



REDUÇÃO DA MORBILIDADE IATROGÉNICA NO LOCAL
DADOR DE ENXERTO ÓSSEO. ESTUDO DE
ALTERNATIVAS CIRÚRGICAS EM MODELO OVINO

2009



Doutoranda: Catarina Falcão Trigoso Vieira Branco Lavrador

171 319

Orientadores

Ramiro Doutel de Mascarenhas

Paulo Jorge Valejo Coelho

REDUÇÃO DA MORBILIDADE IATROGÉNICA NO LOCAL DADOR DE ENXERTO ÓSSEO. ESTUDO DE ALTERNATIVAS CIRÚRGICAS EM MODELO OVINO

Dissertação apresentada à Universidade de Évora para obtenção do
grau de Doutor em Medicina Veterinária

Doutoranda: Catarina Falcão Trigosso Vieira Branco Lavrador

Orientadores	Ramiro Doutel de Mascarenhas
	Paulo Jorge Valejo Coelho

PREFÁCIO

PREFÁCIO

Após largos meses de escrita acabo por fazer desta minha última página a primeira página deste texto.

Fui pela primeira vez ao pólo do ITB, Instituto de Tecnologia Biomédica, em Santarém no ano 2000 com o Professor Doutor Ramiro Mascarenhas para acompanhar a componente prática do trabalho de doutoramento do Professor Doutor Paulo Coelho, "Contribuição para o estudo da regeneração óssea mandibular consecutiva a perdas de substância".

Dessa visita resultou um enorme entusiasmo com o tema de investigação do projecto em curso e com grau de profissionalismo e empenho com que ali se trabalhava, aliado a um enorme dinamismo e capacidade de resposta a situações por vezes inéditas, que sempre acompanham qualquer trabalho de investigação que envolva experimentação animal. Desse entusiasmo dei conta ao Professor Doutor Ramiro Mascarenhas e ao Professor Doutor Paulo Coelho.

O Professor Doutor Paulo Coelho que tinha na altura alguns trabalhos em curso na Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen Research Institute, AO/ARI, onde se deslocava com frequência, soube através do Professor Doutor Sylwester Gogolewski, colaborador da AO/ARI, que ele e a sua equipa procuravam um investigador que pudesse desenvolver um trabalho de investigação da área da regeneração óssea em defeitos críticos, utilizando um substituto à base de poliuretano. Desde o início que este trabalho muito me entusiasmou pela possibilidade de poder perspectivar novos rumos na minha carreira profissional, bem como a possibilidade de poder contribuir para um pequeno passo na longa caminhada que é o processo de regeneração de defeitos ósseos críticos.

Assim, em Março de 2003 iniciámos o longo trabalho que hoje aqui terminamos, diria que após um longo e árduo caminho pelas vias de investigação científica. As dificuldades com que nos deparámos foram inúmeras, muito motivadas pela falta recorrente de apoio financeiro para realizar a componente prática deste dispendioso projecto.

O facto deste caminho ter sido longo e por vezes tortuoso, permitiu-me

perceber que muitos dos trabalhos de investigação são também, em si mesmos, verdadeiras provas de resistência física e mental aos candidatos.

Ao longo destes anos foram inúmeros os dias em que cheguei ao fim com a sensação de ter “partido muitas pedras” mas nada ter construído com elas. Tenho sempre presente a imagem de mim própria rodeada de uma imensa quantidade de pedras lindas e fundamentais para construir um muro sólido mas na verdade o muro tardava a erguer-se. Sei que olhando para trás todas estas etapas foram fundamentais para o meu crescimento como cientista e como pessoa. Não só agora tenho a satisfação de constatar que houve crescimento ósseo, como houve claramente um crescimento de mim própria como pessoa.

Este muro acabou por ser concluído graças às pessoas que ao longo deste tempo me acompanharam. Verdadeiramente todos sabemos como somos feitos da matriz de relações com as pessoas de quem estamos próximos mas creio nunca ser demais lembrá-lo e, nesse sentido, gostaria de agradecer de forma sentida a quem ao longo deste caminho foi contribuindo quer afectiva quer financeiramente, para que este trabalho aqui chegasse, espero que com algum sucesso.

Não poderia começar no extenso rol de pessoas a quem sinto a necessidade de agradecer sem ser pelo Professor Doutor Ramiro Mascarenhas, pelo seu inestimável apoio e a forma calorosa como sempre encarou este projecto. Gostaria de salientar o rigor que sempre impôs na revisão dos textos. Não posso também deixar de louvar o seu pragmatismo, tão importante em alturas de efabulação do Professor Doutor Paulo Coelho. Gostaria de salientar a honra de ter aceite ter aceite ser meu orientador e ainda, o facto de ter assumido a leccionação das minhas aulas práticas de anestesiologia, semiologia cirúrgica e técnicas operatórias durante a minha longa ausência.

Ao Professor Doutor Paulo Coelho o seu permanente incentivo na persecução dos trabalhos e o sempre infinito optimismo mesmo nas situações mais complicadas com que nos deparámos. Gostaria também de agradecer o facto que muito me honrou, de ter sido meu orientador. Dificilmente teríamos chegado a este ponto sem o seu apoio.

Ao Professor Doutor Sylwester Gogolewski pelo seu imenso contributo para este trabalho pois sem os seus biomateriais nada disto seria possível.

À Professora Doutora Elsa Duarte todas as críticas construtivas e muito irónicas que foi fazendo ao longo dos tempos e a amizade que sempre demonstrou.

À Dr.^a Sandra Branco toda a amizade, boa disposição e sentido de humor que imprimiu a esta fase da minha carreira.

A todos os colegas do Hospital Veterinário pelo apoio prestado.

À Eng.^a Luisa Fialho todo o tempo e profissionalismo empregues ao longo do processamento histológico deste trabalho.

Ao Laboratório de Histologia de tecidos duros da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, nas pessoas do seu director Professor Doutor Fernando Guerra e da técnica Dr.^a Cláudia Brites. Só eles, apesar das inúmeras dificuldades que foram surgindo, permitiram que pudéssemos obter excelentes lâminas histológicas.

Ao hospital escolar da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa nas pessoas do seu director Professor Doutor António Ferreira e Dr.^a Sandra de Jesus o apoio prestado na execução e interpretação das tomografias axiais computadorizadas.

À Dr. Maria de Lurdes Orvalho e à sua equipa do centro distrital de Lisboa Gentil Martins do Instituto Português de Oncologia pela disponibilidade e imensa simpatia que sempre demonstraram durante a realização e interpretação das macrorradiografias.

Ao Professor Doutor Jorge Leitão pela forma como me acolheu no Instituto de Tecnologia Biomédica.

À Eng.^a Isaura Giraldo pela extraordinária capacidade de trabalho e aprendizagem. A sua presença tornou não só possível como divertido todo o trabalho cirúrgico desenvolvido.

A todo o pessoal técnico da Estação Zootécnica Nacional que colaborou na execução do trabalho prático.

À Professora Doutora Helena Ferronha e Dr.^a Ana Amaro pelo apoio dado na microscopia de fluorescência.

À Professora Doutora Isabel Dias pela amabilidade sempre demonstrada em todos os esclarecimentos pedidos.

À Professora Doutora Manuela Gomes do grupo 3B's pela complexa revisão de textos sobre polímeros e o fabrico de biomateriais.

Ao Professor Doutor Fernando Capela e Silva pela simpatia e disponibilidade sempre demonstrada ao longo deste trabalho.

Ao Professor Doutor Afonso de Almeida e à Dr.^a Mafalda Dourado pelos sábios conselhos académicos fornecidos, sobretudo no sentido de garantir suporte financeiro ao trabalho.

Ao Professor Doutor Alfredo Pereira pela análise estatística do trabalho e pela imensa disponibilidade na tentativa de me explicar os complicados meandros da estatística aplicada à biologia.

À minha avó Babá pela imensa importância afectiva da presença dela na minha vida. À Nita (sogra) por me apoiar de forma sempre tão alegre na logística de fazer uma tese de doutoramento com três filhos “debaixo das minhas saias”.

Aos meus pais e irmãos pois sei que a eles devo grande parte daquilo que sou.

Ao Luis e aos meus filhos por gostarem tanto de mim e ao seu incentivo permanente na persecução deste trabalho pois sei que sem eles tudo teria pouco sentido.

A partir deste trabalho jamais voltarei a olhar para os nós da madeira como, inocentemente, o fiz até agora. Em todas as cadeiras, mesas e soalhos passei, só e apenas, a ver osteónios e quase instintivamente a medir os seus diâmetros.

RESUMO/ABSTRACT

RESUMO

Em perdas de osso de grandes extensões o enxerto ósseo esponjoso autólogo é uma técnica frequentemente utilizada para o tratamento de defeitos ósseos críticos, sendo a tuberosidade da tibia e a crista ilíaca os locais mais utilizados para colheita de osso. Os defeitos monocorticais no ilíaco, resultantes da colheita de enxerto ósseo requerem períodos de regeneração longos e os defeitos bicorticais e tricorticais não regeneram completamente ao longo da vida.

Estes factos motivam a necessidade de desenvolvimento de substitutos de osso esponjoso que podem potencialmente substituir o enxerto ósseo autólogo.

Dentro dos biomateriais para a produção de substitutos de osso esponjoso estão os polihidroxiácidos e os poliuretanos biodegradáveis.

Os poliuretanos são particularmente interessantes uma vez que podem ser sintetizados num espectro amplo de propriedades físicas e químicas, taxas controladas de degradação *in vivo* e processados em estruturas de suporte para engenharia tecidual e medicina regenerativa. Os substitutos de poliuretano elastomérico quando utilizados para o tratamento de defeitos ósseos permitem o estabelecimento de um contacto íntimo na interface entre o osso nativo e a estrutura de suporte, o que pode promover a migração celular a partir das extremidades ósseas para a mesma, promovendo a regeneração óssea.

Neste estudo foram utilizadas estruturas de suporte de poliuretano elastomérico biodegradável como substitutos de osso esponjoso para o tratamento de defeitos críticos tricorticais na crista ilíaca (40 mm X 20 mm) e monocorticais na tuberosidade da tibia de ovelhas (15 mm X 15 mm). As estruturas tinham uma taxa controlada dos componentes hidrofílico e hidrófobo, uma porosidade entre 80 a 380 μm , uma taxa poro-volume de 75 a 90% e foram conjugadas com cristais de hidroxiapatite nanonumérica para promover a osteocondutividade.

Em quatro grupos de seis animais cada: Grupo I (grupo controlo) - os defeitos ósseos permaneceram vazios; Grupo II – os defeitos ósseos foram cobertos com uma membrana polimérica microporosa de ácido poli(L/DL-láctico) 80/20; Grupo III – os defeitos ósseos foram preenchidos com uma estrutura de

suporte modificada com um sistema de creatina/putrescina e cobertos com a membrana polimérica de ácido poli(L/DL-láctico) 80/20; Grupo IV – os defeitos ósseos foram preenchidos com uma estrutura de suporte modificada com lecitina de soja e cobertos com a membrana polimérica de ácido poli(L/DL-láctico) 80/20.

A duração do período experimental foi de 26 semanas ao fim das quais foi realizada a eutanásia, os espécimes foram colhidos e avaliados através de tomografia axial computadorizada, macrorradiografia e histomorfometria. Nos espécimes ósseos para a avaliação histológica foram utilizados corantes intravitalis fluorescentes (calceína verde e xilenol laranja) e Giemsa-eosina.

No grupo I (controlo), quer na tuberosidade da tíbia quer na crista ilíaca não houve regeneração óssea em nenhum dos animais. Este facto não é surpreendente uma vez que os defeitos eram críticos. No grupo II e em ambos os locais dadores, o osso neoformado ligou as extremidades ósseas em todos os animais. Este facto indica claramente que a membrana polimérica de ácido poli(L/DL-láctico) 80/20 actua como guia na promoção da regeneração óssea no defeito coberto pela mesma (ROG – regeneração óssea guiada). Um facto interessante foi a presença de osso neoformado nos poros da membrana indicando o seu potencial osteocondutivo. Embora estes resultados não sejam estatisticamente significativos, demonstram de forma evidente que a membrana é osteopromotora.

Nos grupos III e IV, em que os defeitos foram preenchidos com estruturas de suporte de poliuretano modificado com componentes biologicamente activos, a regeneração óssea foi mais eficiente na tuberosidade da tíbia e na crista ilíaca do que no grupo II. Nos grupos III e IV foram observados valores mais elevados de: número de osteónios por campo óptico ($38,1 \pm 8,3$ $42,7 \pm 7,4$ e $25,4 \pm 12,7$ respectivamente; $P < 0,05$), taxa de aposição mineral ($2,7 \pm 0,3$ $2,4 \pm 0,1$ $2,2 \pm 0,7$ N.S) e densidade óssea da regeneração no defeito tibial ($250,5 \pm 143,1$; $244,6 \pm 95,5$; $10,8 \pm 48,0$; $P < 0,05$). Nos restantes parâmetros para a tuberosidade da tíbia e a crista ilíaca apenas encontramos valores que sugerem uma tendência favorável para a osteorregeneração. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos III e IV:

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o poliuretano

biodegradável como substituto de osso esponjoso modificado com substâncias biologicamente activas pode ser uma alternativa ao enxerto ósseo autólogo esponjoso no tratamento de defeitos ósseos. A capacidade destes substitutos na regeneração óssea pode ser promovida pela modificação com enriquecimentos específicos.

Estes implantes de poliuretano como substitutos de osso esponjoso, quando utilizados para o preenchimento de defeitos nos locais dadores, podem reduzir significativamente a sua morbilidade.

ABSTRACT

Autogenous cancellous bone graft from the iliac crest and/or the tibial tuberosity is commonly used in the clinics to promote healing of critical-size segmental long bone defects. Bone harvesting is traumatic, causes morbidity of the donor site, and often results in complications. Monocortical bone defects in the ilium resulting from harvesting of bone graft require long time to heal, while bicortical and tricortical defects do not heal for life time.

All these promote efforts to develop cancellous bone graft substitutes which might potentially replace autogenous bone graft.

Among biomaterials for cancellous bone graft substitutes are bioresorbable polyhydroxyacids and polyurethanes.

