10
2.4.2 Wollastonita.....	12
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
3.1 Objetivos Gerais.....	13
3.2 Objetivos Específicos.....	13
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
4.1 Preparação dos Biomateriais.....	14
4.2 Implante Intra- Ósseo.....	15
4.3 Eutanásia e Obtenção dos Espécimes .....	17
4.4 Microscopia de luz.....	18
4.5 Análise Morfométrica.....	18
4.6 Maceração.....	19
4.7 Análise Estatística.....	19
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>21</b>
5.1 Análise Macroscópica dos defeitos ósseos.....	21
5.1.2 Análise descritiva dos grupos de 30 dias.....	21
5.1.3 Análise descritiva dos grupos de 90 dias.....	21
5.1.4 Análise descritiva dos grupos de 120 dias.....	21
5.2 Análise Morfométrica.....	23
5.3 Análise Estatística.....	26
5.3.1 Grupo $\alpha$ TCP 30 dias X $\alpha$ TCP com whiskers de wollastonita 30 dias.....	26
5.3.2 Grupo $\alpha$ TCP 90 dias X $\alpha$ TCP com whiskers de wollastonita 90 dias.....	26
5.3.3 Grupo $\alpha$ TCP 120 dias X $\alpha$ TCP com whiskers de wollastonita 120 dias.....	27
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>28</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>33</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>37</b>



*A minha família pelo incentivo e cumplicidade.*



## **AGRADECIMENTOS**

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural por ter me dado a oportunidade de aprender e aprimorar meus conhecimentos.

A CAPES por me conceder a bolsa e tornar possível a execução do projeto.

Ao meu orientador José Angelo Camilli por me dar a oportunidade de realizar um sonho.





## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1:</b> (A) BIOMATERIAL EM PÓ. FIG. 1 (B) SOLUÇÃO AQUOSA CONTENDO 2,5% EM MASSA DE FOSFATO DE SÓDIO BIBÁSICO ANIDRO. FIG. 1 (C) PASTA DECORRENTE DA MISTURA DO PÓ COM A SOLUÇÃO AQUOSA. ....	15
<b>FIGURA 2:</b> (A) DEFEITO CONFECCIONADO NA CALOTA CRANIANA. FIG. 2 (B) BIOMATERIAL INSERIDO NA CAVIDADE EXPERIMENTAL. FIG. 2 (C) SUTURA DO PERIÓSTEO. FIG. 2 (D) SUTURA DA PELE. ....	16
<b>FIGURA 3:</b> CALOTA CRANIANA RETIRADA. ....	17
<b>FIGURA 4:</b> MONTAGEM DAS DIFERENTES IMAGENS DA MESMA LÂMINA DEMONSTRANDO CORTE DO PARIETAL COM NEOFORMAÇÃO ÓSSEA E RESQUÍCIOS DE BIOMATERIAL . ....	18
<b>FIGURA 5:</b> MÉTODO DE GOSAIN ET AL. (2000) PARA O CÁLCULO DO OSSO NEOFORMADO. (ADAPTADO) .....	19
<b>FIGURA 6:</b> (A) DEFEITO ÓSSEO PREENCHIDO POR TECIDO MOLE COM RESQUÍCIOS DE BIOMATERIAL IMPLANTADO (SETA PRETA). EM (B) SETA BRANCA INDICA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA APÓS 90 DIAS. EM (C) SETA AZUL INDICA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA APÓS 120 DIAS . GRUPO TCPW.....	22
<b>FIGURA 7:</b> (A) CALVÁRIA GRUPO TCP 120 APÓS MACERAÇÃO. FIG. 7 (B) CALVÁRIA GRUPO TCPW 120 DIAS APÓS MACERAÇÃO. DEMONSTRANDO QUE NÃO HOUE FECHAMENTO TOTAL DO DEFEITO APÓS 120 DIAS.....	22
<b>FIGURA 8:</b> EM A (*) INDICAM PRESENÇA DE UMA LINHA CIMENTANTE SEPARANDO O OSSO MADURO DE OSSO NEOFORMADO (GRUPO TCPW30) CORTE HISTOLÓGICO CORADO COM TRICÔMICO DE MASSON. OBJETIVA DE 10X. EM B SETA PRETA INDICA A BORDA DO DEFEITO E SETA VERMELHA INDICA RESQUÍCIO DE BIOMATERIAL (GRUPO TCP30) CORADO EM HE, OBJETIVA DE 4X. ....	23
<b>FIGURA 9:</b> SETA LARGA INDICA QUE A DURA-MÁTER PERMANECU INTACTA EM TODOS OS CORTES, CORADO EM HE. ....	24
<b>FIGURA 10:</b> FOTOMICROGRAFIA DEMONSTRANDO A ÁREA DO DEFEITO ÓSSEO. MONTAGEM DAS DIFERENTES IMAGENS DA LÂMINA. GRUPO 90 DIAS CORADO EM TRICÔMICO DE MASSON. ....	24
<b>FIGURA 11:</b> FOTOMICROGRAFIA DEMONSTRANDO NEOFORMAÇÃO ÓSSEA AO LONGO DO DEFEITO. CORTE HISTOLÓGICO CORADO COM TRICÔMICO DE MASSON.GRUPO 90 DIAS. ....	25
<b>FIGURA 12:</b> EM A (NO) INDICA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA. (BD) INDICA BORDA DO DEFEITO. CORTE HISTOLÓGICO CORADO EM HE. FIG. 12 B DEMONSTRA QUE NÃO HÁ PRESENÇA DA LINHA CIMENTANTE SEPARANDO O OSSO MADURO DO OSSO NEOFORMADO TORNANDO-OS OS INDISTINGUÍVEIS. CORTE CORADO EM TRICÔMICO DE MASSON. GRUPO 120 DIAS. ....	25



## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> DISTRIBUIÇÃO DA POPULAÇÃO DE ACORDO COM O GRUPO EXPERIMENTAL E COM O PERÍODO DE EUTANÁSIA DO ANIMAL. GRUPO A TCP (IMPLANTE COM APENAS ATCP), GRUPO A TCPW (IMPLANTE COM ATCP ACRESCIDO DE 10% DE WHISKERS DE WOLLASTONITA).....	14
<b>TABELA 2:</b> MÉDIA DA ÁREA DE OSSO NEOFORMADO E DESVIO PADRÃO. APRESENTA DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVA. ....	26
<b>TABELA 3:</b> MÉDIA DA ÁREA DE OSSO NEOFORMADO E DESVIO PADRÃO APÓS 90 DIAS. APRESENTA DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVA. ....	26
<b>TABELA 4:</b> MÉDIA DA ÁREA DE OSSO NEOFORMADO E DESVIO PADRÃO APÓS 120 DIAS. NÃO HOUVE DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVA. ....	27



## LISTA DE SIGLAS

BMP – Proteína Morfogenética Óssea  
CDHA- Hidroxiapatita deficiente de cálcio  
CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica  
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais  
CFC - Cimento fosfato de cálcio  
CHA – Camada de Hidroxiapatita carbonatada  
CSF-M – Fator Estimulador de colônias de macrófagos  
COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal  
DMEM – Meio Eagle Modificado por Dulbecco  
EDTA- Ácido Etilenodiaminotetracético  
GLA – ácido carboxiglutamínico  
HE- Hematoxilina/Eosina  
IGF – Fatores de Crescimento Semelhantes a Insulina  
NFATc1 – Fator nuclear cl ativado de células T  
NFkBB – Fator nuclear kappa B  
Proteína C-Src – Proto oncogene  
RANK- Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B  
RANKL – Ligante do Receptor do Fator Nuclear kappa B  
Si – Silício  
TCF –  $\beta$  Fator de Crescimento e Transformação Beta  
TRAF 6 – Receptor do Fator de Necrose Tumoral  
 $\beta$  – TCP –Beta Fosfato Tricálcio  
 $\alpha$ TCP -  $\alpha$  Fosfato tricálcio

## INTRODUÇÃO:

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e matriz óssea. Tem como principais funções: a sustentação e proteção para o corpo e órgãos, reservatório de íons cálcio e fosfato e alojamento e proteção da medula óssea (KIERZENBAUM, 2004). Ele consegue se regenerar espontaneamente após uma lesão. No entanto, quando o osso é submetido a traumas extensos com grande perda de massa óssea, se faz necessário a utilização de enxerto de osso ou a implantação de biomaterial para que essa regeneração ocorra (KAMITAKAHARA; OHTSUKI; MIYAZAKI, 2008).

Atualmente o enxerto autólogo é considerado ideal, pois diminui os riscos de transmissão de doenças e rejeição tecidual, entretanto, a retirada do tecido ósseo do próprio paciente pode causar complicações como infecções, dores crônicas e hematomas, além deste tipo de enxerto ser limitado (FINKEMEIER, 2002). Por estas razões, outra opção utilizada como tratamento de lesões ósseas são os biomateriais que podem ser constituídos de ligas metálicas, polímeros, cerâmicas ou compósitos (AFONSO, 1998).

Dentre as cerâmicas, o  $\alpha$  Fosfato Tricálcio ( $\alpha$  TCP) tem sido alvo de grande interesse por ser bioativo, osteocondutivo e não-tóxico tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Além disso, se mostra mais bioreabsorvível do que as cerâmicas utilizadas atualmente na clínica (CARRODEGUAS; DE AZA, 2011). No entanto, uma das desvantagens apresentadas pelas cerâmicas é a baixa resistência mecânica restringindo seu uso a defeitos bucomaxilofaciais e recobrimento de próteses metálicas (KAWACHI et al., 2000).

Para melhorar a resistência mecânica e também as propriedades bioativas das cerâmicas alguns materiais como as fibras e os *whiskers* têm sido empregados. A inserção de variados tipos de fibras em uma matriz, aumenta a capacidade da cerâmica de suportar o estresse mecânico, uma vez que, a carga mecânica é transferida da matriz para as fibras por deformação de cisalhamento na interface formada entre o cimento e as fibras. Isso ocorre como resultado das diferenças entre as propriedades físicas da fibra e matriz (DOS SANTOS, 2002).

O termo *whiskers* é empregado às fibras muito curtas com razão de aspecto (razão entre largura e altura) entre 10 e 100 *mícrons*. Eles possuem uma resistência próxima à teórica e uma elevada pureza, levando há um aumento da resistência à propagação de trincas e melhorando as propriedades do biomaterial (SALLES, 2008). Estas pequenas fibras podem ser constituídas por fosfatos, carbonatos e silicatos de cálcio. O silício (Si) vem chamando atenção por ser um elemento que influencia na formação óssea e calcificação, além de estimular atividades celulares como a proliferação de osteoblastos e diferenciação de células mesenquimais em células osteogênicas (BOSE et al., 2011). Estudos demonstram que a Wollastonita ( $\text{CaSiO}_3$ ) apresenta bioatividade *in vitro* e a taxa de formação da camada de apatita em sua superfície é mais rápida quando em fluido biológico simulado (DOMINGUES, 2013). Devido a estas características, os *whiskers* de Wollastonita podem ser adicionados às cerâmicas para aperfeiçoar suas propriedades físicas e biológicas.