Polyurethanes are of special interest as they can be synthesized over a broad range of physical and biochemical properties, controllable rates of *in vivo* degradation and processed into porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. Elastomeric polyurethane bone graft substitutes when used to treat bone defects, allow for an intimate contact to be established at the native bone-scaffold interface, which may promote cell migration from bone ends into scaffold and facilitate bone healing.

In this study biodegradable elastomeric polyurethane scaffolds were used as cancellous bone graft substitutes to treat critical-size defects in the iliac crest (40 mm X 20 mm) and tibial tuberosity of sheep (15 mm X 15 mm). The polyurethane scaffolds had controlled ratio of the hydrophilic-to-hydrophobic components, the pore size in the range of 80 to 380 μm , the pore-to-volume ratio in the range of 75 to 90%, and were loaded with nanosize hydroxyapatite crystals to promote osteoconductivity.

There were four groups of six animals each: Group I (control group) – bone defects left empty; Group II – bone defects covered with a microporous polymeric membrane from poly (L/DL lactide) 80/20; Group III – bone defects filled with polyurethane scaffolds modified with a system of creatine/putrescine and covered with the microporous polymeric membrane from poly (L/DL lactide) 80/20; Group IV

bone defects filled with polyurethane scaffolds modified with soy lecithine and covered with the microporous polymeric membrane from poly (L/DL lactide) 80/20.

The duration of the experiments was 26 weeks. At this time the animals were euthanized, the bone specimens were harvested and evaluated using computerized tomography, macrorradiography and histomorphometry. Bone specimens for histological evaluation were stained with vital fluorescents stains (calcein green and xylenol orange) and Giemsa-eosin.

In group I (control), in both the tibial tuberosity and the iliac crest, in none of the animals there was bone regeneration. This is not astonishing as the defects were of critical-sized. In group II, in both donor sites, the new bone bridged the bone ends in all animals. This clearly indicates that the poly(L/DL-lactide) 80/20 membrane acts as a guide which promotes bone regeneration in the defect covered with membrane (guided bone regeneration GBR). Interestingly, the new bone was also present in the pores of the membrane indicating its osteoconductive potential. Although these results were not statistically significant, they evidently show that the membrane is osteopromotive.

In groups III and IV, in which bone defects were implanted with polyurethane scaffolds modified with biologically active compounds, bone regeneration was more efficient than in group II in both the tibial tuberosity and the iliac crest. In groups III and IV there were higher values of: number of osteons per optical field. There were also higher values of: number of osteons per optical field ($38,1 \pm 8,3$ $42,7 \pm 7,4$ and $25,4 \pm 12,7$ respectively; $P < 0,05$), bone apposition rate ($2,7 \pm 0,3$ $2,4 \pm 0,1$ $2,2 \pm 0,7$ N.S) and bone density of bone regenerate in tibial defect ($250,5 \pm 143,1$ $244,6 \pm 95,5$ $10,8 \pm 48,0$ $P < 0,05$). In the remaining parameters for the tibial tuberosity and iliac crest, we only found values that suggested a favourable tendency to osteoregeneration. There were no statistically significant differences between group III and IV.

The results obtained in this study suggest that biodegradable polyurethane cancellous bone graft substitutes modified with biologically active substances may offer an alternative to autogenous cancellous bone graft in the treatment of bone defects. The capacity of these substitutes to facilitate bone regeneration can be promoted by impregnation with specific enrichments.

These polyurethane cancellous bone graft substitutes when used to fill donor site defects may significantly reduce their morbidity.

ÍNDICE

PREFÁCIO.....	I
RESUMO/ABSTRACT.....	V
Apêndice.....	XIX
I Legendas das Figuras.....	XIX
II Legendas dos Quadros.....	XXVI
III Legendas dos Gráficos.....	XXV
Lista de siglas e abreviaturas.....	XXXI
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1.Biologia do osso.....	2
1.1.1.Estrutura macroscópica do osso.....	3
1.1.1.1.Osso cortical	4
1.1.1.2.Osso trabecular ou esponjoso.....	6
1.1.1.3.Medula óssea e rede vascular.....	7
1.1.2. Estrutura microscópica do osso.....	7
1.1.2.1.Células.....	7
1.1.2.2.Matriz extracelular.....	17
1.1.2.3.Outros constituintes.....	19
1.1.2.3.1.Factores de crescimento.....	19
1.2.Vascularização óssea.....	20
1.3.Tipos de ossificação.....	20
1.3.1.Ossificação intramembranosa.....	23
1.3.2.Ossificação endocondral.....	23
1.4.Marcação biológica dinâmica da formação óssea.....	24
1.5.Factores de regulação da remodelação óssea.....	26

1.5.1.Factores sistémicos.....	26
1.5.1.1.Factores genéticos.....	26
1.5.1.2.Factores mecânicos.....	26
1.5.1.3.Factores vasculares/nervosos.....	27
1.5.1.4.Factores nutricionais.....	28
1.5.1.5.Factores hormonais.....	28
1.5.2.Factores locais.....	31
1.5.2.1.Factores de crescimento.....	31
1.5.2.2.Proteínas da matriz.....	34
1.5.2.3.Citocinas.....	35
1.6.Soluções de continuidade ósseas e regeneração óssea.....	36
1.7.A substituição óssea.....	40
1.7.1.Funções desejáveis dos substitutos ósseos.....	43
1.7.2. Características dos substitutos ósseos.....	44
1.7.2.1.Características físicas.....	44
1.7.2.2.Características químicas.....	48
1.7.2.3.Outras características.....	53
1.7.3.Substitutos ósseos.....	55
1.7.3.1.Substitutos naturais.....	55
1.7.3.1.1.Enxertos ósseos.....	56
1.7.3.2.Substitutos sintéticos.....	70
1.7.3.2.1.Metals.....	71
1.7.3.2.2.Cerâmicas.....	71
1.7.3.2.3.Polímeros.....	73
1.7.3.2.3.1.Poliuretano.....	75
1.8.Membranas osteopromotoras.....	83

1.9.Perspectivas futuras	86
1.9.1.Terapia genética.....	89
1.9.2.Endocultivação/Engenharia tecidual endógena.....	90
1.9.3.Utilização de proteínas ósseas morfogenéticas.....	92
1.9.3.1.Modo de acção das BMPs.....	95
1.9.3.2. Produção das BMPs.....	95
1.9.3.3. Efeitos indesejáveis devido ao uso das BMPs.....	96
1.9.3.4. Estruturas de transporte e suporte das BMPs.....	97
1.9.3.5. Utilização de BMPs.....	98
1.9.4.Células estaminais.....	100
1.9.5.Outros produtos utilizados na estratégia osteoindutiva.....	104
1.9.5.1.Isoflavona.....	104
1.9.5.2.Plasma rico em plaquetas.....	105
2.OBJECTIVOS DO ESTUDO.....	109
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	111
3.1.Materiais testados.....	111
3.1.1.Membrana osteopromotora de ácido poli(L/DL-láctico) 80/20.....	111
3.1.2.Esponjas de poliuretano.....	112
3.1.2.1. Características da estrutura.....	114
3.2 Modelo experimental animal.....	115
3.2.1 Grupos experimentais.....	115
3.3. Delineamento experimental	116
3.3.1. Primeira fase – Criação dos defeitos ósseos na tuberosidade da tíbia e crista do osso ilíaco; Reconstrução das zonas ressecadas e encerramento dos planos cirúrgicos.....	118
3.3.2. Período pós-operatório.....	124

3.3.3.1. Maneio dos animais.....	125
3.3.3.2. Administração de corantes intravitalis fluorescentes para avaliação da cronologia da mineralização.....	127
3.3.3. Segunda fase – Eutanásia e colheita dos espécimenes.....	127
3.3.4. Preservação e transporte dos espécimes.....	133
3.4. Metodologia aplicada na avaliação da formação óssea.....	134
3.4.1. Técnicas radiológicas de avaliação.....	134
3.4.1.1. Tomografia axial computadorizada.....	134
3.4.1.1. Macrorradiografia.....	135
3.4.2. Técnicas histológicas e estudos histomorfométricos.....	136
3.4.2.1. Corantes intravitalis fluorescentes.....	136
3.4.2.2. Histologia.....	136
3.4.2.3. Avaliação do defeito tibial.....	140
3.4.2.4. Avaliação do defeito ilíaco.....	145
3.4.3. Estudo estatístico.....	147
4. RESULTADOS.....	151
4.1 Validade do modelo cirúrgico.....	151
4.2 Avaliação qualitativa dos resultados.....	151
4.3. Avaliação quantitativa dos resultados.....	169
4.3.1. Médias e desvios-padrão.....	176
4.3.1.1. Espessura média das corticais laterais	176
4.3.1.2. Número médio de osteónios por campo óptico	177
4.3.1.3. Diâmetro médio dos osteónios.....	..178
4.3.1.4. Densidade osteónios por campo óptico.....	...179

4.3.1.5. Taxa média de aposição mineral.....	180
4.3.1.6. Volume do defeito criado.....	181
4.3.1.7. Densidade óssea periférica (extra-defeito)	182
4.3.1.8. Densidade óssea do defeito criado.....	183
5.DISCUSSÃO.....	185
6.CONCLUSÕES.....	207
7.BIBLIOGRAFIA.....	209
8.ANEXO 1.....	253

APÊNDICE

I – Legendas das figuras

Figura 1.1. (página 12) – São visíveis os *filipodia* intercelulares. Coloração Giemsa-eosina. Microscópio Nikon Eclipse 600, imagens obtidas através de câmara digital Nikon DN100.

Figura. 3.1. (página 112) – Membrana osteopromotora. Fotografia de microscopia electrónica de varrimento (Modelo Hitachi S-4100, Tóquio, Japão). A observação foi realizada com 2 kV (Cortesia do Professor Doutor Sylwester Gogolewski).

Figura 3.2. (página 112) – **A)** Membrana osteopromotora. **B)** Identificação e invólucro da membrana osteopromotora.

Figura 3.3. (página 113) – Esponja de poliuretano. Fotografia de microscopia electrónica de varrimento (Modelo Hitachi S-4100, Tóquio, Japão). A observação foi realizada com 5kV (Cortesia do Professor Doutor Sylwester Gogolewski).

Figura. 3.4. (página 114) – **A)** Identificação da esponja de poliuretano, composição A para o defeito ilíaco. **B)** Identificação e invólucro da esponja de poliuretano, composição B para o defeito ilíaco.

Figura. 3.5. (página 114) – Esponja de poliuretano para o defeito ilíaco antes da sua colocação.

Figura. 3.6. (página 116) – **A)** Bloco operatório do pólo do ITB na Estação Zootécnica Nacional. **B)** Acesso à crista da tíbia.

Figura. 3.7. (página 119) – Acesso à tíbia. **a** – Face anterior, **p** – Face posterior, **l** – Face lateral, **m** – Face medial.

Figura. 3.8. (página 120) – A) Defeito tibial delimitado; **B)** Defeito tibial *in situ* mas solto; **C)** Defeito tibial monocortical criado, observando-se a contra lateral cortical; **D)** Sutura cutânea coberta com nebulizador de terramicina®.

Figura. 3.9. (página 121) – Acesso à zonal ilíaca. Representação gráfica adaptada de Barone (2000).

Figura. 3.10. (página 122) – A) Crista ilíaca posterior exposta. **a** – Face anterior; **p** – Face posterior; **B)** Fragmento removido mas *in situ*; **C)** Defeito ilíaco tricortical; **D)** Fragmento retirado da zona onde foi criado o defeito ilíaco.

Figura. 3.11. (página 123) – A) Defeito tibial preenchido com esponja de poliuretano. **B)** Defeito tibial coberto com membrana osteopromotora e fixado com parafusos de titânio.

Figura. 3.12. (página 124) – A) Esponja de poliuretano *in situ* (PU); **B)** Esponja de poliuretano *in situ*, embebida em sangue (PU); **C)** Esponja de poliuretano *in situ* envolvida por membrana osteopromotora, **mpla**; **D)** Esponja de poliuretano *in situ* coberta com membrana osteopromotora e fixada com parafusos de titânio.

Figura. 3.13. (página 124) – A) Sutura cutânea da tíbia coberta com *spray* antisséptico; **B)** Sutura cutânea do ilíaco.

Figura. 3.14. (página 125) – A) Jaula de recobro de modelo aprovado; **B)** Parque exterior.

Figura. 3.15. (página 129) – Zona de acesso à cavidade abdominal.

Figura 3.16. (página 130) – Esquema da irrigação do membro posterior de ovino adaptado de Barone (2000).

Figura. 3.17. (página 131) – Fotografia da zona inguinal de espécie ovina após dissecação para ilustrar a anatomia da região e os diferentes vasos com interesse. (Cortesia do colega Ricardo Romão).

Figura. 3.18. (página 132) – **A) a.a.a** – Artéria aorta abdominal com bifurcação perfeitamente visível em **i** – ilíaca interna e **e** – ilíaca externa; **B)** Sutura colocada em redor da artéria aorta abdominal e sistema de venoclise adaptado à cânula colocada na aorta abdominal.

Figura. 3.19. (página 132) – Sistema de venoclise para administração de “indian ink”.

Figura. 3.20. (página 133) – **A)** Espécime tibial recolhido e **B)** Espécime ilíaco recolhidos.

Figura. 3.21. (página 136) – **A)** Imagem de macrorradiografia típica da tíbia; **B)** – Imagem de macrorradiografia típica do ilíaco.

Figura. 3.22. (página 140) – Imagem típica observada com luz polarizada (Fotografias X100). Microscópio Nikon Eclipse 600, imagens obtidas através de câmara digital Nikon DN100.

Figura. 3.23. (página 142) – Exemplo do estudo típico efectuado para cada um dos espécimes tibiais. **A)** Tíbia com implante e membrana; **B)** Medições de densidade óssea; **C)** Medições do volume dos defeitos; **D)** Macrorradiografia. Este estudo foi feito para todos os espécimes.

Figura.3.24. (página 142) – Explicação gráfica do estudo histomorfométrico típico efectuado sobre a imagem da lâmina. Coloração Giemsa-eosina.

Figura. 3.25. (página 143) – Lâmina da tíbia típica para a qual o software Cell A permite demarcar a área de estudo. Coloração Giemsa-eosina.