Pelo exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a biocompatibilidade, a capacidade de estimular a neoformação óssea e a osteoindução de um novo biomaterial a base de  $\alpha$  TCP acrescido de *whiskers* de Wollastonita *in vivo*.

## 2. LITERATURA

### *2.1 Tecido ósseo*

O tecido ósseo como outros tecidos conjuntivos contém uma grande quantidade de substância intercelular denominada matriz, circundada por células. Esta matriz é constituída por materiais orgânicos como: fibras de colágeno tipo I, proteoglicanos e proteínas não colagênicas; e por materiais inorgânicos formados principalmente por depósitos de fosfatos de cálcio na forma de hidroxiapatita (TORTORA, 2003; KIERZENBAUM, 2004).

O colágeno tipo I proporciona ao osso elasticidade e flexibilidade e se dispõe de forma ordenada com alternância de sua orientação de acordo com o eixo do canal de Havers (BOSKEY, 1999; KIERZENBAUM, 2004). A união de cálcio e do fósforo forma cristais de Hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , sendo que estes cristais possuem uma capa de hidratação para facilitar a troca de íons entre o cristal e líquido intersticial. A associação da hidroxiapatita com as fibras colágenas promove a resistência e dureza para o tecido ósseo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Dentre as proteínas não colagênicas presentes na matriz estão a osteocalcina, a osteonectina e a osteopontina que são sintetizadas por células ósseas denominadas osteoblastos, e agem no processo de mineralização do tecido ósseo regulando a adesão e atividade celular durante os fenômenos de formação e reabsorção óssea (KIERZENBAUM, 2004). A osteocalcina contém em sua molécula 3 resíduos do ácido carboxiglutâmico -  $\alpha$  (proteína GLA), é responsável pela fixação do cálcio e da hidroxiapatita, sendo uma das proteínas colagenosas mais abundantes na matriz extracelular, além de possuir baixo peso molecular. Estudos anteriores indicam sua participação no recrutamento e diferenciação osteoclástica (AVOLIO et al., 2008; DÔRES; PAIVA; CAMPANA, 2001).

A osteonectina não tem uma função claramente definida, no entanto, esta proteína consegue se ligar a moléculas de colágeno e de adesão participando na organização da matriz extracelular. Além disso, está presente nos tecidos que sofrem remodelação e morfogênese (ANDRADE et al., 2007; KIERZENBAUM, 2004). A osteopontina converte



o estresse mecânico através da sinalização celular. Esta proteína também pode ser expressa por fibroblastos e osteoclastos (PASSOS et al., 2009).

### ***2.1.2 Células do tecido ósseo***

As células do tecido ósseo são derivadas de duas linhagens diferentes: células pluripotentes indiferenciadas mesenquimais que dão origem aos osteoblastos, osteócitos e células de revestimento; e células hematopoéticas da medula óssea que dão origem aos osteoclastos (BATISTA, 2009). Os pré-osteoblastos são originados de células mesenquimais indiferenciadas presentes no endóstio e perióstio. Apresentam grande quantidade de ribossomos livres e escassez de retículo endoplasmático rugoso e ainda pequenos complexos de Golgi; têm como função principal se diferenciar em osteoblastos (ANDRADE et al., 2007).

Os osteoblastos são células engajadas na formação óssea, são mononucleadas, com núcleo esférico e citoplasma basófilo rico em fosfatase alcalina, contendo receptores para hormônios e fatores de crescimento. Possuem características secretoras típicas com um retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido e um grande Complexo de Golgi. Dispõe-se nas superfícies ósseas, lado a lado. São responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz, o osteóide, além de concentrar fosfatos de cálcio participando na mineralização da matriz (ANDRADE et al., 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; NAKAMURA, 2007). A diferenciação dos osteoblastos é regulada por genes como o *Cbfa1/Runx2* (membro da família do fator de ligação central) e fatores de crescimento (KIERZENBAUM, 2004).

O *Cbfa1/Runx2* codifica um fator de transcrição induzindo a diferenciação dos osteoblastos e controlando a expressão de osteocalcina. Segundo estudos, camundongos que apresentam a deficiência do *Cbfa1/Runx2* possuem um esqueleto constituído de cartilagem não havendo diferenciação osteoblástica nem formação óssea. Na displasia cleidocraniana, patologia que afeta seres humanos decorrente da mutação deste gene, ocorre hipoplasia das clavículas e atraso na ossificação dos ossos do crânio (KIERZENBAUM, 2004).

Quando os osteoblastos são enclausurados nas lacunas da matriz extracelular passam a ser chamados de osteócitos. Os osteócitos são as células mais abundantes na matriz extracelular, tem um formato elíptico, seu corpo celular ocupa pequenos espaços entre as lamelas chamadas de lacunas e contém diversos prolongamentos citoplasmáticos localizados no interior de canaliculos ósseos. Estes prolongamentos citoplasmáticos estabelecem junções do tipo *gap* entre os osteócitos adjacentes, osteoblastos e células de revestimento. Devido a estas junções os osteócitos localizados nas porções mais profundas do osso podem responder á modificações sistêmicas e da superfície óssea (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006; KIERZENBAUM, 2004).

Além disso, as interconexões entre os canaliculos ósseos são responsáveis pela manutenção e vitalidade da matriz, já que os prolongamentos citoplasmáticos irrigam os osteoblastos e mobilizam cálcio e outros íons. Deste modo os osteócitos se tornam essenciais para a manutenção e remodelação óssea, levando-se em conta que a apoptose dos osteócitos pode estimular a atividade dos osteoclastos (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006; ANDRADE et al., 2007).

Os osteoblastos presentes na superfície que deixam de produzir matriz entram em estado de quiescência e passam a ser chamados de células de revestimento ósseo. Apesar da semelhança destas células com as células osteoprogenitoras é provável que elas não tenham capacidade de se dividirem, no entanto podem ser reativadas, para a forma secretante, frente a um estímulo adequado (GARTNER; HIATT, 2003).

Outra célula presente no tecido ósseo são os osteoclastos, que são células gigantes, móveis e extensamente ramificadas, originadas de monócitos hematopoiéticos e macrófagos, os quais atingem o tecido ósseo através da circulação sanguínea e se fundem a células multinucleadas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; KIERZENBAUM, 2004). Nas áreas em que há reabsorção óssea são encontradas porções dilatadas de osteoclastos que se situam em depressões da matriz escavadas pela atividade destas células, estas depressões são denominadas lacunas de *Howship* (ANDRADE et al., 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; KIERZENBAUM, 2004).

A superfície ativa dos osteoclastos, voltada para a matriz exhibe numerosas invaginações, formando uma borda em escova. Periféricamente a esta borda em escova, há uma região do citoplasma que se assemelha a uma faixa, diretamente apoiada na matriz

óssea, denominada de zona clara. A zona clara, porção desprovida de organelas e rica em filamentos de actina, está intimamente aderida à superfície óssea. Assim, ela parece ser responsável pela adesão do osteoclasto à superfície óssea (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006).

Após aderir a matriz óssea, os osteoclastos geram um ambiente ácido necessário para a reabsorção óssea. Neste processo ocorre primeiramente a dissolução de componentes inorgânicos da matriz óssea (desmineralização óssea), seguida pela degradação enzimática dos componentes orgânicos como o colágeno tipo I e proteínas não colagênicas pela protease catipsina K (KIERZENBAUM, 2004).

### **2.1.3 Osteoclastogênese**

Duas moléculas sintetizadas por osteoblastos deflagram o processo de diferenciação dos osteoblastos, a saber: fator estimulador de colônias de macrófagos (CSF-M) e o ligante do receptor de ativação nuclear kappa B (NFκB) (RANKL) (KIERZENBAUM, 2004). Tanto o CSF-M quanto o RANK L são requeridos para induzir a expressão de genes que caracterizam a linhagem osteoblástica levando a maturação dos osteoclastos (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003). Quando o CSF-M está ausente não ocorre a proliferação de osteoblastos levando a uma patologia denominada osteopetrose, na qual há um aumento da massa óssea ocluindo os espaços da medula óssea em ossos longos, levando a anemia (KIERZENBAUM, 2004).

Já o RANK L se liga aos receptores RANK (Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B) presentes na membrana de células osteoclásticas em diferenciação. Essa ligação leva a trimerização do RANK e ao recrutamento da molécula fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF 6). A TRAF 6 por sua vez estimula uma cascata de sinalização incluindo a translocação nuclear de dois fatores de transcrição: o NFκB e o fator nuclear cl ativado de células T (NFATc1). Quando estes fatores de transcrição chegam ao núcleo ativam genes que levam a diferenciação dos osteoclastos. O TRAF6 também interage com a proteína c-Src para estimular uma via que leva à reorganização do citoesqueleto e também impede a apoptose (KIERZENBAUM, 2004).

## 2.2 Ossificação intramembranosa

A ossificação intramembranosa dá-se no interior de uma membrana conjuntiva, ricamente vascularizada na qual o contato das células ocorre por meio de longos prolongamentos; a formação dos ossos do crânio como o parietal, frontal, occipital, temporal e parte da mandíbula é decorrente deste tipo de ossificação, além disso, contribui para a formação de ossos curtos e no crescimento em espessura de ossos longos (BLOOM; FAWCETT, 1977; GARTNER; HIATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

O início do processo ocorre no centro de ossificação primária e é caracterizado pelo início da diferenciação de células mesenquimatosas em osteoblastos que secretam a matriz ainda não mineralizada (osteóide). Essa matriz posteriormente se mineraliza enclausurando alguns destes osteoblastos transformando-os em osteócitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Devido ao surgimento simultâneo de grupos de centros de ossificação, há a confluência de trabéculas ósseas, formando uma rede de trabéculas semelhante a uma esponja (osso esponjoso). As trabéculas recém-formadas possuem fibras de colágeno orientadas ao acaso, por isso o tecido ósseo inicial formado pela ossificação intramembranosa é chamado tecido ósseo primário ou entrelaçado, em contraste ao tecido ósseo formado posteriormente durante a remodelação óssea denominado de tecido ósseo compacto. Nas cavidades presentes entre as trabéculas ocorre a penetração de vasos sanguíneos e células mesenquimatosas indiferenciadas que desempenham uma nova função a hematopoiese, originando a medula óssea (GARTNER; HIATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; KIERZENBAUM, 2004).

Os centros de ossificação crescem de modo radial levando a substituição da membrana de tecido conjuntivo pré-existente, logo após o nascimento é possível notar, à palpação do crânio, locais onde esta membrana não foi substituída por tecido ósseo (fontículos). Os ossos chatos do crânio são formados por duas lâminas compactas de osso enquanto o centro permanece esponjoso (díploe) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

### 2.3 Ossificação endocondral

A ossificação endocondral refere-se à formação de osso dentro de um molde de cartilagem hialina. Esse tipo de ossificação é o principal responsável pela formação de ossos curtos e longos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; TORTORA, 2003). As células mesenquimais se unem no formato do osso futuro onde será formado um novo osso, estas células se diferenciam em células produtoras de cartilagem, que alteram o molde para uma cartilagem hialina, além disso, uma membrana é formada em torno dessa cartilagem, a qual recebe o nome de pericôndrio (TORTORA, 2003).