Figura. 3.26. (página 143) – Exemplo típico de um dos três campos ópticos seleccionados para as médias das medições histomorfométricas. Coloração Giemsa-eosina.

Figura. 3.27. (página 144) – Pormenor do rectângulo tracejado na Fig. 3.26.

Figura. 3.28. (página 144) – Sequência típica de visualização dos corantes intravitais fluorescentes na cavidade medular da tibia: **A)** calceína verde; **B)** xilenol laranja e **C)** marcação dupla de fluorescências.

Figura. 3.29. (página 145) – Pormenor correspondente ao tracejado da figura 3.28.

Figura. 3.30. (página 146) – Imagens típicas da crista ilíaca: **A** – TAC; **B** – Tac com valores de densidade óssea (UH); **C** – Tac com medição de volume do defeito; **D** – Macrorradiografia. Este estudo foi feito para todos os espécimes.

Figura. 4.1. (página 152) – Imagens tibiais típicas de GI: **A** – TAC; **B** – Tac com valores de densidade óssea (UH); **C** – Tac com medição de volume do defeito; **D** – Macrorradiografia.

Figura. 4.2. (página 153) – Imagens típicas da crista ilíaca de GI: **A** – TAC; **B** – Tac com valores de densidade óssea (UH); **C** – Tac com medição de volume do defeito; **D** – Macrorradiografia.

Figura. 4.3. (página 154) – Imagem tibial típica do estudo histomorfométrico realizado. Coloração Giemsa-eosina

Figura. 4.4. (página 155) – Imagens tibiais típicas de GII: **A** – TAC; **B** – Tac com valores de densidade óssea (UH); **C** – Tac com medição de volume do defeito; **D** – Macrorradiografia.

Figura. 4.5. (página 156) – Imagens típicas da crista ilíaca de GII: **A** – TAC; **B** – Tac com valores de densidade óssea (UH); **C** – Tac com medição de volume do defeito; **D** – Macrorradiografia.

Figura. 4.6. (página 157) – Imagem tibial típica do estudo histomorfométrico realizado. Coloração Giemsa-eosina

Figura. 4.7. (página 157) – Imagem microscópica típica em que é visível a formação de osso neoformado (**neo**) para o interior dos poros da membrana. Coloração Giemsa-eosina.

Figura. 4.8. (página 158) – Imagem microscópica típica com coloração fluorescente intravital. É visível a formação de osso neoformado para o interior dos poros da membrana (**neo**) e em directo contacto com esta.

Figura. 4.9. (página 158) – Extremidade da membrana (**mpla**) rodeada de osso neoformado (**neo**). Coloração Giemsa-eosina.

Figura. 4.10. (página 160) – Imagens tibiais típicas de GIII: **A** – TAC; **B** – Tac com valores de densidade óssea (UH); **C** – Tac com medição de volume do defeito; **D** – Macrorradiografia.

Figura. 4.11. (página 161) – Imagens típicas da crista ilíaca de GIII: **A** – TAC; **B** – Tac com valores de densidade óssea (UH); **C** – Tac com medição de volume do defeito; **D** – Macrorradiografia.

Figura. 4.12. (página 161) – Imagem tibial típica do estudo histomorfométrico realizado. Coloração Giemsa-eosina

Figura. 4.13. (página 162) – Imagem microscópica da membrana polimérica típica em que se vê a presença de células osteogénicas no interior dos poros da mesma. Coloração Giemsa-eosina.

Figura. 4.14. (página 162) – Pormenor microscópico do rectângulo da imagem 4.10.

Figura. 4.15. (página 163) – Imagem microscópica típica da membrana polimérica em que é observável a coloração negra correspondente ao indian ink, indicativo de intensa angiogénese junto dos poros da membrana (**ik**), neoformação óssea (**neo**) no interior dos poros da membrana assim como na cavidade medular. Coloração Giemsa-eosina

Figura. 4.16. (página 164) – Imagens tibiais típicas de GIV: **A** – TAC; **B** – Tac com valores de densidade óssea (UH); **C** – Tac com medição de volume do defeito; **D** – Macrorradiografia.

Figura. 4.17. (página 165) – Imagens típicas da crista ilíaca de GIV: **A** – TAC; **B** – Tac com valores de densidade óssea (UH); **C** – Tac com medição de volume do defeito; **D** – Macrorradiografia.

Figura. 4.18. (página 166) – Imagem tibial típica do estudo histomorfométrico realizado. Coloração Giemsa-eosina

Figura. 4.19. (página 166) – Imagem microscópica típica da membrana polimérica em que é observável osso neoformado (**neo**) no interior dos poros da membrana assim como na cavidade medular. Coloração Giemsa-eosina.

Figura. 4.20 (página 167) – Imagem microscópica tibial típica no interior da cavidade medular em que é observável a neoformação de osso (**neo**) no interior da esponja de PU (**PU**). Coloração Giemsa-eosina.

Figura. 4.21 (página 167) – Imagem microscópica típica com coloração fluorescente intravital na cavidade medular da tibia onde se pode observar fragmentos de poliuretano (**PU**) e osso neoformado (**neo**).

Figura. 4.22 (página 168) – Imagem microscópica típica com coloração fluorescente intravital na cavidade medular da tíbia onde se pode observar neoformação óssea (**neo**) à periferia e no interior dos poros de poliuretano (**PU**).

Figura. 4.23 (página 168) – Detalhe da zona rectangular da imagem 4.22.

II – Legendas dos quadros

Quadro 1.1. (página 42) – Estratégias para a regeneração óssea de acordo com Vaibhav *et al.*, (2007).

Quadro 3.1. (página 117) – Protocolo anestésico.

Quadro 3.2. (página 118) – Cronograma da Experimentação Animal.

Quadro 3.3. (página 126) – Composição qualitativa do alimento completo para ovinos, utilizado na alimentação dos animais experimentais.

Quadro 4.1. (página 169) – Grupos experimentais e respectivos tratamentos aplicados

Quadro 4.2. (página 171) – Valores das variáveis relativas ao grupo I obtidas a partir do estudo histomorfométrico.

Quadro 4.3. (página 171) – Valores das variáveis relativas ao grupo I obtidas a partir do estudo das tomografias axiais computadorizadas.

Quadro 4.4. (página 172) – Valores das variáveis relativas ao grupo II obtidas a partir do estudo histomorfométrico.

Quadro 4.5. (página 173) – Valores das variáveis relativas ao grupo II obtidas a partir obtidos a partir do estudo das tomografias axiais computadorizadas.

Quadro 4.6. (página 174) – Valores das variáveis relativas ao grupo III obtidas a partir do estudo histomorfométrico.

Quadro 4.7. (página 174) – Valores das variáveis relativas ao grupo III obtidas a partir obtidos a partir do estudo das tomografias axiais computadorizadas.

Quadro 4.8. (página 176) – Valores das variáveis relativas ao grupo IV obtidos a partir do estudo histomorfométrico.

Quadro 4.9. (página 176) – Valores das variáveis relativas ao grupo IV obtidas a partir obtidos a partir do estudo das tomografias axiais computadorizadas.

Quadro 4.10. (página 176) – Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo osso, tíbia, (pelo método de Tukey-Hsu).

Quadro 4.11. (página 177) – Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo osso, tíbia, (pelo método de Tukey-Hsu).

Quadro 4.12. (página 178) – Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo osso, tíbia (pelo método de Tukey-Hsu).

Quadro 4.13 (página 179) – Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo osso, tíbia (pelo método de Tukey-Hsu).

Quadro 4.14. (página 180) – Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo osso, tíbia (pelo método de Tukey-Hsu).

Quadro 4.15. (página 181) – Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo osso, tíbia ou íliaco (pelo método de Tukey-Hsu); Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre pares de ossos (tíbia e íliaco) dentro dos mesmos tratamentos (pelo método de Tukey-Hsu).

Quadro 4.16. (página 182) – Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo osso, tíbia ou ilíaco (pelo método de Tukey-Hsu); Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre pares de ossos (tíbia e ilíaco) dentro dos mesmos tratamentos (pelo método de Tukey-Hsu).

Quadro 4.17. (página 183) – Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo osso, tíbia ou ilíaco (pelo método de Tukey-Hsu); Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre pares de ossos (tíbia e ilíaco) dentro dos mesmos tratamentos (pelo método de Tukey-Hsu).

III – Legendas dos gráficos

Gráfico 4.1. (página 177) – Distribuição relativa à variável da espessura das corticais laterais da tíbia (mm).

Gráfico 4.2. (página 178) – Distribuição relativa à variável número de osteónios por campo óptico.

Gráfico 4.3. (página 179) – Distribuição relativa ao diâmetro dos osteónios no campo óptico.

Gráfico 4.4. (página 180) – Distribuição relativa à densidade dos osteónios por campo óptico.

Gráfico 4.5. (página 181) – Distribuição relativa à variável taxa de aposição mineral ($\mu\text{m}/\text{dia}$).

Gráfico 4.6. (página 182) – Distribuição relativa à variável volumes dos defeitos ósseos criados (tíbia e ilíaco).

Gráfico 4.7. (página 183) – Distribuição relativa às densidades ósseas periféricas (extra-defeito) da tíbia e do ilíaco.

Gráfico 4.8. (página 184) – Distribuição relativa às densidades ósseas dos defeitos criados (tíbia e ilíaco).

A – acetona

α -BSM - alpha bone substitute material (cimento de fosfato de cálcio)

AAVs – vírus adeno-associados

ActR-I – receptor activina

ActR-II – receptor activina II

ActR-IIB – receptor activina IIB

ADAM – desintegrina e metaloproteinase (ADAM8)

ADN – ácido desoxirribonucleico

cADN – complementar do ácido desoxirribonucleico

ALK – receptor-quinase de activina

ALK-2 – também designado por BMPR-IA, receptor-quinase de activina 3

ALK-3 – também designado por BMPR-IA, receptor-quinase de activina 3

ALK-6 – também designado por BMPR-IB, receptor-quinase de activina 6

ALP – fosfatase alcalina

AO/ASIF – Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen – Association for the Study of Internal Fixation

AO/ARI (Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen – Association for the Study of Internal Fixation) Research Institute

ASCs – células estaminais do tecido adiposo

AX – anexina (AXII)

Av β – integrina osteoclástica (av β 3)

B4 – Classificação oficial de exploração indemne

bFGF – factor de crescimento fibroblástico básico

BMA – aspirado de medula óssea

BMP – proteína óssea morfogenética (BMP2 a 16)

BMPRI – receptor de proteína óssea morfogenética

BMMSC – célula mesenquimatosa estaminal da medula óssea

BMU – basic multicellular units ou unidades multicelulares básicas

BPO – peróxido de benzoílo

BSP – sialoproteína óssea

CA - acetato de celulose

Cbfa1 – factor de transcrição (Runx2)

CD44 – tipo de receptor de superfície para o ácido hialurónico, específico dos osteoblastos.

COG – Crescimento ósseo guiado (GBR)

Da – dalton

COOH – ácido carboxílico

DAN – família de antagonistas das BMPs

DBM – matriz óssea desmineralizada

DMF – dimetilformamida

DMSO – dimetilsulfóxido

EGF – factor de crescimento da epiderme

EPC – célula progenitora endotelial

ESCs – células estaminais embrionárias

ETO – etileno glicol

ETOH – etanol

EUA – Estados Unidos da América

EVOH - álcool etileno-vinil

EZN – estação zootécnica nacional

FDA – Food and Drug Administration

FDM – modelagem de fusão deposição

FGF – factor de crescimento dos fibroblastos

G – gauge

g – gramas

GBR – regeneração óssea guiada

GDF – factor de crescimento diferenciado

GF – factores de crescimento (em geral)

GH – hormona do crescimento

GM-CFU – granulocyte-macrophage-colony-forming-units

GM-CSF – factor de estimulação de macrófagos granulócitos

GTR – regeneração tecidual orientada ou guiada

H⁺ – ião hidrogénio

HA – hidroxiapatite

HBMSC – células humanas estaminais de medula óssea

HIV (AIV) – vírus da imunodeficiência adquirida
 HSC – célula estaminal hematopoiética
 hPa – hectopascal
 IGF – factor de crescimento da insulina (IGF-I; IGF-II)
 IGFBP – proteína de ligação à IGF
 Ihh – *hedgehog* indiano
 IL – interleucina (IL-1, IL-3, IL-6, IL-11)
 IM – via intra-muscular
 IP – ipriflavona (7-isopropoxyisoflavona)
 ITB – instituto de tecnologia biomédica
 IV – via intra-vascular
 kD – kiloDalton
 Kg – quilograma
 kV – kilovolte
 LIF – factor inibidor da leucemia
 LMP – proteína de mineralização (factor osteogénico intracelular)
 MADRP – Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas
 mAs – miliampere por segundo
 Mbar – milibar
 M-CSF – factor de estimulação de colónias de macrófagos
 MEC – matriz extracelular
 M-CSF – factor de estimulação das colónias de macrófagos
 Mg – miligrama
 MMA – metil metacrilato
 min – minuto
 ml – mililitro
 mm – milímetros
 MOBL – osteoblastos mesenquimatosos
 MPa – megapascal
 MSCs – células mesenquimatosas estaminais
 MTT – 3 – (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide
 NCPs – proteínas não colagénicas

nm – nanómetros

NMP – metil-2-pirrolidona

N.S. – não significativo

OC – osteocalcina

ODF – factor de diferenciação osteoclástica

OIP – peptídeo inibidor dos osteoclastos

ON – osteonectina

OP – semelhante a BMP

OPG – osteoprotegerina

OPN – osteopontina

PB – sangue periférico

PBSCs – células adultas do sangue periférico

PCL – poli diol (ϵ -caprolactona)

PDGF – factor de crescimento derivado das plaquetas

PGs – prostaglandinas

PGA – ácido poliglicólico

PGE – prostaglandina E

PGF – factor de crescimento plaquetário

PHB – polihidroxibutiratos

PICP – pro-colagénio tipo I

PLA – ácido poliláctico

PDLA – poli (D,L-láctico)

PLLA – ácido poli-L-láctico

PLG – co-polímero poliláctico-poliglicólico

PO_4H_2 – fosfatos

PRF – plasma rico em fibrina

PRP – plasma rico em plaquetas

PTFE – politetrafluoretileno

PTH – paratormona

PU – poliuretano

PUA – poliuretano composição A

PUB – poliuretano composição B

- pv – peso vivo
- RANK – receptor de RANKL situado na superfície de pré-osteoclastos e osteoclastos
- RANKL (ODF) – ligando situado na superfície de pré-osteoblastos e osteoblastos
- RGD – Arg-Gly-Asp, sequência de amino ácidos de reconhecimento (arginina, glicina e aspartato)
- rhBMP – recombinante humana da proteína óssea morfogenética (2 e 7)
- RNA_m – ácido ribonucleico mensageiro
- ROG – regeneração óssea guiada
- ROI – região de interesse (region of interest)
- RP – protótipo rápido
- SMAD – moléculas de sinalização (receptor proteico específico)
- SC – via sub-cutânea
- Scaffold – estrutura temporária
- SEC – cromatografia por exclusão de tamanho
- SFF – sólidos de formas livres
- Shh – sonic hedgehog
- SIBLINGS – small integrin-binding ILgand N-linked glycoprotein
- Si-OH – silanóis
- SLA – estereolitografia
- SOBL – osteoblastos de superfície
- TAC – tomografia axial computadorizada
- TAM (MAR) – taxa de aposição mineral
- TGF- β – factor β de transformação de crescimento
- THF – tetrahydroflurano
- TNF – factor de necrose tumoral
- TNF α – factor de necrose tumoral α
- TPC – trifosfato de cálcio
- TRAP – fosfatase tartrato-ácido resistente
- UH – unidades hounsfield
- UI – unidades internacionais
- USP – United States *Pharmacopae*

VEGF – factor de crescimento do endotélio vascular

VEGF R₂ – receptor de elevada afinidade para VEGF

VOI – volume de interesse (volume of interest)

µm – micrómetro

1,25(OH)₂D₃ – di-hidroxivitamina D₃

3 Bs – Grupo de investigação 3Bs - Biomiméricos, biodegradáveis e biomateriais.

Departamento da engenharia de polímeros da Universidade do Minho.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Ao longo da história da humanidade e por razões diversas, a necessidade de substituir tecido ósseo tem sido uma preocupação constante. A principal e mais persistente razão que conduz à necessidade de substituição de osso é a perda consequente ao traumatismo que sobre ele é infligido. Actualmente esta necessidade não só se manteve, como se tem vindo a agravar. Embora a natureza do traumatismo continue a ser física, actualmente já pouco acontece por contusão directa como lutas corpo a corpo, mas essencialmente provocada por uma sinistralidade rodoviária elevada a nível mundial, e em menor grau, por traumatismos provocados por armas de fogo.

O crescente aumento do número de intervenções na cirurgia reconstrutiva ortopédica (como por exemplo a prótese total da anca e a fusão espinhal) resultante de avanços nas técnicas cirúrgicas (cirurgia de mínima invasão), na tecnologia (inovações em materiais para implantes) e no envelhecimento da população (por um claro aumento médio da esperança de vida), conduziram a uma procura de enxertos ósseos que excede largamente a oferta (Hing, 2004).

Os problemas do foro oncológico que levam à perda significativa de osso têm vindo também a conquistar terreno, não por antes não existirem, mas por não serem devidamente diagnosticados ou por terem agora maior relevância devido ao aumento significativo da esperança média de vida, como anteriormente mencionado. Este último facto, por razões associadas quase exclusivamente ao envelhecimento da população mundial, leva a que haja cada vez mais necessidade de novos e melhores substitutos ósseos pois como é sabido, nas cirurgias ortopédicas reconstrutivas existem necessidades crescentes de tecido ósseo. Na cirurgia reconstrutiva em áreas muito sensíveis como a otorrinolaringologia e a cirurgia maxilo-facial, a utilização de substitutos é, e continuará a ser, uma aliada de peso pelo facto dos defeitos ósseos nesta zona terem um impacto funcional, estético e social muito elevado (Pou, 2003).

Os factos indicados só por si justificam plenamente a investigação na área da regeneração óssea e, sendo o estudo do osso pela sua natureza

obrigatoriamente interdisciplinar, o conhecimento da sua biologia é vital para a compreensão e actuação em termos de uma eventual substituição.

1.1. Biologia do osso

O osso é de um ponto de vista estritamente biológico um tecido vivo notável que desempenha no organismo inúmeras funções chave pois não só promove o suporte estrutural e de protecção a órgãos internos e tecidos moles, incluindo a medula óssea, como está envolvido no metabolismo de minerais fundamentais como o cálcio e fósforo. O osso é ainda local de síntese de células sanguíneas essenciais.

O osso está envolvido num ciclo constante de reabsorção e regeneração, submetido a contínuas trocas químicas e remodelações estruturais, quer devido à regulação hormonal interna, quer devido a solicitações mecânicas externas (Hing, 2004; Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006a), sendo um dos únicos que tem a capacidade de se auto-regenerar na vida adulta (Giannoudis *et al.*, 2007c).

O facto da principal função reconhecida do osso ser como estrutura de suporte fez com que se criasse a ideia do osso ser um tecido inerte e estático. Nada pode ser mais errado dada a habilidade do tecido ósseo em adaptar a sua massa e morfologia às necessidades que lhe são impostas, a sua habilidade de se remodelar sem deixar qualquer indício e a sua habilidade para rapidamente mobilizar reservas minerais face a uma necessidade metabólica. Todas estas características fazem do osso o mais puro dos materiais “smart”¹ (Sabolinski *et al.*, 1996; Langer e Tirrell, 2004).

O osso é um órgão capaz de manter a sua forma e estrutura ao longo da vida mediante um contínuo processo de renovação, através do qual responde a mudanças no seu ambiente mecânico e a outras solicitações de natureza diversa. Como exemplo cite-se a grande densidade óssea em atletas, ou a grande perda óssea em doentes com paralisia ou em astronautas em missões espaciais prolongadas (Sommerfeldt e Rubin, 2001).

O osso em condições normais mantém um óptimo balanço entre forma e

¹ “smart” – Os materiais que têm a capacidade de alterar as suas características em função do ambiente que os rodeia.

função: “a forma segue a função” (Lei de Wolff).

O tecido ósseo ocorre apenas nos vertebrados encontrando-se, contudo, ossículos de carbonato de cálcio em determinadas espécies de invertebrados (Walker e Liem, 1994).

A forma óssea é geralmente dependente da genética mas está também directamente ligada à sua função mecânica, ou seja: ossos longos servem geralmente de alavanca, ossos curtos servem geralmente de ponte entre outros ossos, e ossos planos constituem normalmente barreiras de protecção (Carola *et al.*, 1992).

O osso desempenha um papel tão fundamental que mesmo depois de perder a sua “vida”, o osso continua o seu papel de tecido vital na medida em que cada vez mais a história tem vindo a ser re-escrita pelos cientistas forenses, constituindo os ossos as nossas verdadeiras autobiografias. Hoje há mesmo métodos que permitem estimar com rigor suficiente a idade à altura da morte a partir do estudo microscópico do osso trabecular (Boel *et al.*, 2007).

1.1.1. Estrutura macroscópica do osso

O osso é um tecido conjuntivo altamente especializado, com uma estrutura organizada e especializada, geralmente revestido por uma camada fibrosa, o perióstio, muito rica em vasos sanguíneos e nervos e com funções fisiológicas fundamentais e específicas. O perióstio só não reveste a superfície externa do osso nas superfícies articulares das epífises.

Em termos morfológicos gerais existem dois tipos de tecido ósseo: o cortical ou compacto e o trabecular ou esponjoso. As suas diferenças estruturais relacionam-se com as principais funções que exercem, sendo que o tecido ósseo cortical tem essencialmente funções mecânicas e de protecção e o tecido ósseo esponjoso tem funções metabólicas (Cabrita, 1993). No entanto, este último assiste o tecido ósseo cortical na sua função de suporte estrutural pelo facto das trabéculas ósseas apresentarem uma orientação segundo as linhas de stress e tensão no interior do tecido ósseo.

O osso para além da sua classificação morfológica pode ser classificado em

osso imaturo ou osso maduro (lamelar). Esta classificação depende do arranjo das fibras de colagénio. O osso imaturo é fundamentalmente formado durante a embriogénese e caracteriza-se pela presença na matriz óssea de fibras de colagénio irregularmente orientadas as quais, sob microscopia de luz polarizada, se apresentam como estruturas anisotrópicas irregulares que envolvem as lacunas osteocitárias, distribuídas irregularmente pela matriz e os espaços por onde penetram os vasos capilares. Quando esses espaços são estreitos, o osso torna-se de aparência compacta e, se pelo contrário forem largos, apresenta a aparência esponjosa. A matriz contém abundante substância inter-fibrilhar não colagénica e é rica em proteoglicanos.

1.1.1.1. Osso cortical

O tecido ósseo cortical representa cerca de 70% do tecido ósseo existente no organismo e compreende a diáfise dos ossos longos e a zona externa da maioria dos ossos. Na cortical óssea, os espaços por onde penetram os vasos capilares representam 5% a 30% do seu volume e dependem dos canais, canalículos e das lacunas de reabsorção.

As superfícies ósseas são compostas por osso cortical com uma espessura tanto superior quanto maior for a exigência mecânica que lhe é imposta.

O osteónio ou sistema de Havers, a unidade funcional do osso cortical, é formado por vários cilindros de osso calcificado (até cerca de 20) e o seu eixo maior é paralelo ao eixo maior do osso. Estes cilindros com diâmetros de cerca 200 a 300 µm e 1cm de comprimento são constituídos por lamelas concêntricas. No centro do osteónio encontramos o canal central ou de Havers. Estes canais são longitudinais e contêm vasos sanguíneos, nervos, vasos linfáticos. Destes saem os canais perfurantes ou de Volkmann, que difundem o sistema de irrigação sanguínea, nervosa e linfática a todo o osso (Carola *et al.*, 1992; Sommerfeldt e Rubin, 2001).

Entre os diferentes sistemas de Havers encontram-se os sistemas intersticiais que os ligam como um mosaico. Os sistemas de Havers e os sistemas intersticiais encontram-se delimitados por finas linhas basofílicas, as linhas de

cimento ou linhas de remodelação. Estas linhas, compostas por glicosaminoglicanos, são indicadoras de torácicos ciclos de remodelação e caracterizam o tecido ósseo do organismo adulto. De referir também que, apesar de a maior parte do osso compacto ser constituído por sistemas de Havers e intersticiais, a zona mais externa e interna do córtex é composta por lamelas de tecido ósseo dispostas em circunferência ao redor da diáfise, denominadas lamelas circunferenciais externas e internas (Cooper *et al.*, 1966 citado por Dias, 2004; Cormack, 1987 citado por Dias, 2004; Recker, 1992, citado por Dias, 2004) ou sistemas circunferenciais externo e interno, respectivamente (Bloom e Fawcett, 1994).

Existem dois tipos de osteónios, os primários e os secundários. Os osteónios primários são aqueles que se formam inicialmente quando os espaços vasculares primitivos se preenchem de osso neoformado e, por esta razão, fundem-se com a matriz óssea sem uma delimitação precisa. Os osteónios secundários são aqueles que se formam como resultado de uma reabsorção óssea prévia, estando separados da matriz óssea pela linha de cimento, como referido anteriormente. Ao contrário dos sistemas de Havers primários, os secundários estão rodeados por sistemas lamelares intersticiais e não por tecido ósseo trabecular.

As lamelas concêntricas, anteriormente referidas, contêm lacunas que albergam os osteócitos. De cada lacuna emergem de forma radial, canalículos que contêm as extensões citoplasmáticas dos osteócitos assegurando desta forma um contacto total das diferentes células entre si. Está assim assegurado um transporte constante através destes prolongamentos intercelulares entre osteócitos e as células de revestimento do tecido ósseo. Esta rede constitui uma extraordinária forma de comunicação intercelular, um verdadeiro sincício (Curtis *et al.*, 1985), citado por Sommerfeldt e Rubin (2001). Os vasos sanguíneos impregnam toda a região óssea, o que permite que nenhuma célula óssea se encontre a uma distância superior a 500 µm do seu aporte vascular (Marks e Popoff, 1988; Bonucci, 2000).

O grau de remodelação óssea e a sua duração dependem do tipo de tecido ósseo: o osso cortical demora cerca de 6 a 12 meses para se remodelar e o osso

esponjoso leva cerca de 3 a 6 meses (Hutmacher *et al.*, 2007).

1.1.1.2. Osso trabecular ou esponjoso

O tecido ósseo esponjoso representa cerca de 15% do tecido ósseo existente e situa-se no interior do tecido ósseo cortical ao nível das metáfises e epífises dos ossos longos e na região central da maioria dos ossos planos ou irregulares. O osso esponjoso forma uma rede de trabéculas ósseas que se ligam entre si e que estão em continuidade com a superfície interna do córtex e em que os espaços formados por esta rede estão preenchidos por células da linha hematopoiética e adipócitos. A rede de trabéculas ósseas está orientada de forma a suportar a resistência que lhe é aplicada bem como eventuais alterações na distribuição de peso e forma-se ao longo das linhas de maior pressão. Este arranjo tecidular permite uma maior resistência, acompanhada de menor peso possível.

No osso esponjoso os espaços por onde penetram os vasos capilares ocupam de 30% até mais de 90% do seu volume, pois são formados pelos espaços medulares inter-trabeculares e pelos amplos espaços vasculares (Bonucci, 2000).

As propriedades mecânicas do osso esponjoso (há autores que o consideram mesmo como uma esponja) são significativamente dependentes da sua porosidade e arquitectura e ambas variam consoante a localização do osso (Goldstein, 1987) assim como com a idade (Burstein *et al.*, 1976; Wong *et al.*, 1985).

Existem dois tipos de osso esponjoso:

- a) Grosseiro – tecido característico do esqueleto maduro da idade adulta;
- b) Fino – tecido característico do esqueleto fetal mas também presente nas fases iniciais dos calos de fractura. Apresenta-se sob duas formas: osso esponjoso fino intramembranoso e osso esponjoso fino endocondral.

No tecido ósseo esponjoso também pode surgir uma estrutura lamelar e linhas de cimento, no entanto a matriz extracelular é porosa e sem uma organização específica o que faz com que não se encontrem presentes sistemas de Havers completos.