Os condrócitos presentes na região central da cartilagem sofrem maturação e hipertrofia e sintetizam uma matriz contendo colágeno do tipo X, além disso, fatores angiogênicos secretados por estes condrócitos induzem a formação de vasos sanguíneos a partir do pericôndrio. Estes vasos sanguíneos permitem a chegada de células osteoprogenitoras e hematopoéticas formando então o centro primário de ossificação (KIERZENBAUM, 2004).

A medida que a matriz sofre a calcificação na porção média da diáfise do molde cartilaginoso os condrócitos hipertróficos morrem por apoptose. Além disso as células presentes no pericôndrio manifestam seu potencial osteogênico e formam um colar periosteal de tecido ósseo recobrando a parte média da diáfise (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; KIERZENBAUM, 2004).

O centro primário de ossificação cresce de maneira longitudinal ocupando toda a diáfise ao mesmo tempo que o colar ósseo cresce também na direção das epífises. Já no início da formação do centro ósseo primário há o surgimento de osteoclastos para reabsorção do osso formado no centro da cartilagem formando o canal medular que também cresce de maneira longitudinal à medida que a ossificação progride. Células sanguíneas, derivadas de células hematógenas multipotentes, são trazidas pelo sangue originando assim a medula óssea. As células hematógenas se fixam no interior do osso e produzem todos os tipos de células sanguíneas tanto na vida intrauterina como após o nascimento (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Centros secundários de ossificação se desenvolvem um em cada epífise logo após o nascimento. Sendo estes semelhantes aos centros primários de ossificação, no entanto seu

crescimento é radial, os espaços ocupados por condrócitos hipertróficos também são invadidos por células osteoprogenitoras e vasos sanguíneos derivados do pericôndrio. Toda a superfície da cartilagem hialina é substituída por tecido ósseo exceto a cartilagem articular que persiste por toda a vida e não contribui para o crescimento ósseo e um delgado disco localizado entre a epífise e a diáfise chamado de cartilagem epifisial de crescimento ou linha epifisial que é responsável pelo crescimento longitudinal do osso, seu desaparecimento ocorre por volta dos vinte anos de idade e ocasiona a parada do crescimento longitudinal do osso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; KIERZENBAUM, 2004).

## **2.4. Biomateriais**

Com o aumento da população mundial e da expectativa de vida houve um acréscimo do número de idosos e conseqüentemente maior incidência de doenças crônicas que afetam o sistema músculo esquelético. Além disso, fraturas, osteoporose e outras patologias que acometem o sistema músculo esquelético devem ser tratadas por dispositivos temporários, permanentes e biodegradáveis. Portanto os biomateriais são utilizados como alternativa e implantados no corpo humano a fim de reparar ou substituir diferentes tecidos como cartilagens, osso, ligamentos ou tendões (NAVARRO et al., 2008)

Para que os biomateriais possam ser utilizados em aplicações biomédicas, eles devem apresentar características específicas como biocompatibilidade, ausência de citotoxicidade e propriedades biomecânicas capazes de responderem as solicitações tanto mecânicas quanto dinâmicas a qual estará sujeito durante sua vida útil (AFONSO, 1998).

Em 1991 o termo biomaterial foi definido como “material destinado a contactar com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar, ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do organismo”(GUTIERRES et al., 2005, p. 56). Segundo Gutierres (2005) os biomateriais podem ser classificados segundo seu comportamento biológico, ou seja, baseado na resposta do tecido hospedeiro. Nesta classificação eles podem ser denominados:

**Bioinertes:** ao se ligar ao receptor não desencadeia uma reação de corpo estranho no organismo.

**Biotolerados:** geralmente são envoltos por uma capsula fibrosa e são aceitos pelos tecidos receptores.

Bioativos: induz espontaneamente sua ligação diretamente ao tecido vivo, pois normalmente os substitutos ósseos são compostos por cálcio e fósforo e estabelecem uma ponte química com o osso.

Reabsorvíveis: são degradados de forma gradual e substituídos por tecido no local onde foi implantado.

Ademais os biomateriais ainda podem ser classificados segundo sua composição química em: polímeros, metais ou ligas metálicas, compósitos, e cerâmicas.

As cerâmicas podem ser definidas como uma classe de materiais inorgânicos não metálicos, que pode ser processada ou usada em alta temperatura (BASU; BALANI, 2011). Na década de 70 o uso mais intenso deste material levou à classificação como biocerâmicas, ou seja, materiais cerâmicos de engenharia que podem ser aplicados na área médica. Atualmente as biocerâmicas podem ser utilizadas isoladamente, ou no emprego de revestimento de próteses metálicas e associações com materiais poliméricos como o colágeno (KAWACHI et al., 2000).

Dentre as cerâmicas estudadas o alfa fosfato tricálcio ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 = \text{TCP}$ ) ( $\alpha$  TCP) vem chamando atenção para utilização como matéria prima de vários tipos de cimentos, biocerâmicas degradáveis e reparo ósseo por ser mais reabsorvível que outros biomateriais utilizados comercialmente hoje em dia (CARRODEGUAS; DE AZA, 2011).

#### **2.4.1 Alfa Fosfato Tricálcio ( $\alpha$ TCP)**

A principal característica que chama atenção nos biomateriais a base de fosfato de cálcio é a similaridade destes materiais com a composição mineral do osso. Os fosfatos de cálcio formam nanocristais de apatita carbonatada com morfologia e tamanho semelhante à apatita óssea (LEGEROS, 2008). Essa similaridade favorece a interação entre o biomaterial implantado e o tecido receptor através de uma forte ligação química (ALONSO, 2011).

Os cimentos de fosfatos de cálcio compreendem blendas de pós cristalinos ou amorfos misturados a soluções aquosas como ácido cítricos, soluções de fosfato de sódio, água destilada dentre outras. Depois de misturados se transformam em uma pasta que endurece espontaneamente em alguns minutos (MOTISUKE, 2010)

Os fosfatos de cálcio mais utilizados atualmente são a hidroxiapatita e o fosfato tricálcio, que pode ser  $\alpha$  ou  $\beta$ . Em altas temperaturas o  $\beta$  TCP se transforma em  $\alpha$  TCP, no

entanto, eles continuam com a mesma composição química diferindo apenas na estrutura dos cristais e solubilidade. O  $\alpha$  fosfato tricálcio sendo mais solúvel que os outros se torna um biomaterial ideal para implante, pois sua substituição por tecido ósseo ocorre mais rapidamente que nos outros biomateriais usados atualmente. (DOMINGUES, 2013; MOTISUKE, 2010).

Apesar das vantagens de se utilizar as biocerâmicas como biomaterial em defeitos bucomaxilofaciais, cirurgias ortopédicas, craniofaciais e vertebroplastias seu uso ainda é limitado por possuir baixa resistência a fraturas. Nos últimos anos alguns materiais vêm sendo estudados para aperfeiçoar as propriedades das biocerâmicas.(BASU; BALANI, 2011; CARRODEGUAS; DE AZA, 2011)

Atualmente há alguns materiais que tem a capacidade de melhorar as propriedades do CFC como as fibras e *whiskers*. A inserção das mais variadas fibras em uma matriz, no caso o cimento de fosfato de cálcio, aumenta a capacidade deste de suportar o estresse mecânico, transferindo a carga da matriz para as fibras por deformação de cisalhamento na interface formada entre o cimento e as fibras, ocorrendo essa transferência geralmente como resultado das diferenças de propriedades físicas da fibra e matriz. Assim, esse compósito resultante da incorporação das fibras ao cimento teria uma maior tenacidade à fratura, isso através do processo de frenagem da trinca e conseqüente aumento nas tensões de tração e flexão do compósito. (DOS SANTOS, 2002).

A nomenclatura *whisker* designa todas as fibras muito curtas e de diâmetro próximo ao micron apresentando uma razão de aspecto maior que 10, os *whiskers* possuem uma alta razão de aspecto e é caracterizada por uma alta pureza e uma resistência mecânica próximo ao osso cortical humano, levando ao aumento da resistência a uma propagação de uma trinca em cerâmicas, quando utilizados como elemento de reforço em compósitos. (BASU; BALANI, 2011; DONALD, 1989).



### 2.4.2 Wollastonita

A Wollastonita ( $\beta$ - CaSiO<sub>3</sub>) é uma vitrocerâmica desenvolvida com mais sucesso clínico atualmente. Devido a sua microestrutura ela possui melhores propriedades mecânicas e maior bioatividade que os biomateriais utilizados atualmente. A bioatividade superior demonstrada por essa vitrocerâmica se deve ao fato de que ela é constituída a base de silício. (AZA et al., 2007; DOMINGUES, 2013).

Estudos têm sido dirigidos a fim de identificar os mecanismos envolvidos na função biológica do silício para a produção de novos biomateriais a base de sílica. Estudos *in vitro* com materiais a base de silício mostraram que ele pode agir na secreção de proteínas, sobrevivência celular, apoptose e influenciar no metabolismo de células osteoblásticas envolvidas no processo de mineralização. (SHIE; DING; CHANG, 2011).

Quando uma vitrocerâmica é implantada ocorre a formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada (CHA) em sua superfície igualmente aos vidros bioativos. A esta camada também é atribuída a capacidade de ligação com o tecido ósseo. Devido a semelhança estrutural e química da CHA com o tecido ósseo é esperado que haja proliferação de osteoblastos na interface do osso – implante. (AZA et al., 2007).

A boa compatibilidade, bioatividade e propriedades mecânicas da Wollastonita a torna um biomaterial promissor para ser utilizado na reconstrução, substituição ou reparo do tecido ósseo na área biomédica, podendo ser aplicada de forma isolada ou em conjunto com outros biomateriais a fim de melhorar as propriedades destes. (AZA et al., 2007).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVOS GERAIS**

Avaliar o comportamento de um novo biomaterial a base de cimento fosfato de cálcio acrescido de *whisker* de Wollastonita *in vivo*.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Avaliar a biocompatibilidade do  $\alpha$ TCP acrescido de *whiskers* de wollastonita *in vivo*.
2. Analisar a bioatividade, bioreabsorção e osteocondução do  $\alpha$ TCP acrescido de *whiskers* de wollastonita *in vivo* em diferentes períodos de tempo, por meio de:
  - Análise Histomorfométrica.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Princípios éticos

O protocolo experimental está de acordo com os princípios éticos de experimentação com animais adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp (número 2810-1). (Anexo).

### 4.2 Protocolo Animal

Para o estudo *in vivo* o modelo escolhido foi o rato da linhagem *Wistar* proveniente do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) – UNICAMP.

Foram utilizados 30 ratos albinos (*Rattus norvegicus*), machos da linhagem *Wistar* com oito semanas de idade mantidos em estantes ventiladas com controle de claro e escuro.

PERÍODO DE OBSERVAÇÃO	GRUPO $\alpha$ TCP	GRUPO $\alpha$ TCPW
30 DIAS	n= 5 RATOS	n= 5 RATOS
90 DIAS	n= 5 RATOS	n= 5 RATOS
120 DIAS	n= 5 RATOS	n= 5 RATOS

Tabela 1: Distribuição da população de acordo com o grupo experimental e com o período de eutanásia do animal. Grupo  $\alpha$  TCP (implante com apenas  $\alpha$ TCP), Grupo  $\alpha$  TCPW (implante com  $\alpha$ TCP acrescido de 10% de whiskers de wollastonita).

### 4.1 Preparação dos biomateriais

O material utilizado no presente estudo foi desenvolvido pelo Instituto de Química da UNICAMP sob a supervisão do Prof. Dr Celso Aparecido Bertran. Este material consiste em um CFC a base de  $\alpha$ -TCP reforçado com “*whiskers*” de Wollastonita. Resumidamente, o alfa fosfato tricálcico foi obtido pela reação no estado sólido de carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>, CC-RC, Synth) e monetita (CaHPO<sub>4</sub>, M-RC, Synth) a 1300°C durante 6 horas. Os “*whiskers*” de Wollastonita foram sintetizados pelo método de fusão de sais. Os pós de  $\alpha$ -TCP e “*whiskers*” de Wollastonita foram então, misturados nas proporções de 10% em massa de “*whiskers*”. Para obtenção dos cimentos os pós

foram adicionados a uma solução aquosa contendo 2,5% em massa de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (fosfato de sódio bibásico anidro) (MOTISUKE, 2010).

Depois de misturados a esta solução os pós se transformaram em uma pasta como demonstrado na figura 1.

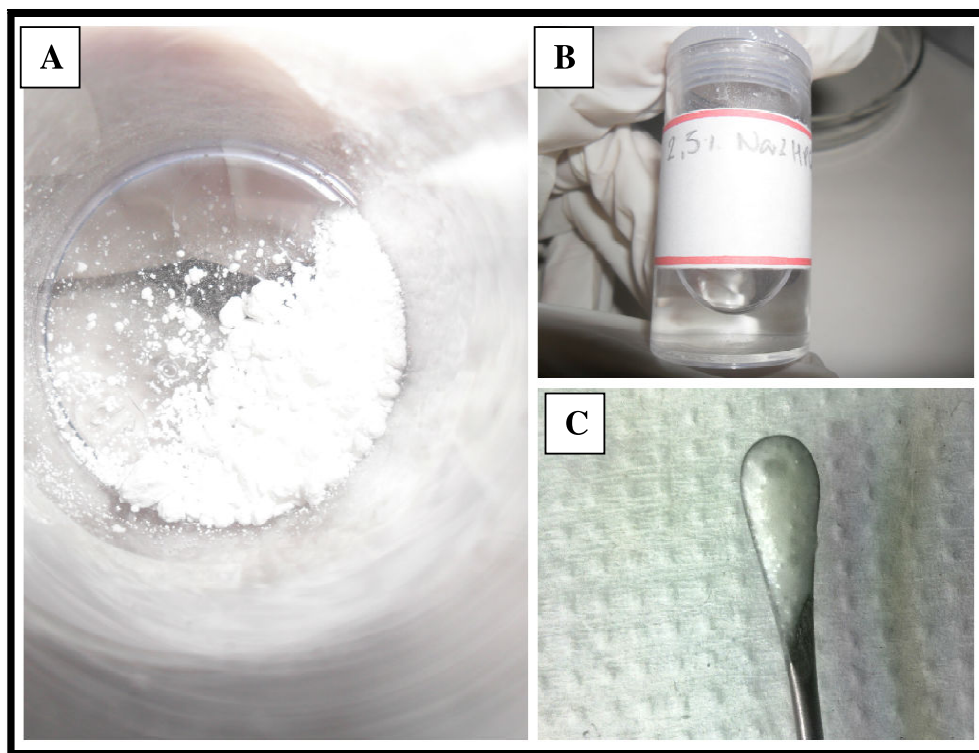


Figura 1: (A) Biomaterial em pó. Fig. 1 (B) Solução aquosa contendo 2,5% em massa de fosfato de sódio bibásico anidro. Fig. 1 (C) Pasta decorrente da mistura do pó com a solução aquosa.

#### 4.2 Implante Intra-ósseo

Nessa etapa os animais foram anestesiados com Cloridrato de Cetamina e Xilazina na proporção de 1:1 com uma dose de 0,15 ml/100 g de peso, em seguida foi realizada a tricotomia do crânio e assepsia com álcool 70%. Após isso, foi realizada uma incisão sagital mediana do crânio rebatendo o periósteo e realizando um defeito no osso parietal direito com um punch cirúrgico, o fragmento ósseo circular, com diâmetro crítico de 5 milímetros, foi retirado (Fig. 2 A); o biomaterial em forma de pasta foi moldado no defeito logo após a lesão (Fig. 2 B), depois disso o periósteo e a pele foram suturados (Fig. 2 C, Fig. 2 D). Uma vez suturada, foi aplicada o antibiótico Rifamicina a fim de

prevenir infecções. O analgésico Dipirona Sódica na dose de 875mg/Kg foi administrado, via oral, nos cinco dias seguintes a cirurgia. Os animais foram divididos em 2 grupos de 15 animais cada. Em um dos grupos foi implantado o  $\alpha$  TCP sem nenhum tipo de reforço (grupo  $\alpha$ TCP) , num segundo grupo foi implantado o  $\alpha$  TCP reforçado com 10% de “whiskers” de wollastonita (grupo  $\alpha$ -TCPW). Foi removido o osso parietal para análise histológica e morfométrica.

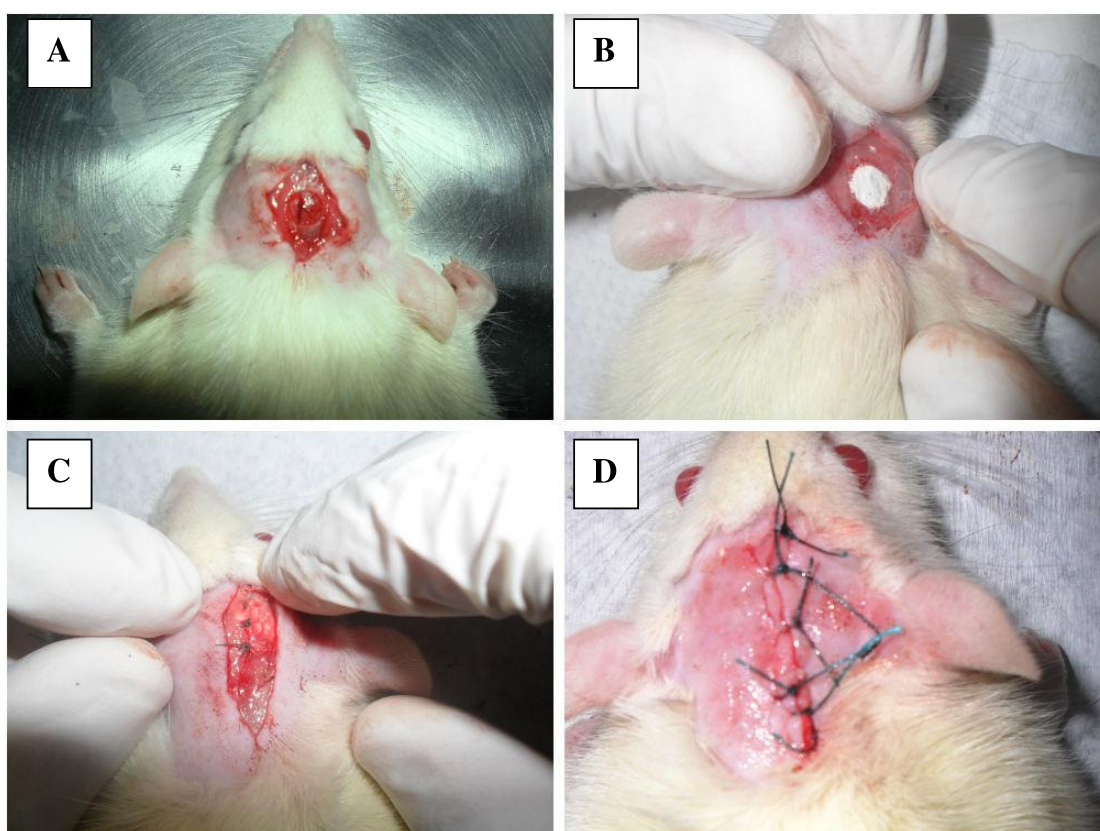


Figura 2: (A) Defeito confeccionado na calota craniana. Fig. 2 (B) Biomaterial inserido na cavidade experimental. Fig. 2 (C) Sutura do periósteeo. Fig. 2 (D) Sutura da pele.

### 4.3 Eutanásia e Obtenção dos Espécimes

Os ratos foram eutanasiados 30, 90 e 120 dias após procedimento cirúrgico através do aprofundamento de anestesia (Solução 1:1 de Cloridrato de Cetamina e Xilazina na dose 0,30ml/100g). A inspeção mostrou que não havia nenhum sinal de inflamação ou infecção na região operada.

A calota craniana foi removida (Fig.3). Depois de retirados os espécimes foram colocados em solução formol 10% 0,1 M pH 7,3 por 48 horas a temperatura ambiente. Feito isso, foram lavados com água corrente overnight e colocados em álcool 70% e logo em seguida colocados em solução de EDTA<sup>®</sup> 5%.O EDTA<sup>®</sup> 5% foi trocado a cada dois dias durante 8 semanas para a descalcificação. Os espécimes foram desidratados em baterias de soluções alcoólicas em concentrações graduais e crescentes totalizando 6 horas, diafanizados em xilol (2 horas) e embebidos em parafina líquida para confecção dos blocos para microtomia.

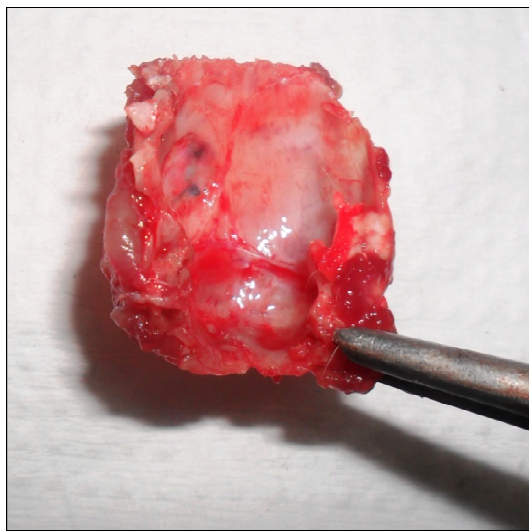


Figura 3: Calota craniana retirada.