1.1.1.3. Medula óssea e rede vascular

A medula óssea e rede vascular asseguram, respectivamente, uma fonte de células estaminais e os principais meios de comunicação e interacção com o resto do organismo (Hing, 2004). Estas células estaminais existem desde o início da formação do embrião nas células internas do blastócito e são ditas totipotenciais, podendo originar um indivíduo completo. Consoante a sua progenia se dispersa pelo organismo em formação, irão localizar-se em todos os tecidos onde formam pequenos grupos pouco numerosos. Ao longo do desenvolvimento embrionário, algumas das populações destas células mantêm-se pluripotenciais enquanto outras se tornam unipotenciais, isto é, só poderão evoluir numa das linhagens celulares. Este conceito de células progenitoras do tecido conjuntivo é fundamental nesta área da medicina regenerativa pois qualquer uma destas células que possa originar uma célula óssea, pode ser utilizada em função desse mesmo objectivo (Coelho, 2003).

Sabendo a localização dos núcleos de células estaminais no organismo e, uma vez conhecida e até manipulada a sua linha de diferenciação, estas células podem ser colhidas, seleccionadas e concentradas por forma à obtenção de qualquer tipo de tecido. A engenharia tecidual, através da utilização de células estaminais embrionárias, mostra cada vez mais ser capaz de adoptar várias vias em termos de diferenciação, permitindo o desenvolvimento e a regeneração de vários tipos de tecido (Giannoudis e Pountos, 2005).

1.1.2. Estrutura microscópica do osso

1.1.2.1. Células (representam 3% da massa óssea)

As células ósseas podem ser encontradas no próprio tecido ósseo ou num estroma conjuntivo da medula óssea, rico em células estaminais mesenquimatosas. De acordo com Friedenstein (1976) estas células estaminais mesenquimatosas podem originar cinco tipos distintos de células: fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipócitos e mioblastos, em resposta a diferentes sinais moleculares. Estes sinais estão na origem de longas e complexas cascatas de activação de diferentes genes, resultando na produção das principais

categorias de células ósseas: osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e células de revestimento do tecido ósseo. Os osteoblastos, osteoclastos e células de revestimento do tecido ósseo encontram-se nas superfícies ósseas e os osteócitos encontram-se no interior dos ossos.

Do ponto de vista microscópico o periósteeo é descrito como uma membrana de tecido conjuntivo vascularizada, subdividida em duas camadas, a camada externa fibrosa e a camada interna osteogénica (Eyre-Brook, 1984). A camada externa é composta por um tecido conjuntivo denso, relativamente acelular, que contém uma rede de vasos sanguíneos originada de ramos das artérias que vascularizam os músculos e que penetram o periósteeo nos locais de inserção das fáscias musculares (Rhineland 1972, citado por Dias, 2004). Especialmente nos locais de inserção dos músculos e tendões, há espessos feixes de fibras de colagénio, as fibras de Sharpey. Estas formam-se ao nível da camada externa do periósteeo, atravessando a sua camada interna e penetrando na zona periférica do osso cortical, composto pelas lamelas circunferenciais externas e sistemas intersticiais fixando assim, firmemente, o periósteeo ao tecido ósseo cortical subjacente (Bloom e Fawcett, 1994). Assim, esta camada externa tem essencialmente uma função de suporte e de aporte sanguíneo e nervoso à superfície do tecido ósseo cortical. A camada interna do periósteeo é formada por células osteoprogenitoras, com particular importância no crescimento por aposição, essencial ao aumento do diâmetro da diáfise dos ossos longos cilíndricos no esqueleto imaturo e na regeneração óssea de fracturas (Young, 1962 citado por Dias 2004; McKibbin, 1978; Eyre-Brook, 1984; Kawamura e Urist, 1988; Kübler e Urist, 1990; Wlodarski, 1990).

O endósteeo tal como o periósteeo possui células osteoprogenitoras (Eyre-Brook, 1984) e o seu próprio sistema vascular (Rhineland, 1968 citado por Dias 2004). Todas as cavidades do tecido ósseo, incluindo os canais de Havers e os espaços formados pelas trabéculas do tecido ósseo esponjoso, estão delimitadas pelo endósteeo sendo no entanto, particularmente perceptível ao nível da superfície cortical interna da diáfise dos ossos longos (McClements *et al.* 1961 citado por Dias 2004). O endósteeo apresenta potencial osteogénico e hematopoiético e, tal como o periósteeo, está envolvido na regeneração de fracturas como fonte de

células osteoprogenitoras capazes de se diferenciar em osteoblastos (Jee, 1988 citado por Dias 2004) e pelo restabelecimento do suprimento sanguíneo à área em regeneração (Rhineland, 1974 citado por Dias 2004).

a) Osteoblastos – Trata-se de células grandes com 20 a 30 µm, cubóides, de citoplasma basófilo e com quantidades abundantes de retículo endoplasmático rugoso e de aparelhos de Golgi. Estas células têm origem nas células estaminais mesenquimatosas pluripotentes da medula óssea, endóstio, perióstio e pericitos perivasculares (Canfield *et al.*, 2000 citado por Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006a). Os pericitos perivasculares estão concentrados na face externa da membrana basal de pequenos vasos sanguíneos e podem ser induzidos a diferenciarem-se em vários fenótipos de células conjuntivas, o que indica que os pericitos são uma população quase ubiqüitária de células pluripotentes em todos os tecidos vascularizados (Coelho, 2003).

De acordo com Fernández-Tresguerres *et al.* (2006a) a diferenciação osteoblástica é determinada sobretudo por dois factores: factores de crescimento e genéticos.

É hoje consensualmente reconhecido que a diferenciação para a linha osteoblástica é controlada por genes relacionados com a família de genes “Hedgehog” dos quais os mais conhecidos são: *Ihh* – “hedgehog” indiano e *Shh* – “hedgehog sonic” (Yamaguchi *et al.*, 2000).

À medida que as células precursoras se diferenciam expressam proteínas ou marcadores membranários especificamente ligados à sua função. O primeiro indicador da diferenciação osteogénica é a expressão de *Cbfa1*, factor de transcrição (Yamaguchi *et al.*, 2000) e o seu nível mais elevado atinge-se no estágio de pré-osteoblasto. Segundo Komori *et al.*, (1997); Ducy *et al.*, (1997); Hoshi *et al.*, (1999) e Heersche (2002) citado por Fernández-Tresguerres *et al.*, (2006a) estes factores de transcrição do grupo *Cbfa1* (também conhecido por *Runx2*), são de importância capital no processo de diferenciação osteoblástica, assim como as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs). As BMPs constituem os mais potentes reguladores dentro das células estaminais mesenquimatosas na diferenciação osteoblástica (Yamaguchi *et al.*, 2000).

O colagénio tipo I e a osteopontina (OPN) são também expressos no estágio inicial da diferenciação osteogénica, assim como a fosfatase alcalina (ALP). A sialoproteína óssea (BSP) e a osteocalcina (OC) são marcadores que actuam numa fase tardia da diferenciação osteogénica, na fase de diferenciação de pré-osteoblasto para osteoblasto. A OC é exclusivamente sintetizada por osteoblastos e pensa-se estar envolvida na prevenção da mineralização prematura da matriz óssea neoformada, mas ainda desorganizada ou entrançada (Hyldstrup *et al.*, 1988).

Thiede *et al.*, (1994) citado por Intini (2009) contraria este facto dizendo que o RNAm da osteocalcina não é exclusivo de tecidos mineralizados mas pode ser também encontrado em megacariócitos e plaquetas do sangue periférico.

A ALP anteriormente mencionada, é um enzima que estimula a libertação de fosfato inorgânico a partir de ésteres fosfóricos e é necessário para a mineralização da matriz osteóide e, segundo Ogata *et al.*, (2005), este enzima desempenha um papel crucial na iniciação da mineralização da matriz.

Os osteoblastos são as células responsáveis pela síntese de substância base não mineralizada, o osteóide, e pela regulação da sua mineralização. Quando os sais de cálcio são depositados no osteóide fibroso este calcifica-se dando origem à matriz óssea.

As principais funções dos osteoblastos são: sintetizar as proteínas colagénicas e não colagénicas da matriz orgânica; coordenar a disposição das fibras extracelulares da matriz; contribuir por acção da ALP para a mineralização da substância osteóide; desempenhar um papel mediador na reabsorção óssea promovida pelos osteoclastos através da síntese de citocinas específicas (Simonet *et al.*, 1997) e da produção de factores de crescimento.

Durante o período de vida de um osteoblasto este produz até 0,5 a 1,5 μm de substância osteóide por dia (Sommerfeldt e Rubin, 2001). Segundo Fernández-Tresguerres *et al.* (2006a), a produção diária de osteóide ou matriz orgânica, pode mesmo atingir os 2 a 3 $\mu\text{m}/\text{dia}$.

Os osteoblastos têm um período de vida de cerca de uma a dez semanas, ao fim do qual desaparecem quer por apoptose, quer transformando-se em células

de revestimento ósseo (“bone lining cells”) ou em osteócitos. As células de revestimento ósseo podem expressar marcadores osteoblásticos como a BSP, OPN, OC, ALP e até receptores para Paratormona (PTH). Estas células permanecem na superfície do endóstio.

Os osteoblastos actuam como bombas celulares de cálcio e fósforo (Carola *et al.*, 1992).

Os osteoblastos são células que dependem de matrizes celulares e comunicam célula a célula (osteoblasto-osteoblasto ou até com osteócitos) através de uma variedade considerável de proteínas transmembranárias como as integrinas, conexinas e caderinas, bem como através de receptores específicos para citocinas, hormonas e factores de crescimento. Desta forma permitem a passagem de mensageiros como o cálcio, citocinas e prostaglandinas, assegurando a função celular e a sua capacidade de resposta a estímulos de natureza metabólica e mecânica (Lecanda *et al.*, 1998; Ferrari *et al.*, 2000).

Os osteoblastos emitem processos citoplasmáticos, os *filipodia*, para a matriz, comunicando com a rede de osteócitos e com os osteoblastos vizinhos.

De acordo com Shapiro (2008) o tecido ósseo forma-se por uma diferenciação de células osteoprogenitoras quer em osteoblastos mesenquimatosos (MOBL), que sintetizam osso imaturo ou entrelaçado de forma desordenada, quer em osteoblastos de superfície (SOBL), que sintetizam osso em superfície de forma lamelar orientada. Células mesenquimatosas indiferenciadas diferenciam-se em pré-osteoblastos e depois em osteoblastos, segregando fibrilhas de colagénio num ângulo de 360° e numa direcção aleatória de forma pericelular. Estes são, como referido, os MOBL e a matriz óssea sintetizada é imatura ou entrançada. Quando já se formou uma quantidade de osso suficiente de forma a servir como material de suporte estrutural, os osteoblastos passam a designar-se, SOBL e: agrupam-se de forma polarizada em redor da superfície do osso imaturo ou entrançado; agregam fibrilhas de colagénio apenas à superfície do osso e não de forma circunferencial; agregam fibrilhas de orientação paralela ou lamelar.

b) Osteócitos – Trata-se de células de forma estrelada em que o corpo de cada osteócito ocupa uma lacuna e os seus prolongamentos citoplasmáticos, *fillipodia*, se estendem através da matriz por canalículos (Fig. 1.1.). Os osteócitos estão organizados num sincício de células interligadas, assegurando um permanente suprimento de nutrientes e oxigénio, como foi anteriormente mencionado.

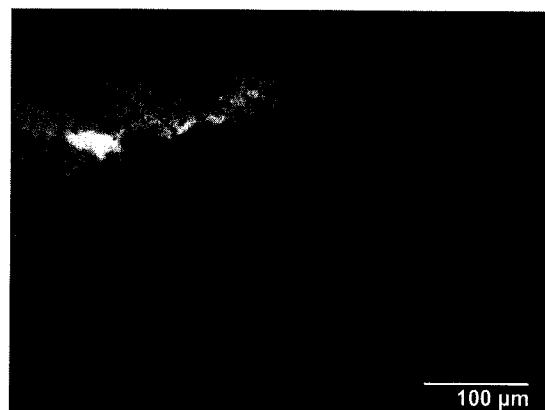


Fig 1.1 – São visíveis os *fillipodia* intercelulares. Coloração Giemsa-eosina. Microscópio Nikon Eclipse 600, imagens obtidas através de câmara digital Nikon DN100.

Em caso de lesão óssea, a interrupção do suprimento sanguíneo pode causar hipoxia e necrose de osteócitos situados a mais de 0,1 mm de um vaso capilar intacto (Ham, 1952, citado por Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006a).

Os osteócitos são as células principais do osso maduro, constituindo 90% da totalidade da população das células ósseas. Os osteócitos provêm dos osteoblastos que sintetizaram tecido ósseo em seu redor, podendo mesmo ser considerados como osteoblastos altamente diferenciados e especializados, embora do ponto de vista morfológico e funcional sejam distintos (Sommerfeldt e Rubin, 2001). À semelhança dos osteoblastos, estas células provêm de células estaminais mesenquimatosas totipotentes, constituindo o estágio final da linha osteoblástica e sendo incapazes de se replicar. Têm de forma geral, para além dos mesmos marcadores ou receptores de superfície que os osteoblastos, um marcador único e fortemente expresso, o CD44 (Fernández-Tresguerres *et al.*,

2006a).