#### 4.4 Microscopia de luz

Para o preparo das lâminas histológicas, os blocos foram cortados com espessura de 6  $\mu\text{m}$  em micrótomo rotativo manual modelo Leica RM2125RT e em seguida corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricromico de Masson. As secções histológicas foram examinadas com auxílio de um fotomicroscópio da marca Nikon modelo 80i com objetivas de 2x, 4x e 10x e suas imagens foram capturadas por uma câmera Nikon modelo DS-Ril (Fig. 4).

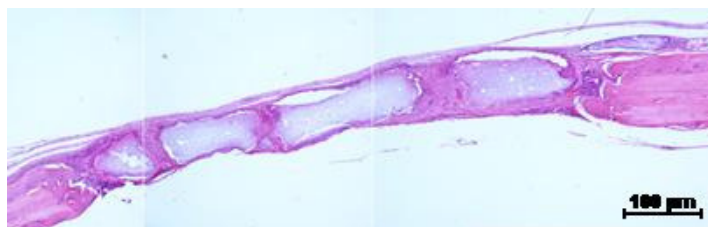
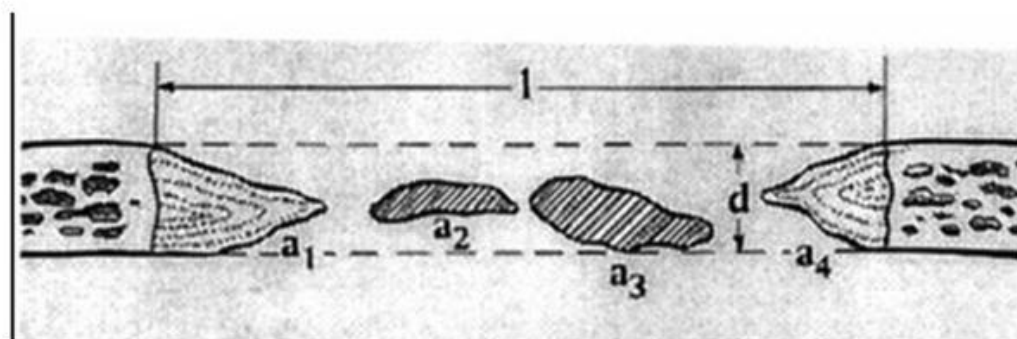


Figura 4: Montagem das diferentes imagens da mesma lâmina demonstrando corte do parietal com neoformação óssea e resquícios de biomaterial .

#### 4.5 Análise Morfométrica

A quantificação em porcentagem do osso neoformado no interior do defeito foi baseada no estudo de Gosain *et al.*(2000) . O osso neoformado dentro dos defeitos foi determinado pela porcentagem de osso neoformado dentro do defeito e calculada com base na área transversal do osso novo dentro do defeito em relação à área do defeito inicial. (Fig. 5). As medidas morfométricas das imagens das secções histológicas foram feitas com o software *NIS-Elements: Advanced Research 3.0*.



$$\begin{aligned}
 &\text{ÁREA DE OSSO NOVO: } \text{ÁREA } (a_1 + a_2 + a_3 + a_4) \\
 &\text{ÁREA DO DEFEITO INICIAL: } l \times d \\
 &\text{PORCENTAGEM DE OSSO NOVO} \\
 &= \frac{\text{ÁREA DE OSSO NOVO}}{\text{ÁREA DO DEFEITO INICIAL}} \times 100
 \end{aligned}$$

Figura 5: Método de Gosain et al. (2000) para o cálculo do osso neoformado. (Adaptado)

#### 4.6 Maceração

Para a demonstração do não fechamento total do defeito as calvárias de 120 dias foram submetidas ao processo de maceração com peróxido de hidrogênio. O processo de maceração consiste no descarnamento, ou seja na retirada do tecido mole sem que haja dano às superfícies ósseas, sendo realizada com materiais cirúrgicos de dissecação. Após isso ocorre a maceração propriamente dita que consiste na manutenção de estruturas anatômicas em substâncias específicas para dissolver elementos não ósseos. (AURICCHIO; SALOMÃO, 2002; SILVEIRA; TEIXEIRA; OLIVEIRA, 2008). As calvárias do presente estudo permaneceram por dois dias na solução de peróxido de hidrogênio.

#### 4.7 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizado através do programa GraphPad Prism 5. Na comparação entre os grupos os valores percentuais de neoformação óssea foram submetidos à análise estatística descritiva (média e desvio padrão) sendo apresentada na forma de tabelas. Os dados de preenchimento ósseo foram simétricos por isso foi aplicado o



teste *t Student Paramétrico* para os pares de tratamento. O teste *t* compara dois grupos, calcula a diferença entre cada conjunto de pares e analisa se estas diferenças são significativas (ARANGO, 2001). Todos os testes foram feitos com 5% de nível de significância.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Análise Macroscópica dos defeitos ósseos**

Após a eutanásia dos animais e a remoção das calotas cranianas foi possível observar macroscopicamente o padrão de ossificação dos defeitos ósseos, nos diferentes períodos de tempo e comparar os grupos de forma descritiva como segue.

#### **5.1.2 Análise descritiva dos grupos de 30 dias**

Tanto o grupo G1 ( $\alpha$  TCP) quanto o grupo G2 ( $\alpha$  TCP acrescido de *whiskers* de wollastonita) apresentaram resquícios do biomaterial implantado na área do defeito e presença de tecido mole. (Fig.6 A).

#### **5.1.3 Análise descritiva dos grupos de 90 dias**

Ambos os grupos apresentavam áreas de osso neoformado na periferia do defeito no entanto não houve fechamento total do defeito em nenhuma calvária. Algumas espécimes de ambos os grupos ainda apresentavam resquícios do biomaterial. (Fig. 6 B).

#### **5.1.4 Análise descritiva dos grupos de 120 dias**

Nenhuma calvária apresentou fechamento total do defeito em ambos os grupos após 120 dias de implantação do biomaterial. Já não havia resquícios de biomaterial tanto no grupo (TCP) quanto no grupo (TCPW) sugerindo que o biomaterial foi reabsorvido pelo organismo. Notou-se neoformação óssea nas bordas do defeito. (Fig. 6 C). Para avaliação macroscópica da resposta do tecido á presença dos biomateriais as calvárias dos grupos de 120 dias foram submetidas ao processo de maceração com Peróxido de Hidrogênio. (Fig. 7).

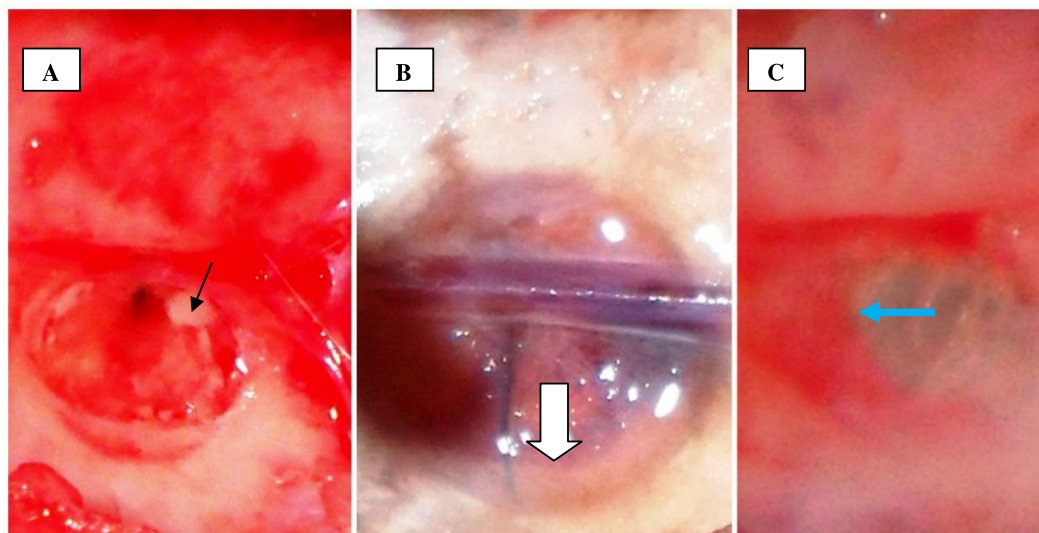


Figura 6: (A) Defeito ósseo preenchido por tecido mole com resquícios de biomaterial implantado (seta preta). Em (B) seta branca indica neoformação óssea após 90 dias. Em (C) seta azul indica neoformação óssea após 120 dias . Grupo TCPW.

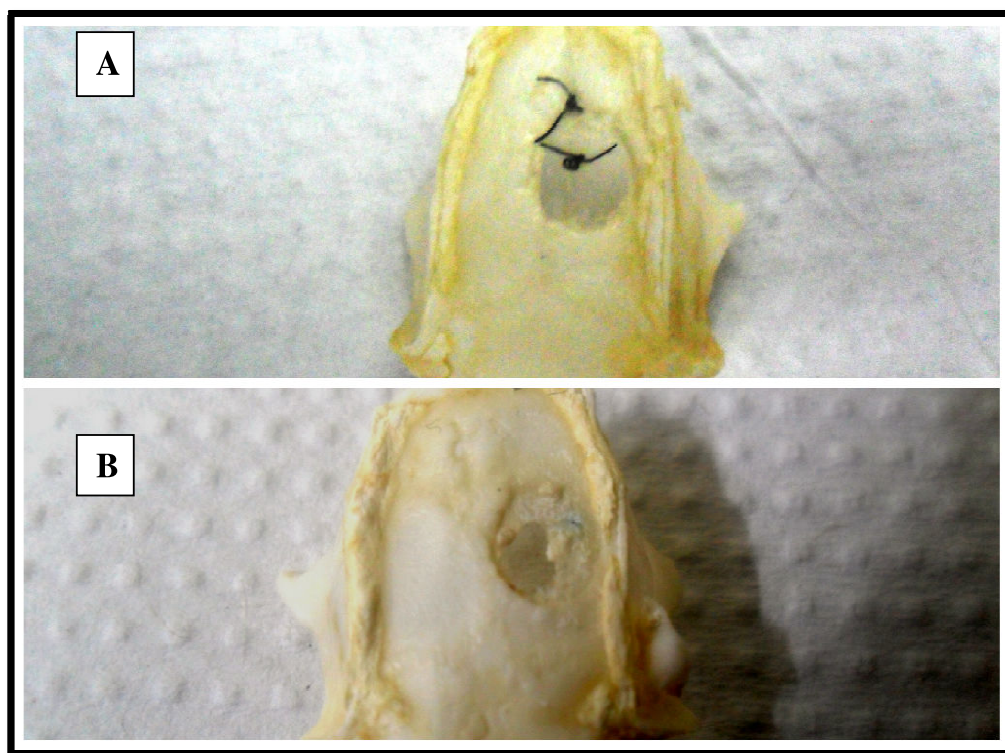


Figura 7: (A) Calvária grupo TCP 120 após maceração. Fig. 7 (B) calvária grupo TCPW 120 dias após maceração. Demonstrando que não houve fechamento total do defeito após 120 dias.