Estas células, juntamente com os osteoclastos, desempenham um papel activo na hemostase do cálcio. Os osteócitos participam também na síntese e mineralização da matriz osteóide, embora se pense que a sua principal função seja no controlo da remodelação óssea, pela detecção de variações mecânicas de peso num fenómeno denominado transdução mecânica (Lanyon, 1993). Este conceito refere-se à conversão de uma força biofísica numa resposta celular e compreende 4 passos:

Acoplamento mecânico – o peso mecânico causa deformações ósseas que distendem ou comprimem as células e criam movimentos dentro dos canaliculos;

Acoplamento bioquímico – é mediado pela força de transdução através da estrutura das integrinas – citoesqueleto – matriz nuclear (a célula como mecanosensor);

Transmissão do sinal bioquímico – mediado *via* osteoblastos de superfície e células endoteliais de superfície que reagem a alterações mecânicas cíclicas ou osteoblastos/osteócitos que comunicam *via* junções intercelular, ligando processos adjacentes intercelulares e transmitindo pequenos mensageiros celulares ou sinais eléctricos;

Resposta celular efectora – é aquela em que os efeitos dos três passos anteriores dirigem ou inibem a resposta celular (Duncan e Turner, 1995).

c) Osteoclastos – Trata-se de células gigantes com cerca de 100 µm multinucleadas (três ou mais núcleos), ricas em mitocôndrias e vacúolos e com origem nas células estaminais da linhagem hemapoiética fagocitária chamadas “Granulocyte-Macrophage-Colony-Forming Units”, GM-CFU, as células precursoras dos monócitos e macrófagos (Mundy, 1993). O ponto exacto em que as células precursoras dos osteoclastos divergem da linha dos macrófagos não é claro. As células precursoras dos osteoclastos migram para o osso por via sistémica ou por migração directa a partir da medula óssea (Serke *et al.*, 1991). Os osteoclastos são células altamente migratórias e polarizadas que contêm no interior dos seus lisossomas um arsenal de enzimas (Teitelbaum, 2000). Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção de tecido ósseo. São células com

uma semi-vida breve *in vitro* e *in vivo*, que uma vez diferenciadas e na ausência de células de suporte como as células da medula óssea, osteoblastos ou factores de crescimento, morrem rapidamente por fenómenos de apoptose (Wyllie *et al.*, 1980; Giannoudis *et al.*, 2007c)

Os osteoclastos contêm uma fosfatase tartrato-ácido resistente (TRAP), que permite a desfosforilação das proteínas. A detecção *in vitro* e *in vivo* deste enzima é uma das formas de identificação da actividade destas células.

Os osteoclastos possuem receptores para a calcitonina e a sua actividade pode também ser evidenciada pelo grau de expressão dos receptores para a calcitonina, através de métodos imuno-histoquímicos (Giannoudis *et al.*, 2007c).

A migração dos monócitos para o local de reabsorção óssea ocorre após a recepção de sinais específicos induzidos por proteínas ou citocinas. Aí fundem-se com outros monócitos formando macrófagos multinucleados antes de se diferenciarem em osteoclastos especializados (Ross, 2003).

A lista de citocinas ou factores de estimulação de colónias que estão implicados no desenvolvimento dos osteoclastos pode ser dividida em: a) Factores que induzem a diferenciação e que actuam de forma endócrina: 1,25di-hidroxivitamina D₃ (1,25 (OH)₂D₃), PTH e prostaglandinas (PGs); b) Factores que suportam a formação de osteoclastos e que actuam de forma autócrina ou parácrina como a interleucina-1 (IL-1), interleucina-3 (IL-3), interleucina-6 (IL-6), interleucina-11 (IL-11), factor de necrose tumoral α (TNF α), factor de estimulação das colónias de macrófagos granulócitos (GM-CSF), factor de estimulação das colónias de macrófagos (M-CSF), factor inibidor da leucemia (LIF), desintegrina e mataloproteínase 8 (ADAM8), annexina II (AX-II), péptido inibidor dos osteoclastos 1 e 2, OIP-1 e OIP-2 (Roodman, 2006).

Os osteoclastos têm duas características específicas na sua membrana: um bordo rugoso onde tem lugar a reabsorção e uma área lisa rica em microfilamentos de actina com integrinas que servem de âncora para se fixarem à matriz óssea. Esta última zona, desprovida de organelos, permite a concentração das substâncias envolvidas no processo de degradação da matriz extracelular óssea, tais como enzimas proteolíticas (proteinases lisosomais, collagenases,

metaloproteases, catepepsina K e glucoronidase) responsáveis pela degradação da matriz orgânica, e os iões hidrogénio (H^+) responsáveis pela dissolução da componente mineral (Mundy, 1993). O pH neste espaço de reabsorção é ácido (pH 3), atingido pela libertação de H^+ via actividade da anidrase carbónica (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006a).

Para que o processo de reabsorção óssea ocorra é necessário que os osteoclastos repousem directamente sobre a matriz extracelular óssea mineralizada. O primeiro sinal de um futuro local de reabsorção na superfície do endóstio é a retracção das células de revestimento do tecido ósseo, pela influência de factores sistémicos, como por exemplo a PTH (Jones e Boyde, 1976). Embora a totalidade do mecanismo seja desconhecida, sabe-se que todas as acções que conduzem ao início da reabsorção óssea são intermediadas pelos osteoblastos na medida em que se crê que os osteoclastos não possuem receptores para a PTH ou $1\alpha,25(OH)_2D_3$, como a própria acção da maioria dos mensageiros celulares, como as citocinas ou prostaglandinas, é também mediada pelos osteoblastos. Os osteoblastos transmitem posteriormente o sinal aos precursores locais dos osteoclastos. (Suda *et al.*, 1996, citado por Dias, 2004). Chambers *et al.*, (1985) sugeriu que após esta retracção celular ocorria a digestão da camada superficial de tecido osteóide por meio de uma collagenase secretada pelos osteoblastos. Uma vez exposta a superfície mineralizada, os osteoclastos aderem a esta, libertando protões que acidificam a zona permitindo assim que, neste meio ácido, se processe a dissolução da fracção mineral da matriz extracelular e, por acção dos enzimas proteolíticos, a digestão da fracção proteica da matriz óssea (Väänänen e Zhao, 2002, citados por Dias, 2004). Uma vez recrutados para a área em que se irá processar a reabsorção óssea, os osteoclastos aderem à superfície óssea mineralizada com o bordo rugoso e selam os bordos da área com as integrinas. As integrinas osteoclásticas, sobretudo a $\alpha_v\beta_3$, reconhecem a sequência Arg-Gly-Asp (RGD) no colagénio bem como outras proteínas na matriz osteóide, as quais se ligam, iniciando a sua digestão.

Os osteoclastos reabsorvem tecido ósseo totalmente mineralizado não funcional ou em excesso, em locais designados por lacunas de Howship. Um osteoclasto activado é capaz de reabsorver até $200.000\ \mu m^3$ /dia. (Albright e

Skinner, 1987, citado por Sommerfeld e Rubin, 2001).

Segundo Fernández-Tresguerres *et al.*, (2006a) sabe-se também que a intervenção dos osteoblastos é determinante para a diferenciação osteoclástica pois o factor de estimulação das colónias de macrófagos (M-CSF), produzido pelos osteoblastos, é essencial nas fases iniciais da osteoclastogénese e para a formação das células gigantes multinucleadas, anteriormente mencionadas.

A diferenciação e as funções dos osteoclastos são reguladas, via osteoblastos, quer por hormonas sistémicas quer por citocinas produzidas no microcosmos ósseo (Giannoudis *et al.*, 2007c).

A regulação do processo de osteoclastogénese é baseada na existência de três moléculas chave: OPG (osteoprotegerina), proteína solúvel produzida por pré-osteoblastos e osteoblastos, pertencente à família de factores de necrose tumoral (TNF). Esta proteína tem como função a inibição da diferenciação dos osteoclastos (Simonet, 1997; Yasuda *et al.*, 1998; Burgess *et al.*, 1999); RANKL (ligando situado à superfície dos pré-osteoblastos e osteoblastos); RANK (um receptor de RANKL, situado à superfície dos pré-osteoclastos e osteoclastos).

O RANKL, anteriormente designado por ODF, factor de diferenciação osteoclástica (Simonet *et al.*, 1997; Burgess *et al.*, 1999) é uma citocina transmembranária que pertence à família dos TNF (Lacey *et al.*, 1998).

De acordo com Amling *et al.* (2006) OPG e RANKL podem actuar de forma parácrina ou endócrina na regulação da osteoclastogénese. Estes dois mecanismos não são antagonistas mas sim sinérgicos (Simonet *et al.*, 1997, e Lacey *et al.*, 1998). A interacção de RANKL com o seu receptor RANK inicia a actividade osteoclástica, estimulando a reabsorção óssea. Os efeitos *in vivo* e *in vitro* do RANKL, são inibidos pela OPG (Simonet *et al.*, 1997). Quando OPG e RANKL se unem, a ligação entre este ligando e o seu receptor RANK é inibida e é impedida a diferenciação osteoclástica (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006a).

O osso é assim o único órgão que contém uma célula, o osteoclasto, cuja única função é destruir ou reabsorver o próprio órgão que a produz (Baron *et al.*, 1993, citado por Amling *et al.*, 2006; Teitelbaum, 2000).

d) Células osteogénicas – São as células mais imaturas e indiferenciadas, referidas como estaminais, e que, no caso concreto do tecido ósseo são referidas como osteogénicas. Estas células existem no endóstio e perióstio e originam-se a partir de células estaminais mesenquimatosas da medula óssea (Owen, 1978; Carola *et al.*, 1992). São células com capacidade para formar novas células do osso. As moléculas de sinalização bioquímica geradas durante a remodelação óssea ou regeneração de uma fractura aumentam a população local destas células.

O ambiente local só por si influencia de forma determinante a via de diferenciação que estas células seguirão já que se o ambiente que circunda uma célula de diferenciação osteogénica for muito vascularizado, como no caso do osso saudável, a célula seguirá a via osteoblástica, produzindo osso. Uma vez rodeado de osso, este osteoblasto transformar-se-á em osteócito e irá ser responsável pela nutrição e manutenção local do osso. Caso o ambiente que circunde a célula seja pouco vascularizado, como no caso de uma fractura recente, a célula irá diferenciar-se numa célula condroblástica e será produzida cartilagem. Uma vez rodeado de cartilagem, o condroblasto transformar-se-á em condrócito e produzirá a matriz cartilaginosa até esta ser substituída por osso por ossificação endocondral (Jee e Kimmel, 1976, citado por Hing 2004; Owen, 1978).

1.1.2.2. Matriz extracelular (MEC) (95% da matéria seca do osso)

a) Componente orgânica - A componente orgânica é constituída fundamentalmente por proteínas colagénicas e não colagénicas (NCPs).

Colagénio – Consiste em fileiras de moléculas de tropocolagénio, elas próprias formadas por cadeias polipeptídicas com configuração helicoidal. No osso o tipo de colagénio mais abundante é o colagénio Tipo I (superior a 95%), existindo também algum colagénio Tipo V (inferior a 5%).

O colagénio é a proteína mais abundante no organismo e ocorre em diferentes tipos de tecido conjuntivo, quer no mineralizado quer no não mineralizado. As fibras de colagénio ligam-se por meio de pontes de hidrogénio entre lisinas e hidrolisinas. O colagénio é o responsável pela dureza e visco-

elasticidade, características do osso (Gray *et al.*, 1995, citado por Hutmacher *et al.*, 2007).

Proteínas não colagénicas (NCPs) – Neste grupo incluem-se mucopolissacarídeos sulfatados e ácidos, proteoglicanos (ácido hialurónico, sulfato de condroitina, biglican e decorin), fosfolípidos e glicoproteínas. Nesta componente há proteínas com interesse biológico relevante: OC, BSP, OPN, ON e fibronectina. São proteínas produzidas pelas células ósseas, como foi anteriormente referido e desempenham um papel importante na mineralização e remodelação óssea. A maioria destas proteínas tem a sequência RGD (Arg-Gly-Asp) e aquelas que desempenham funções específicas no tecido ósseo são também designadas por SIBLINGS - Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein (Fisher e Fedarko, 2003). Esta sequência é crítica para a ligação aos receptores de integrinas localizados à superfície das células (Young, 2003) e reconhecida pelos osteoblastos e integrinas osteoclásticas ($\alpha\beta3$, entre outras). Esta sequência actua também nos receptores celulares das células ósseas de superfície, permitindo a adesão de células à matriz, activando diversos sinais com diversos sentidos (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006a).

Aparentemente todas são multifuncionais e a sua composição relativa na matriz óssea aparenta ser auto-regulável através de um efeito de feedback na expressão das proteínas não colagénicas pelos osteoblastos (Butler 2000; Gerstenfeld 2000, ambos citados por Hing, 2004).

b) Componente inorgânica - .A componente inorgânica ou mineral, para além de ser uma reserva de cálcio e fósforo, constitui uma importante reserva de proteínas, que participam na regulação da diferenciação celular e na integridade e função do tecido ósseo (Young, 2003).

Osso mineral – Representa 65% da massa óssea e é formado por cálcio, fósforo e carbonato nas proporções de 10:6:1, respectivamente e em menor quantidade por magnésio, sódio, potássio, manganésio e flúor (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006a).

É incorrectamente referido como hidroxiapatite (HA) pois trata-se de uma cerâmica de fosfato de cálcio hidratada com uma estrutura cristalográfica

semelhante, mas não idêntica, ao osso mineral natural. É cerca de quatro vezes menor que as apatites naturais, o que contribui para que seja menos perfeita em termos estruturais, e mais reactiva e solúvel, o que facilita a sua renovação (Sommerfeldt e Rubin, 2001).

1.1.2.3. Outros constituintes

1.1.2.3.1. Factores de crescimento (GFs)

São polipéptidos que regulam o crescimento, função e motilidade celular, tendo como resultado a neoformação de um tecido. Os factores de crescimento ósseo interferem na síntese de osso neoformado, actuando na população celular local da medula óssea e nas superfícies dos ossos. Se actuarem directamente sobre osteoblastos são reguladores locais específicos do crescimento celular e se actuarem indirectamente através da promoção da migração e diferenciação de células endoteliais ou de células osteoprogenitoras, induzem a angiogénese ou a osteogénese, (Urist, 1965; Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006a).

A matriz óssea contém um número elevado de GFs (Solheim, 1998; Yoon e Boden, 2002) que inclui factores de crescimento dos fibroblastos (FGFs), factores de crescimento da insulina I e II (IGF-I, IGF-II), factores de crescimento das plaquetas (PDGF) e uma família de super genes, factores β de transformação do crescimento (TGF- β). Esta família de factores β de transformação do crescimento tem cerca de 43 membros que incluem, entre outros, TGF- β 1-5 e as proteínas ósseas morfogénicas, BMPs, (Burt e Law, 1994), anteriormente mencionadas.

Os factores de crescimento já referidos, como as TGF- β , IGF e FGFs, actuam em células precursoras de osso já diferenciadas, provocando a sua divisão ou incrementando a sua produção de matriz extracelular e de proteínas. Pelo contrário, as BMPs são os únicos factores de crescimento com a capacidade de estimular directamente a diferenciação de células estaminais mesenquimatosas, quer na direcção condroblástica quer na osteoblástica (Reddi *et al.*, 1987; Chen *et al.*, 1991; Skinner *et al.*, 2003).