## 5.2 Análise Morfométrica

Não foi observado o fechamento total de nenhum defeito nos diferentes períodos de tempo. Nos grupos de 30 dias foi possível diferenciar o osso maduro do osso neoformado delimitado por uma linha cimentante, a neoformação óssea ocorreu predominantemente na periferia do defeito. O biomaterial estava presente em ambos os grupos, houve também presença de fibrina ao longo do defeito. (Fig. 10).

Aos 90 dias foi observada uma maior neoformação óssea principalmente no grupo reforçado com *whisker* de wollastonita, visualizamos a formação de osso novo não só na borda do defeito, mas também ao redor do cimento. (Fig. 12,13).

No período de 120 dias o tecido ósseo imaturo ficou indistinguível do osso maduro como aconteceu nos grupos de 90 dias. Houve uma estabilização da neoformação óssea no grupo  $\alpha$  TCPW120 dias. (Fig. 14)

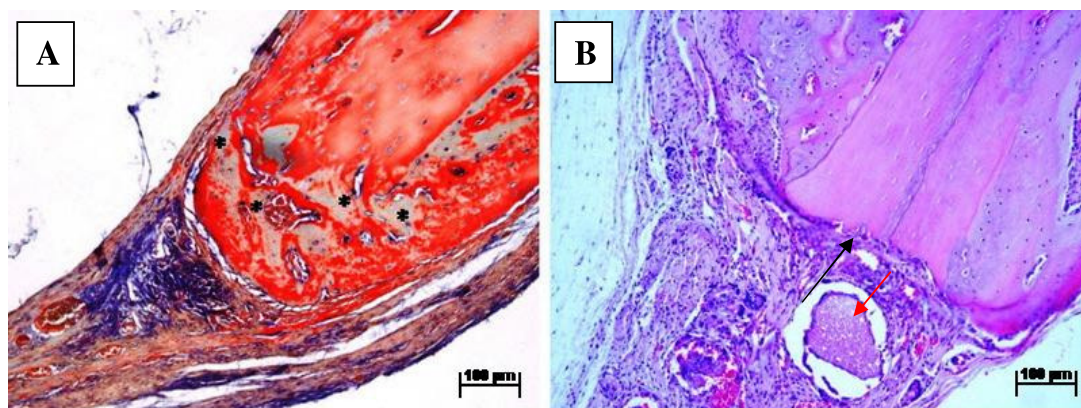


Figura 8: Em A (\*) Indicam presença de uma linha cimentante separando o osso maduro de osso neoformado (grupo tcpw30) corte histológico corado com Tricômico de Masson. Em B seta preta indica a borda do defeito e seta vermelha indica resquício de biomaterial (grupo tcp30) corado em HE.

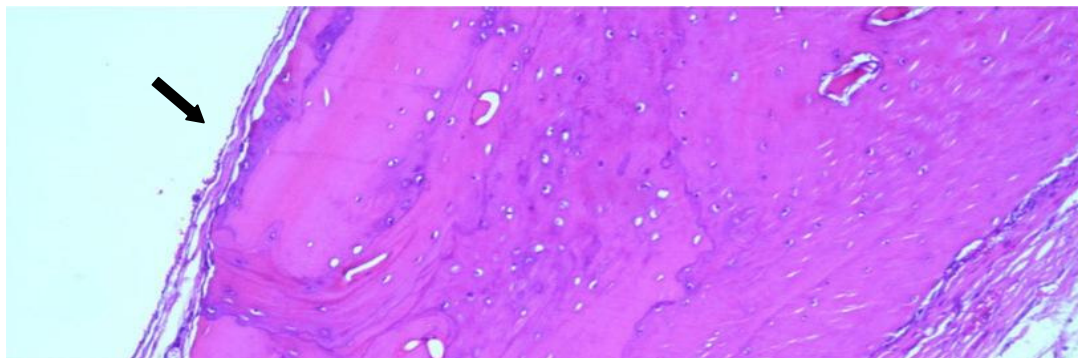


Figura 9: Seta larga indica que a dura-máter permaneceu intacta em todos os cortes, corado em HE.

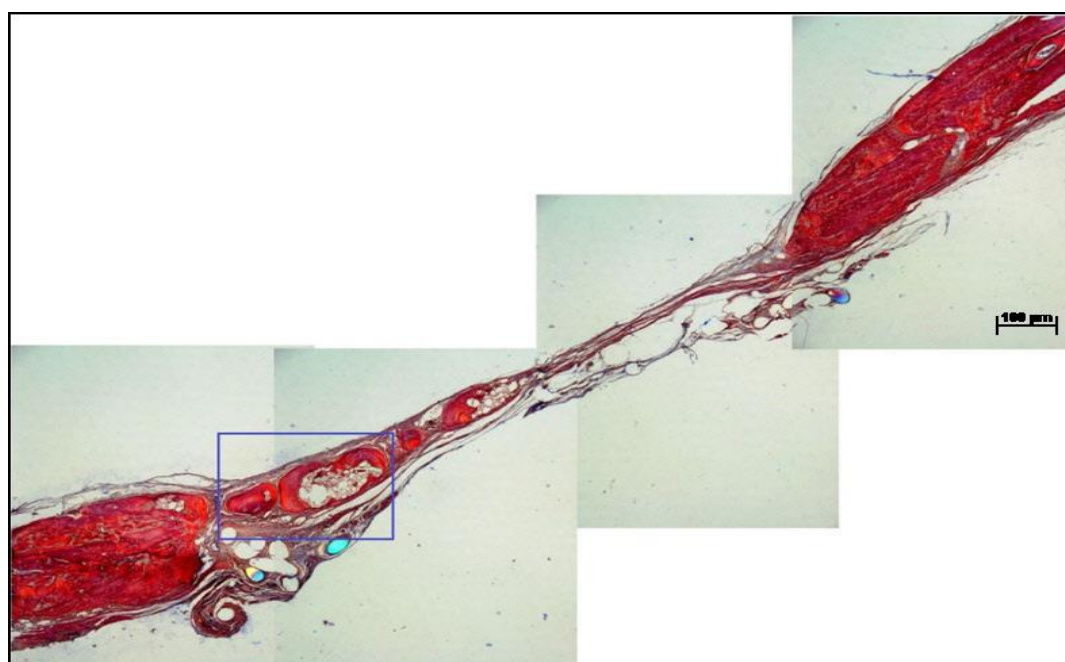


Figura 10: Fotomicrografia demonstrando a área do defeito ósseo. Montagem das diferentes imagens da lâmina. Grupo 90 dias corado em Tricômico de Masson.



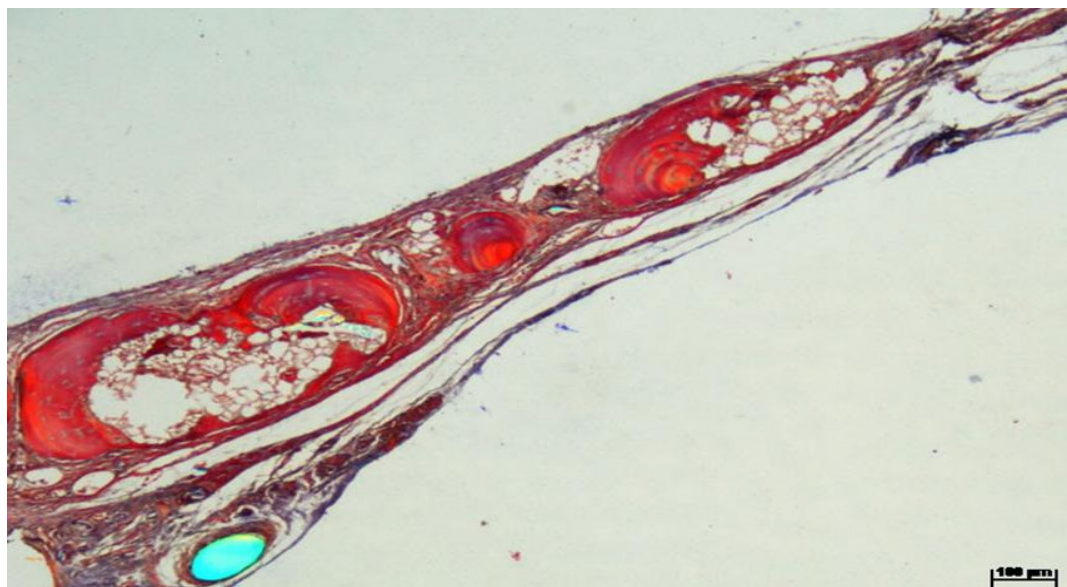


Figura 11: Fotomicrografia demonstrando neof ormation óssea ao longo do defeito. Corte histológico corado com Tricômico de Masson. Grupo 90 dias.

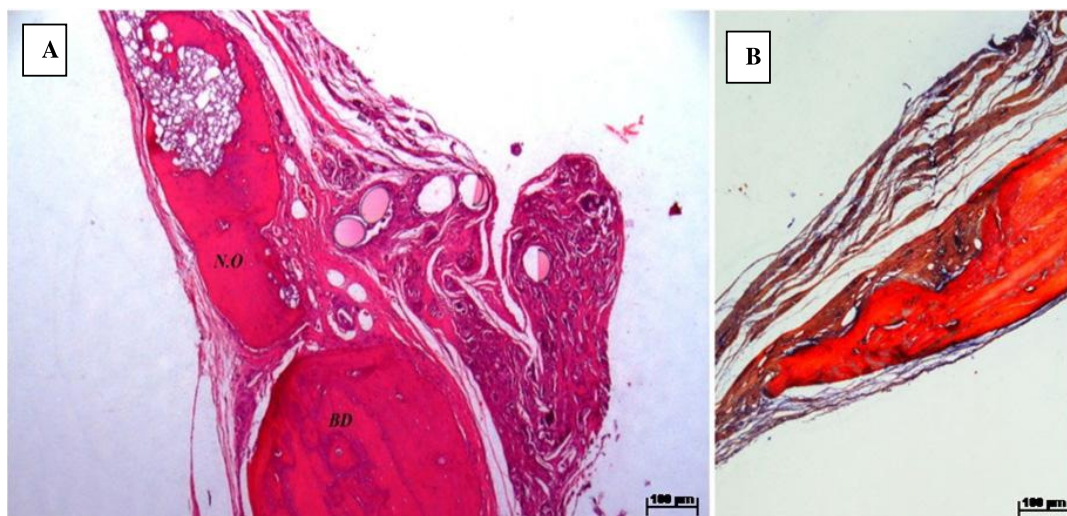


Figura 12: Em A (NO) indica neof ormation óssea. (BD) indica borda do defeito. Corte histológico corado em HE. Fig. 12 B demonstra que não há presença da linha cimentante separando o osso maduro do osso neof ormado tornando-os indistinguíveis. Corte corado em Tricômico de Masson. Grupo 120 dias.

### 5.3 Análise Estatística

#### 5.3.1 Grupo $\alpha$ TCP 30 dias X $\alpha$ TCP com whiskers de wollastonita 30 dias.

Comparando o grupo  $\alpha$ TCP30 e  $\alpha$ TCPW30 notou-se maior neoformação óssea no grupo com reforço de *whiskers* de wollastonita. O grupo  $\alpha$ TCP 30 dias apresentou média de osso neoformado de 2,25% enquanto no grupo  $\alpha$ TCPW 30 a média de osso neoformado foi de 4,53% (tab.1). Sendo essa diferença estatisticamente significativa. Nos dois grupos é possível visualizar a borda do defeito e áreas de neoformação óssea e resquício de biomaterial ao longo do defeito.

GRUPOS 30 DIAS			
GRUPOS	MÉDIA (%)	DESVIO PADRÃO (%)	p
$\alpha$ TCP30	2,25	0,33	0,04
$\alpha$ TCPW30	4,53	0,74	

Tabela 2: Média da área de osso neoformado e desvio padrão. Apresenta diferença estatisticamente significativa.

#### 5.3.2 Grupo $\alpha$ TCP 90 dias X $\alpha$ TCP com whiskers de wollastonita 90 dias.

Aos 90 dias a média de área de osso neoformado foi de 2,80% no grupo  $\alpha$ TCP90 e de 5,08% no grupo  $\alpha$ TCPW90 (tab.2). Mais uma vez a diferença se mostrou estatisticamente significativa.

GRUPOS 90 DIAS			
GRUPOS	MÉDIA (%)	DESVIO PADRÃO (%)	p
$\alpha$ TCP90	2,80	0,63	0,02
$\alpha$ TCPW90	5,08	0,18	

Tabela 3: Média da área de osso neoformado e desvio padrão após 90 dias. Apresenta diferença estatisticamente significativa.

### 5.3.3 Grupo $\alpha$ TCP 120 dias X $\alpha$ TCP com whiskers de wollastonita 120 dias.

No período de 120 dias pós-operatório o grupo contendo *whiskers* de wollastonita obteve média de neoformação óssea de 3,76%, já grupo  $\alpha$  TCP120 de 2,93%. A diferença entre os dois grupos não foi estatisticamente significativa.(tab. 4).

GRUPOS 120 DIAS			
GRUPOS	MÉDIA (%)	DESVIO PADRÃO (%)	p
$\alpha$ TCP120	2,93	0,95	0,2
$\alpha$ TCPW120	3,76	1,76	

Tabela 4: Média da área de osso neoformado e desvio padrão após 120 dias. Não houve diferença estatisticamente significativa.



## 6. DISCUSSÃO

Com o aumento da expectativa de vida da população mundial houve aumento da incidência de patologias relacionadas a estrutura óssea, tornando um problema de saúde pública. Atualmente diversos trabalhos alertam para a priorização de políticas públicas voltadas a patologias osteoarticulares e para o desenvolvimento e aprimoramento de novos materiais ou dispositivos que podem ser utilizados para correção dos problemas e melhora da qualidade de vida dos pacientes (GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

Hoje existem algumas opções para restaurar, restabelecer ou substituir estruturas ósseas danificadas devido a traumas ou doenças crônicas. Os enxertos ósseos autógenos possuem características essenciais para um bom material, no entanto para obtenção deste tipo de enxerto se faz necessária cirurgia adicional para remoção do osso a ser enxertado, elevando custos com o procedimento, aumentando o risco de morbidade da área doadora no pós-operatório, submetendo o individuo a dor adicional (FINKEMEIER, 2002).

Com o avanço da engenharia tecidual os biomateriais têm sido uma opção viável para aplicação na área biomédica. Dentre os biomateriais mais estudados esta a classe das cerâmicas que se sobrepõe ao enxerto ósseo autógeno, visto que este material não tem limitações em relação à quantidade disponível e não necessita de um procedimento cirúrgico adicional (GUTIERRES et al., 2005).

No entanto, devido à fragilidade apresentada por estas cerâmicas elas se tornam restritas a locais que demandam menos carga, por isso se faz necessária a inserção de materiais a fim de aprimorar as propriedades das cerâmicas e ampliar seu uso em cirurgias ortopédicas. Por este motivo foi avaliado um novo biomaterial composto pelo alfa fosfato tricálcio acrescido de *whiskers* de wollastonita *in vivo*.

O substituto ósseo deve ser rigorosamente testado para que posteriormente seja indicado para a implantação em humanos. Atualmente, ratos e coelhos são utilizados como modelos experimentais para avaliar os biomateriais. Segundo estudos a resposta tecidual depende do sítio em que o biomaterial é implantado; sendo que a regeneração é mais bem observada em ossos corticais e a degradação do material em tecido ósseo medular (DOS SANTOS, 2002).

Em nosso estudo utilizamos ratos da linhagem Wistar como modelo experimental e realizamos um defeito crítico no parietal para avaliar a implantação de um novo

biomaterial. O defeito crítico refere-se a uma lesão que não se regenera espontaneamente a não ser que um enxerto seja usado. Estudos com animais evidenciam que um defeito de 5 milímetros de diâmetro já não é passível de regeneração. O conceito de defeito crítico possibilita a avaliação do potencial osteogênico do material testado. Quando há um defeito crítico no qual não há implantação de enxertos ósseos ou implantes o reparo tecidual ocorre através de tecido conjuntivo fibroso ao invés de tecido ósseo (PORTO et al., 2012; SCHWENGBER, 2009).

Apesar de alguns estudos utilizarem defeitos críticos de 8 mm de diâmetro em ratos, outros também utilizam defeitos com diâmetros de 6 e 5 milímetros para avaliar o diferentes enxertos e biomateriais com a adição ou não de fatores de crescimento. Mulliken; Glowacki, 1980 realizaram defeitos de 4 milímetros no parietal de ratos e constataram que mesmo após 6 meses não foi verificado reparo total do defeito. Além disso, Grandi em 2007 realizou estudo no qual não houve fechamento do defeito de 4 milímetros realizados na calvária de ratos após 120 dias. Estes dados são semelhantes aos dados encontrados em nosso estudo no qual não houve reparo completo do defeito mesmo após 120 dias. Entretanto Porto e colaboradores em 2004 constataram que houve fechamento completo do defeito em dois dos cinco ratos com defeito crítico de 5 mm na calvária após 60 dias do procedimento cirúrgico.

O período de tempo pós-cirúrgico do nosso estudo foi determinado com base nos estudos de Marzouk e colaboradores (2007) e Grandi (2007) que estudaram o comportamento de biomateriais até a 16ª semana.

Em relação aos biomateriais utilizados em nossa pesquisa, são considerados materiais adequados devido as suas características de biocompatibilidade, osteocondução e bioatividade. A Hidroxiapatita foi por vários anos a única cerâmica do sistema dos fosfatos de cálcio utilizada na substituição ou reposição do tecido ósseo, entretanto, devido a sua lenta biodegradação, outros fosfatos como o TCP começaram a chamar atenção devido sua melhor solubilidade o que o leva a ser degradado mais rapidamente no meio biológico (GUASTALDI; APARECIDA, 2010). Dentre os fosfatos de cálcio utilizados como biomateriais o  $\alpha$  TCP se apresenta mais reabsorvível, em relação ao  $\beta$  TCP, tornando-o um bom material para implantação; sendo capaz de ser substituído por osso novo mais

rapidamente do que os outros materiais disponíveis hoje no mercado (CARRODEGUAS; DE AZA, 2011).

Além disso, a característica principal para que o biomaterial possa ser implantado é a biocompatibilidade, isto é, o material não deve conter elementos que causem danos ao tecido (AZA et al., 2007). Este biomaterial acrescido de 10% *whiskers* de wollastonita foi previamente analisado *in vitro* por Domingues (2013) que primeiramente converteu o  $\alpha$ -TCP em hidroxiapatita deficiente de cálcio (CDHA) para que pudesse ser imerso em meio de cultura. Após 3 dias de imersão o equilíbrio iônico foi atingido e as células se mantiveram vivas por mais de 48 horas constatando que o material não provocava citotoxicidade. Outros pesquisadores como Grandi (2010) e Schwengber (2009) que analisaram o  $\alpha$ -TCP *in vivo* também atestaram que o biomaterial era biocompatível. Estes achados corroboram com os dados de nosso estudo em que tanto  $\alpha$ TCP quanto  $\alpha$ TCP acrescido de *whiskers* de wollastonita não desencadearam nenhuma resposta imunológica.

Outra característica importante do  $\alpha$ -TCP é a bioatividade que permite a formação de uma camada de hidroxiapatita em sua superfície, logo após sua implantação, e esta camada promove uma forte ligação entre o material e o tecido ósseo (MUNDSTOCK et al., 2012). Além de apresentar a propriedade de osteocondução que consiste no processo em que o tecido ósseo é conduzido em um material através de poros ou canais (MOTISUKE, 2010).

Hoje em dia, busca-se melhorar as propriedades do  $\alpha$ -TCP e diminuir sua restrição a apenas implantes em locais que demandam menor carga, para isto são inseridas fibras ou *whiskers* como no caso do presente trabalho em que houve a adição de *whiskers* de Wollastonita. Se comparada a outros biomateriais a Wollastonita ( $\text{CaSiO}_3$ ), classificada como uma vitrocerâmica, possui vantagens como biocompatibilidade, bioatividade, estabilidade química e elevada resistência mecânica. Sua bioatividade é atribuída a presença de silício na sua composição o qual desempenha um papel importante nos eventos metabólicos para indução da neoformação óssea.

Estudos recentes revelam que a adição de várias quantidades de wollastonita pode melhorar a bioatividade, propriedades mecânicas e a biodegradação (KUNJALUKKAL PADMANABHAN et al., 2013). Diferenças estatísticas significativas foram encontradas nos ensaios da fosfatase alcalina, no qual as CDHAs contendo “*whiskers*” de wollastonita foram capazes de estimular a produção dessa enzima, sendo esse aumento proporcional a

concentração de “*whiskers*” de wollastonita (DOMINGUES, 2013). Confirmando os dados encontrados em nosso estudo no qual foi observada maior neoformação óssea com diferença estatisticamente significativa nos grupos com adição de 10% de *whiskers* de wollastonita após 30 e 90 dias de implantação. Aos 120 dias as diferenças entre as áreas de neoformação óssea no grupo  $\alpha$ TCPW em relação ao grupo  $\alpha$ TCP, não foram significativas, este achado pode ser explicado devido ao fato de que o  $\alpha$ TCP acrescido de *whiskers* de Wollastonita possui alta solubilidade e com a presença do silício sua biodegradação pode ser mais rápida. Esta alta taxa de biodegradação também foi encontrada no estudo de Kunjalukkal Padmanabhan em 2013, no qual os *scaffolds* contendo 50% de wollastonita e 50% de hidroxiapatita apresentaram maior biodegradação após 1º e 21º dia imersos em solução de Tris – HCl (solução de ácido clorídrico concentrado) comparando com *scaffolds* com apenas hidroxiapatita pura.