As BMPs desempenham um papel crucial na modulação da diferenciação mesenquimatosa induzindo a sequência completa da formação óssea endocondral

(Wozney e Rosen, 1998).

As BMPs não são idênticas no seu potencial osteoindutivo, pois por exemplo as BMP-5 são necessárias em quantidades muito superiores para induzir a mesma quantidade de osso comparado com BMP-2 ou 7 (Wozney e Rosen, 1998).

1.2. Vascularização óssea

A vascularização óssea depende de dois sistemas, um interno e outro externo. O sistema interno é fornecido por intermédio das artérias nutritivas que após atravessarem a cortical ao nível do *foramen* nutritivo, penetram na diáfise e subdividem-se em artérias medulares, dirigindo-se em seguida para epífises. Nos ossos longos irrigam sequencialmente as diáfises, denominando-se artérias diafisárias e, seguidamente as epífises onde se passam a denominar artérias epifisárias. As artérias medulares nascem das artérias colaterais laterais que nutrem as artérias corticais (Perry 1999).

O sistema externo está dependente do perióstio. Pela sua face interna, a vascularização está estritamente ligada à circulação cortical interna. Pela sua face externa, a vascularização está em continuidade com o sistema vascular circundante, sobretudo através dos músculos que se inserem nesse mesmo osso. O perióstio não tem senão uma função acessória na vascularização cortical pois esta é essencialmente feita pelos vasos medulares (Perry 1999).

Há uma considerável quantidade de anastomoses intra-corticais entre os vasos interiores da cavidade medular e os vasos do perióstio (Rhineland, 1968, citado por Shapiro, 2008).

1.3. Tipos de ossificação

Como já foi referido, o tecido ósseo é singular no conjunto de tecidos dos vertebrados no que diz respeito à sua capacidade de se auto-regenerar, uma vez que, e em determinadas condições, cicatriza produzindo tecido ósseo exactamente igual ao original, *restitutio ad integrum*, ao passo que os outros tecidos são substituídos, em menor ou maior grau, por tecido conjuntivo.

O osso é um tecido dinâmico, em constante formação e reabsorção, num processo equilibrado, denominado processo de remodelação, e que permite em condições normais, a renovação anual de cerca de 5% do osso cortical e 20% do osso esponjoso. Apesar do osso cortical constituir cerca de 70% do volume total de osso, como foi anteriormente mencionado, a taxa metabólica do osso esponjoso é cerca de 10 vezes superior à do osso cortical, já que a relação entre a superfície ocupada e o volume é substancialmente superior. Assim, e em conjunto, apresentam um valor médio de renovação de 5 a 15% da totalidade da massa óssea por ano (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006a,b). A remodelação óssea é primariamente um processo autócrino e parácrino (Rodan e Martin, 1981).

Segundo Fernández-Tresguerres *et al.* (2006a) a remodelação óssea pode ser explicada em 5 fases distintas: latência, activação, reabsorção, formação e mineralização:

a) Fase de latência – fase em que o osso está em “repouso”. Os factores que desencadeiam a remodelação óssea permanecem ainda desconhecidos.

b) Fase de activação – o fenómeno inicial é a activação da superfície óssea através da retracção das células de revestimento do tecido ósseo, fenómeno já referido anteriormente, e a digestão da membrana do endóstio, sob a acção da collagenase. Uma vez exposta a superfície mineralizada os osteoclastos circulantes nos vasos sanguíneos vizinhos são atraídos.

c) Fase de reabsorção – os osteoclastos atraídos ao local iniciam a reabsorção da matriz osteóide e da matriz mineral. Este processo é completado pelos macrófagos e permite a libertação de factores de crescimento contidos na matriz, muito particularmente dos factores β de transformação do crescimento (TGF- β), factor de crescimento das plaquetas (PDGF), factor de crescimento da insulina I e II (IGF-I e II).

d) Fase de formação – quase em simultâneo com a fase anterior e nas áreas de reabsorção, inicia-se o fenómeno de reagrupamento pré-osteoblástico desencadeado pelos inúmeros factores de crescimento libertados, que actuam como quimiotácticos e que estimulam a proliferação destas células (Lind *et al.*, 1995). Os pré-osteoblastos sintetizam uma substância cimentosa à qual o novo

tecido adere e expressam proteínas ósseas morfogenéticas, responsáveis pela diferenciação das células precursoras em osteoblastos. Ao fim de alguns dias, os osteoblastos já diferenciados sintetizam osteóide que preenche as lacunas existentes.

Em qualquer um dos tipos de ossificação a reabsorção óssea antecede sempre a regeneração. Este fenómeno ocorre em áreas circunscritas do osso cortical e esponjoso chamadas “Basic Multicellular Units”, BMU (Amling *et al*, 2006), ou unidades multicelulares básicas. Esta remodelação ocorre permanentemente ao longo da vida de cada vertebrado, embora o balanço não seja sempre igual, na medida em que, em condições normais, apenas no primeiro terço de vida o balanço é positivo. No esqueleto humano há cerca de 354 milhões de BMU e 3 a 4 milhões são activadas por ano, o que significa que o esqueleto é totalmente renovado por cada período de 10 anos (Fernández-Tresguerres *et al*, 2006a,b).

e) Fase de mineralização – a mineralização começa cerca de 30 dias após a deposição de osteóide e termina, no osso esponjoso ao fim de 90 dias, e 130 dias no osso cortical. Após este período, o osso entrará de novo na fase de latência.

Num animal adulto os modelos celulares e moleculares da regeneração óssea pós-traumática são semelhantes aos que se processam no embrião, o que sugere mecanismos análogos para o controlo da formação de osso no esqueleto adulto e embrionário (Rosen e Thies, 1992).

Do ponto de vista histológico há dois tipos de ossificação primária e secundária.

A primária é rara e refere-se a uma tentativa directa de restabelecimento da continuidade destruída das células do osso cortical. Esta ossificação requer contacto total entre os fragmentos e uma estabilidade quase absoluta, com minimização das forças interfragmentárias (McKibbin, 1978).

A ossificação secundária ocorre na maioria das lesões ósseas e envolve a ossificação intramembranosa e endocondral, com formação de calo ósseo. As células osteoprogenitoras do perióstio estão comprometidas e são activadas as

células estaminais mesenquimatosas indiferenciadas multipotentes (Giannoudis *et al.*, 2007d). O calo ósseo resulta de uma reacção fisiológica aos movimentos interfragmentários e requer a existência de resíduos de vitalidade das células e um fluxo sanguíneo adequado (McKibbin, 1978).

Do ponto de vista morfológico há dois tipos de ossificação, intramembranosa e endocondral. Cada uma delas é característica de determinado tipo de osso, bem como da fase de desenvolvimento em que o osso é formado.

1.3.1. Ossificação intramembranosa

A ossificação intramembranosa é característica do feto ou esqueleto imaturo e caracteriza-se pela formação de tecido ósseo directamente a partir de tecido mesenquimatoso (embrionário). As células mesenquimatosas primitivas transformam-se em células osteogénicas que por sua vez se transformam directamente em osteoblastos, tendo como resultado uma formação directa de osso (Sommerfeldt e Rubin, 2001).

Este tipo de ossificação caracteriza-se por uma invasão de capilares na zona mesenquimatosa e diferenciação destas células mesenquimatosas em osteoblastos. Estes osteoblastos depositam matriz óssea conduzindo à formação de espículas de osso. Estas espículas crescem e eventualmente fundem-se entre si, formando trabéculas. À medida que as trabéculas aumentam, em tamanho e em número, tornam-se interligadas e formam osso imaturo ou entrançado. Este tipo de osso é posteriormente substituído por osso de estrutura mais organizada e mais forte, o osso lamelar (Marks e Hermey, 1996, citado por Kanczler *et al.*, 2008).

Um exemplo típico de ossificação intramembranosa no adulto é o crescimento ósseo dos ossos em largura (Carola *et al.*, 1992).

1.3.2. Ossificação endocondral

A ossificação endocondral é característica do esqueleto maduro na medida em que a formação de tecido ósseo é feita a partir de um molde de cartilagem hialina preexistente que é posteriormente destruído e substituído por tecido ósseo

propriamente dito (Sommerfeldt e Rubin, 2001). Implica a existência de um calo ósseo e é mediada pela camada interna do perióstio e pelos tecidos medulares. Implica também a existência de espaço interfragmentar e mobilidade (Shapiro, 2008). As células mesenquimatosas primitivas transformam-se em condroblastos que formam o molde cartilágneo o qual é posteriormente ossificado pela invasão de osteoblastos a que é sujeito.

O tecido ósseo final proveniente de cada um dos diferentes tipos de ossificação é indistinguível. No embrião, os ossos que revestem o cérebro, a maxila e a mandíbula formam-se através da ossificação intramembranosa, ao passo que a omoplata e ossos que formam os membros torácicos e pélvicos, são formados por ossificação endocondral (Hing, 2004).

1.4. Marcação biológica dinâmica da formação óssea:

A fisiologia óssea normal resulta do balanço entre a formação, a reabsorção e a remodelação. A formação de osso lamelar é constante: 1 a 2 $\mu\text{m}/\text{dia}$ ao passo que a reabsorção, depois de iniciada, decorre à velocidade de 60 $\mu\text{m}/\text{dia}$. O processo de mineralização pode ser avaliado pela marcação óssea com corantes intravitalis fluorescentes que se ligam fortemente à fase mineral da matriz durante a osteogénese e que são persistentes após a descalcificação, garantindo a sua presença por tempo prolongado na estrutura mineralizada pela formação de complexos quelados com a apatite (Rahn, 1999). A marcação com este tipo de corantes é um método de medição correctamente estabelecido da taxa de aposição mineral (TAM ou MAR) em que a matriz osteóide produzida pelos osteoblastos é depositada e mineralizada para formar novo osso (Frost 1969). A largura da camada de osso neoformado na superfície das trabéculas é expressa em unidades de micra/dia (Meunier *et al.*, 1977 citado por Bloebaum *et al.*, 2007; Rauch, 2006) e é determinada medindo a distância entre duas marcações fluorescentes paralelas (Frost *et al.*, 1961, citado por Bloebaum *et al.*, 2007). Este autor fez um total de cinco medições ao longo de cada marcação dupla e a TAM foi calculada (Frost 1983a citado por Bloebaum *et al.*, 2007; Frostb 1983 Bloebaum *et al.*, 2007) com base na seguinte fórmula:

$$\text{MAR } (\mu\text{m}/\text{dia}) = \frac{\sum x(e)(\pi/4)}{nt}$$

O $\sum x$ é a soma de todas as medições feitas entre duas linhas paralelas e e é o factor de calibração em micrómetros (μm), $\pi/4$ é o factor de correcção obliquidade, n é o número total de medições e t é o intervalo de tempo expresso (em dias).

Os corantes intravitalis fluorescentes por apresentarem fluorescência quando submetidos a luzes de diferentes comprimentos de onda em fundo escuro, permitem a avaliação do sucesso do processo de mineralização dum material implantado (local, quantidade, cronologia, velocidade e direcção). Os corantes intravitalis fluorescentes mais empregues no estudo da formação óssea são a calceína verde, o xilenol laranja e as tetraciclina. Estes produtos são administrados por via subcutânea ou *per os* e de forma contínua no alimento ou na água e distribuídos pela circulação sanguínea a todos os locais acedidos por esta (Rahn e Perren, 1970; 2003; Rahn, 1999).

A combinação multicolor de corantes intravitalis fluorescentes sequenciada facilita a interpretação das marcações subsequentes. Os filtros óptimos incluem a excitação num largo espectro desde o ultra violeta ao azul, e um filtro barreira que transmite a totalidade do espectro visível. A avaliação inclui aspectos qualitativos e quantitativos. A sequência das diferentes cores pode indicar a direcção do processo de mineralização (Rahn, 1999).

A calceína é um derivado fluoresceínico com dois grupos iminodiacéticos, responsáveis pelas propriedades quelantes. Emite uma fluorescência verde. A emissão máxima observa-se quando as preparações histológicas são submetidas a luz com comprimento de onda de 520 nanómetros, verificando-se a excitação máxima aos 495 nanómetros. O xilenol laranja também contém dois grupos iminodiacéticos. Emite uma fluorescência cor-de-laranja. A emissão máxima observa-se quando as preparações histológicas são submetidas a luz com comprimento de onda de 610 nanómetros, verificando-se excitação máxima aos 580 nanómetros, com um pico lateral aos 460 nanómetros. Estes dois corantes



fluorescentes têm como principal qualidade apresentarem um óptimo contraste entre eles nas preparações histológicas, permitindo uma excelente video-digitalização e análise automática da imagem (Rahn e Perren, 1971; Rahn, 1999).

No humano, os únicos marcadores ósseos legalmente autorizados são as tetraciclina, sendo possível obter uma intensidade de fluorescência óssea suficiente com a administração das doses clínicas máximas. Noutras espécies a tetraciclina pode ser utilizada como terceiro corante fluorescente e em aplicações de rotina incluídas num protocolo de marcação tricolor, juntamente com a calceína verde e o xilenol laranja. Nesta marcação tripla e quando se pretende separar as marcações por excitação selectiva utilizando apenas a combinação das fluorescências verde da calceína com a cor-de-laranja do xilenol laranja, não se pode incluir a tetraciclina pois o seu espectro de emissão sobrepõe-se fortemente ao dos outros fluocromos no verde e laranja, o que impossibilita a separação completa de outras cores (Rahn, 1999).

1.5. Factores de regulação da remodelação óssea

1.5.1. Factores sistémicos

1.5.1.1. Factores genéticos

A genética tem um papel preponderante na determinação da massa óssea na medida que se crê que 60 a 80% da regulação da constituição/formação óssea seja determinada geneticamente (Grant e Ralston, 1997, citado por Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006b).

1.5.1.2. Factores mecânicos

Um dos mais antigos e conhecidos factos relacionados com a importância do trabalho sobre um órgão e neste caso sobre o osso é o conhecimento de que a “forma segue a função”, de acordo com a lei de Wolff, já anteriormente referida. Sabe-se também que a acção muscular transmite ao osso a tensão detectada pela rede de osteócitos, fenómeno designado por transdução mecânica, também já anteriormente mencionado.