A superioridade demonstrada pelo material acrescido de *whiskers* de wollastonita aos 30 e 90 dias pode ser atribuída a presença do silício. Estes achados corroboram com os dados de Xue (2005) que demonstrou que a wollastonita estimulou maior neoformação óssea do que o grupo que continha titânio após 30 dias de implantação.

No que concerne a solubilidade, em ambos os grupos  $\alpha$ TCP e  $\alpha$ TCPW, não foi encontrado biomaterial dentro do defeito após 90 dias, confirmando que o material é solúvel. Uma das características importantes para que um material possa ser utilizado como *scaffold* na engenharia tecidual é sua biodegradação. Em 2005 Xue e colaboradores., constataram que o *scaffold* que continha wollastonita teve uma alta biodegradação após 21 dias. Assim, podemos inferir que o  $\alpha$ -TCPW pode ser mais uma alternativa a ser empregada na engenharia tecidual.

## 5. CONCLUSÃO

Frente aos resultados obtidos podemos inferir que o cimento a base de  $\alpha$ TCP acrescido de *whiskers* de wollastonita é biocompatível, característica principal para que possa ser utilizado como biomaterial.

O grupo TCPW mostrou maior neoformação óssea após 30 e 90 dias, em relação ao grupo TCP, sendo que esta diferença se mostrou significativa, embora não tenha havido fechamento total do defeito nos períodos de tempo observados.

**REFERÊNCIAS:**

AALAMI, O. O. et al. Applications of a Mouse Model of Calvarial Healing: Differences in Regenerative Abilities of Juveniles and Adults. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 114, n. 3, p. 713–720, set. 2004.

AFONSO, A. S. **Interação entre Biomateriais e Tecido Ósseo**. Porto. Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, 1998.

ALONSO, L. M. **Avaliação de cimentos ósseos de Fosfatos de Cálcio com adições de Aluminato e Silicato de Cálcio**. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

ANDIA, D. C.; CERRI, P. S.; SPOLIDORIO, L. C. Tecido ósseo : aspectos morfológicos e histofisiológicos Tecido ósseo Células do tecido ósseo. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 35, n. 2, p. 191–198, 2006.

ANDRADE, A. D. et al. Biologia óssea : uma revisão da literatura. **Revista Implantnews**, v. 4, n. 6, p. 659–662, 2007.

ARANGO, H. **Bioestatística Teórica e Computacional**. 1. ed. Rio de Janeiro: 2001.

AURICCHIO, P.; SALOMÃO, M. D. G. **Técnicas de coleta e preparação de vertebrados para fins científicos e didáticos**. 2002.

AVOLIO, G. et al. O papel da vitamina D 3 e da osteocalcina no metabolismo ósseo: uma análise necessária para se otimizar a osseointegração. **Revista Isnt. Ciências e Saúde**. v. 26, n. 3, p. 347–350, 2008.

AZA, P. N. DE et al. Bioactive glasses ang glass-ceramics. **Boletín de la sociedad Espanõla de Cerámica y Vidrio**, n. c, p. 45–55, 2007.

BASU, B.; BALANI, K. Ceramics: Definition and Characteristics. In: **Advanced Structural Ceramics**. 1. ed. 2011.

BATISTA, P. S. P. **Diferenciação Osteoblástica de Células Mesenquimatosas do Tecido Adiposo de Rato na presença de Purmorfamina**, Dissertação (Mestrado) 2009. Universidade de Coimbra, Coimbra.

BLOOM, W.; FAWCETT, D. W. **Tratado de Histologia**. 10° ed. 1977. Rio de Janeiro. 940p.

BOSE, S. et al. Understanding in vivo response and mechanical property variation in MgO, SrO and SiO<sub>2</sub> doped  $\beta$ -TCP. **Bone**, v. 48, n. 6, p. 1282–90, 1 jun. 2011.

BOSKEY, A. L. **Bone and Cartilage Metabolism**. 2009, Dissertação (Mestrado), Universidade de Coimbra, Coimbra.

BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**. v. 423, n. May, p. 337–342, 2003.

CARRODEGUAS, R. G.; DE AZA, S.  $\alpha$ -Tricalcium phosphate: synthesis, properties and biomedical applications. **Acta biomaterialia**, v. 7, n. 10, p. 3536–46, out. 2011.

DOMINGUES, J. A. **Influência dos “whiskers” de Wollastonita em Cimento de Fosfato de Cálcio no comportamento de células osteoblásticas**, 2013 Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

DONALD, I. W. Review: Methods for improving the mechanical properties of glass. **Journal of materials**, v. 24, p. 4177–4208, 1989.

DÔRES, S. M. C. DAS; PAIVA, S. A. R. DE; CAMPANA, Á. O. Vitamina K: metabolismo e nutrição. **Revista de Nutrição**, v. 14, n. 3, p. 207–218, dez. 2001.

DOS SANTOS, L. A. **Desenvolvimento de Cimento de Fosfato de Cálcio Reforçado com Fibras para Uso na Área Médico-Odontológica**, 2002.

FINKEMEIER, C. G. Bone-grafting and bone-graft substitutes. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, v. 84-A, n. 3, p. 454–64, mar. 2002.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**. 2º ed. Rio de Janeiro 2003. 456 p.

GOSAIN, A; K. SONG, L; YU, P. et al. Osteogenesis in Cranial Defects : Reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF [beta] Isoforms. **Plastic and Reconstructive Surgery**. vol.106. p. 360-371, ago. 2000.

GRANDI, G. **Análise Histomorfométrica Comparativa entre o Cimento de  $\alpha$ -TCP e os grânulos de  $\beta$ -TCP / HA no reparo ósseo de calotas cranianas de ratos**. Dissertação (Mestrado) 2007, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. **Fosfatos de Cálcio de Interesse Biológico: Importância como Biomateriais, Propriedades e Métodos de Obtenção de Recobrimentos**. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1352–1358, 2010.

GUTIERRES, M. et al. Substitutos Ósseos Conceitos Gerais e Estado Actual. **Arquivos de Medicina** n. 9, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro, 1999

KAMITAKAHARA, M.; OHTSUKI, C.; MIYAZAKI, T. Review paper: behavior of ceramic biomaterials derived from tricalcium phosphate in physiological condition. **Journal of biomaterials applications**, v. 23, n. 3, p. 197–212, nov. 2008.

KAWACHI, E. Y. et al. Biocerâmicas Tendências e Perspectivas de uma área Interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 518–522, 2000.

KIERZENBAUM. **Histologia e Biologia Celular Uma Introdução à Patologia**. Rio de Janeiro, 2004, 654 p.

KUNJALUKKAL PADMANABHAN, S. et al. Wollastonite/hydroxyapatite scaffolds with improved mechanical, bioactive and biodegradable properties for bone tissue engineering. **Ceramics International**, v. 39, n. 1, p. 619–627, jan. 2013.

LEGEROS, R. Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. **Chemical reviews**, v. 108, n. 11, p. 4742–53, nov. 2008.

MARZOUK, K. M. et al. Osteoconductive effects of vinyl styrene microbeads in rat calvarial defects. **Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 65, n. 8, p. 1508–16, ago. 2007.

MOTISUKE, M. **Síntese de Cimento Ósseo a base de  $\alpha$ -TCP e Estudo da Influência do Mg e do Si em suas Propriedades Finais**. Tese (Doutorado) 2010. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MULLIKEN, J. B.; GLOWACKI, J. Induced Osteogenesis for Repair and Construction in the Craniofacial Region. **Plastic and reconstructive surgery**, 1980.

MUNDSTOCK, K. B. et al. Avaliação da Biocompatibilidade de vidro e vitrocerâmica do sistema SNCP (SiO<sub>2</sub>-Na<sub>2</sub>O-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). **Química Nova**, v. X, n. 00, p. 1–6, 2012.

NAKAMURA, H. Review Morphology , Function , and Differentiation of Bone Cells. **Journal of Hard Tissue Biology** p. 15–22, 2007.

NAVARRO, M. et al. Biomaterials in orthopaedics. **Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society**, v. 5, n. 27, p. 1137–58, 6 out. 2008.

PASSOS, S. P. et al. Occlusal trauma x periodontal tissue : action of the osteopontin and receptor activator of nuclear Kappa B Ligand. **Periodontia**. v. 19, 2009.

PORTO, G. G. et al. Is a 5 mm rat calvarium defect really critical ? **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 27, n. 11, p. 757–760, 2012.



SALLES, M. C. F. “**Fabricação de Compósitos com matriz de alumina reforçada com whiskers de mulita.**”2008.Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clinical orthopaedics and related research**, n. 205, p. 299–308, abr. 1986.

SCHWENGBER, M. M. B. **Reparo ósseo após enxerto ósseo autógeno e implante de hidroxiapatita absorvível granulada sob influência de campo magnético estático: estudo experimental em calvária de ratos.** Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SHIE, M.-Y.; DING, S.-J.; CHANG, H.-C. The role of silicon in osteoblast-like cell proliferation and apoptosis. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 6, p. 2604–2614, jun. 2011.

SILVEIRA, M. J.; TEIXEIRA, G. M.; OLIVEIRA, E. F. Análise de processos alternativos na preparação de esqueletos para uso didático. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 30, p. 465–472, 2008.

TORTORA, G. J. **CORPO HUMANO: Fundamentos de Anatomia e Fisiologia.**4° ed. Porto Alegre. 2003 574p.

XUE, W. et al. In vivo evaluation of plasma-sprayed wollastonite coating. **Biomaterials**, 2005.

ANEXO



CEUA/Unicamp

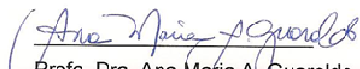
Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Estudo in vivo do Cimento de Fosfato de Cálcio Acrescido de "Whiskers" de Wolastonita: Um Novo Biomaterial" (protocolo nº 2810-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. José Angelo Camilli / Ana Cláudia de Souza, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 27 de agosto de 2012.

Campinas, 27 de agosto de 2012.

  
Prof. Dra. Ana Maria A. Guinaldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Dissertação de Mestrado** intitulada "Estudo *in vivo* do Cimento de Fosfato de Cálcio Acrescido de "Whiskers" de Wollastonita: Um Novo Biomaterial":

( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

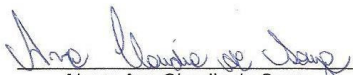
Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):


( ) CIBio - Comissão Interna de Biossegurança , projeto nº \_\_\_\_\_, Instituição: \_\_\_\_\_.

(X) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto nº 2810-1, Instituição: Universidade Estadual de Campinas.

( ) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº \_\_\_\_\_, Instituição: \_\_\_\_\_.

*\* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*


  
Aluna: Ana Claudia de Souza

  
Orientador: José Angelo Camilli

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:


(X) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura

 - STEPHEN HYSLOP - VICE PRESIDENTE

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

( ) Deferido ( ) Indeferido

  
Prof. Dr. ALEXANDRE LEITE RODRIGUES DE OLIVEIRA  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de  
Animais CEUA/UNICAMP

Carimbo e assinatura