1.5.1.3. Factores vasculares/nervosos

A vascularização do osso, como de resto a de qualquer órgão, é fundamental para a sobrevivência das células que o compõem. A vascularização constitui a primeira fase da ossificação e da fase inicial da resolução de qualquer fractura. A enervação do osso pelo sistema nervoso simpático e por fibras nervosas sensoriais é também fundamental para a sua fisiologia.

O recente desenvolvimento da endocrinologia molecular permitiu suspeitar da existência de uma regulação comum, com origem no sistema nervoso central, da formação óssea, do peso corporal e da reprodução mediada pela leptina sob controlo hipotalâmico (Houseknecht *et al.*, 1998; Karsenty, 2000; Maor *et al.*, 2002). Esta substância, até recentemente associada a um eventual combate à obesidade, actua centralmente sendo a sua actividade mediada por receptores específicos localizados nos núcleos hipotalâmicos, pertencentes à classe I das citocinas, e por diversos receptores transmembranários. Por esta razão sabe-se que a formação óssea está também sob controlo hipotalâmico, apesar de se desconhecer a natureza do sinal a jusante deste último.

Num estudo de Burguera *et al.* (2001) em que são comparados os efeitos da leptina na terapia de substituição por estrogénios em ratas com perdas ósseas provocadas pela ooforectomia, a leptina reduziu eficazmente a perda de osso trabecular, as alterações da própria arquitectura trabecular e a formação óssea perióstica. O facto de ser utilizada conjuntamente com os estrogénios torna a sua acção ainda mais eficaz. Esta substância aumentou significativamente o RNAm para a osteoprotegerina e a sua secreção, além de reduzir *in vitro* os níveis de RNAm para o RANKL em células do estroma da medula óssea em humanos. Foi assim demonstrado, por Burguera *et al.* (2001), que a terapêutica com leptina é eficiente na prevenção da perda óssea induzida pela ooforectomia e que este efeito é, parcialmente, mediada interacção osteoprotegerina/RANKL.

1.5.1.4. Factores nutricionais

Para a maioria dos seres humanos é necessária uma quantidade mínima de cálcio por dia. A maioria dos autores advoga que no humano até aos 25 anos e em

condições normais, são necessários cerca 1200 mg/dia, não menos do que 1000 mg/dia dos 25 a 45 anos, e após a menopausa a dose deverá aumentar para 1500 mg/dia.

Os factores nutricionais adquirem uma importância considerável na medida em que podem ser facilmente manipuláveis.

1.5.1.5. Factores hormonais

O desenvolvimento normal do esqueleto é condicionado pelo funcionamento correcto do sistema endócrino através de hormonas como mensageiros sistémicos que actuam quer à distância do seu local de produção (efeito endócrino), quer localmente, mediante a regulação da síntese e acção de factores locais que intervêm directamente no metabolismo celular (efeitos autócrino e parácrino, respectivamente).

As hormonas com acção importante na fisiologia óssea são:

a) Hormonas da tiróide

Estas desempenham duas acções opostas:

- Estimulam a síntese de matriz osteóide e a sua mineralização pelos osteoblastos, favorecendo a síntese de IGF-I;
- Estimulam a reabsorção óssea por aumentarem o número dos osteoclastos e intensificarem a sua função.

Calcitonina

É uma hormona produzida nas células “C” ou parafoliculares da tiróide. É uma hormona hipocalcemiante pois inibe a reabsorção óssea mediante a redução do número e da actividade dos osteoclastos. Este efeito é limitado no tempo pois se aplicado repetidamente promove uma insensibilização dos osteoclastos à sua acção (Prieto, 1999 citado por Fernández-Tresguerres, *et al.* (2006b).

b) Paratormona (PTH)

É uma hormona produzida na paratiróide em resposta à hipocalcémia. É a hormona hipercalcemiante com efeito mais marcado. Desempenha um papel activo na homeostase do cálcio, quer directamente sobre o rim e o osso, quer

indirectamente no trato intestinal. À semelhança das acções de outras hormonas, também a paratormona pode ter dois efeitos opostos, ou seja, estimular quer a reabsorção, quer a formação óssea (Canalis *et al.*, 1989). Esta dualidade poderá ser explicada pela forma de libertação da paratormona. Assim, a presença contínua da paratormona estimula a reabsorção óssea mediante a síntese de RANKL (factor favorecedor da osteoclastogénese, anteriormente mencionado), ao passo que a libertação em doses intermitentes, promove a síntese de RANKL mas uma diminuição na quantidade de osteoblastos para apoptose.

c) Vitamina D₃ ou Calcitriol (1,25 (OH)₂D₃,

É uma hormona esteróide que promove a absorção de cálcio e fósforo a nível intestinal, promovendo assim a formação óssea.

d) Androgénios

São hormonas com efeito anabólico no osso pois promovem estimulação dos receptores osteoblásticos sendo também, desta forma, que actuam como mediadores do pico de hormona do crescimento (GH) na puberdade.

e) Estrogénios

São hormonas com efeitos exuberantes sobre a formação do esqueleto, em particular no Homem e no período da adolescência para ambos os sexos. Desempenham um papel fundamental no encerramento das placas de crescimento.

Os estrogénios actuam promovendo a formação óssea em duas perspectivas: por um lado aumentando o número e a actividade dos osteoblastos e por outro lado inibindo a reabsorção óssea.

Foram encontrados receptores para os estrogénios nos osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Na osteoclastogénese, os estrogénios actuam aumentando os níveis de osteoprotegerina (OPG), proteína osteoblástica que, como referido anteriormente, inibe a reabsorção óssea (Hofbauer *et al.*, 1999).

f) Progesterona

Esta hormona tem um efeito anabólico sobre o osso pois actua directamente sobre os osteoblastos que possuem receptores específicos ou indirectamente por competição com os glucocorticóides nos receptores dos osteoblastos.

g) Insulina

Esta hormona estimula a síntese de matriz óssea quer directa quer indirectamente, aumentando a síntese hepática de IGF-I.

h) Glucocorticóides

São hormonas que em doses elevadas, têm efeitos catabólicos sobre o osso pela inibição da síntese de IGF-I pelos osteoblastos e supressão directa da BMP-2 e Cbfa1, ambos factores críticos na osteoblastogénese (Manolagas, 2000). Há no entanto estudos que apontam para a capacidade osteogénica dos glucocorticóides em doses fisiológicas, favorecendo a diferenciação osteoblástica (Lukert e Kream, 1998, citado por Fernández-Tresguerres *et al.* 2006a).

i) Hormona do crescimento (GH)

É uma hormona da adeno-hipófise que actua sobre a regulação óssea de forma endócrina, autócrina e parácrina (Harvey e Hull, 1998, citados por Fernández-Tresguerres *et al.* 2006b). Esta hormona actua de forma directa sobre receptores próprios nos osteoblastos, promovendo a sua actividade e assim aumentando a síntese de colagénio, osteocalcina e fosfatase alcalina, e indirectamente através de um aumento da síntese de IGF-I e II, pelos osteoblastos. Estes factores de crescimento estimulam a síntese e diferenciação dos osteoblastos, aumentando o seu número e a sua função.

j) Melatonina

Não sendo uma hormona esta substância produzida pela glândula pineal, regula uma variedade de processos fisiológicos (ritmo circadiano, função reprodutiva sazonal e temperatura corporal) e interfere com o metabolismo ósseo. Nos estudos de Satomura (2007), a melatonina em doses terapêuticas estimula a diferenciação osteoblástica *in vitro* e promove a formação de osso cortical em ratos. Neste estudo, a melatonina estimulou a proliferação e a actividade da fosfatase alcalina dos osteoblastos humanos de forma dose-dependente, em concentrações terapêuticas. A melatonina também promoveu a expressão do gene de colagénio tipo I, osteopontina, sialoproteína óssea, osteocalcina, e estimulou a formação de matriz óssea mineralizada *in vitro*. A administração intraperitoneal de melatonina em ratos provocou no fémur um aumento de volume do osso cortical

neoformado. Estes dados sugerem que a melatonina possa ser utilizada como agente terapêutico de forma a promover a regeneração óssea.

1.5.2. Factores locais

1.5.2.1. Factores de crescimento – São polipéptidos produzidos quer pelas próprias células ósseas, quer por outras células com localização exterior ao osso, que actuam como moduladores das funções celulares, fundamentalmente do crescimento, da diferenciação e da proliferação.

a) Factor de crescimento da insulina I e II (IGF-I e II)

São polipéptidos, semelhantes à insulina produzidos por células hepáticas e osteoblastos e encontrados em concentrações elevadas na matriz osteóide, sobretudo o IGF-II (Baylink *et al.*, 1993). Estes factores aumentam o número dos osteoblastos e intensificam a sua função, estimulando a síntese de colagénio. Circulam ligados às proteínas de ligação IGF (IGFBP) que podem, por sua vez, ter sobre o osso efeitos estimuladores e inibidores. A síntese de IGF é regulada por hormonas e factores de crescimento locais.

b) Factor β de transformação do crescimento (TGF- β)

Representa uma vasta família de proteínas muito abundantes na matriz óssea e que durante a embriogénese participam na formação de osso e cartilagem. Estão presentes de forma latente e são activadas aquando da reabsorção óssea pelos osteoclastos. O TGF- β é um potente estimulador da formação óssea, promovendo a diferenciação dos osteoblastos, a síntese de matriz osteóide e inibindo a síntese das proteases que a degradam, principalmente a metaloproteinase da matriz. Por outro lado, o TGF- β inibe também a reabsorção óssea por redução da síntese e diferenciação dos osteoclastos e da sua actividade, podendo mesmo promover a sua apoptose (Baylink *et al.*, 1993).

c) Proteínas ósseas morfogenéticas (BMP)

Trata-se de um grupo de 15 glicoproteínas de baixo peso molecular (11-55 kd) incluídas na família de TGF- β . Desde a sua descoberta por Marshall Urist em 1965 (Urist, 1965) os investigadores provaram que as BMP induzem as células

estaminais e mesenquimatosas a diferenciarem-se em células osteogénicas produtoras de osso. São considerados os factores de crescimento mais potentes na diferenciação osteoblástica (Yamaguchi *et al.*, 2000). Canalis *et al.*, (1989) considera mesmo que para além de estimularem a osteogénese, inibem a osteoclastogénese.

As BMPs são reguladores pleiotróficos que regulam uma série de respostas celulares sequenciais como a quimiotaxia celular, a mitose e proliferação de células progenitoras, a diferenciação dos condroblastos, a calcificação da cartilagem, a invasão vascular, a formação de osso, a remodelação e diferenciação da medula óssea. As BMPs estimulam ainda a formação da matriz extracelular e têm um efeito no desenvolvimento de diferentes tecidos e órgãos principalmente os que são formados através de interacções epitélio-mesenquimatosas (Hogan 1996ab; Reddi 2000). Esta família de factores tem um impacto considerável em numerosas actividades celulares incluindo crescimento, diferenciação e formação da matriz extracelular (Miyazawa *et al.*, 2002; Miyazono *et al.*, 2005).

As BMP induzem a neoformação óssea em locais ectópicos e em defeitos ósseos críticos, em diferentes modelos animais (Granjeiro *et al.*, 2005).

d) Factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF)

Trata-se de um factor de crescimento que por um lado estimula a síntese proteica dos osteoblastos e que por outro lado, favorece a reabsorção óssea.

Outros efeitos indirectamente envolvidos na remodelação óssea e que dizem respeito à cicatrização em geral, incluem a proliferação dos fibroblastos e das células do músculo liso; a neo-vascularização e a síntese de colagénio.

e) Factor de crescimento dos fibroblastos (FGF)

Este factor tem um efeito anabólico sobre o osso, já que é mitogénico para os osteoblastos, células vasculares endoteliais e fibroblastos.

f) Factor de crescimento da epiderme (EGF) – Este factor é um potente factor de mitose para células de origem mesodérmica ou ectodérmica.

g) Factor de crescimento endotelial vascular (VEGF)

É uma glicoproteína 34-46kD homodimérica que actua através do seu receptor de elevada afinidade, VEGF R2. Trata-se de uma molécula crucial de sinalização, envolvida no desenvolvimento precoce dos vasos sanguíneos, sendo segregada por condrócitos hipertróficos, induzindo angiogénese a partir do *pericondrium*, levando ao recrutamento de osteoblastos, osteoclastos e células hematopoiéticas. Estas sequências conduzem ao desenvolvimento de centros de ossificação primária. A matriz hipertrófica destes centros degrada-se e os osteoblastos recrutados substituem a cartilagem degradada por osso trabecular, formando-se a cavidade medular (Collin – Osdoby, 1994, citado por Kanczler e Oreffo, 2008). Simultaneamente os osteoblastos do *pericordium* formam um colar de osso compacto em redor da porção média (diáfise) da cartilagem, tendo como resultado que o centro de ossificação primária se transforme num tubo de osso. Em ambas as extremidades (epífises) da cartilagem formam-se centros de ossificação secundária, criando uma placa cartilágnea (placa de crescimento), entre a epífise e a diáfise (Kanczler e Oreffo, 2008).

Este factor induz a angiogénese e proliferação vascular endotelial, produz vasodilatação e um aumento da permeabilidade vascular. É produzido em condições de hipoxia e é actualmente considerado um dos factores chave nas fases iniciais de reparação de fracturas, regeneração óssea e no crescimento tumoral (Sen e Miclau, 2007).

Os VEGFs e os seus respectivos receptores são reguladores importantes e cruciais numa cascata de eventos moleculares e celulares que, em última instância, conduzem ao desenvolvimento do sistema vascular por vasculogénese, angiogénese ou formação de um sistema vascular linfático (Yancopoulos, 2000).

Durante a ossificação endocondral, este factor modula a angiogénese, a apoptose dos condrócitos, a remodelação da cartilagem e a ossificação endocondral da placa de crescimento (Gerber *et al.*, 1999). A inibição da angiogénese, pelo contrário, previne a regeneração óssea (Hausman *et al.*, 2001) ao passo que a inibição do VEGF, diminui a angiogénese, a mineralização do calo ósseo e a regeneração óssea (Street *et al.*, 2002, citado por Kanczler e Oreffo,

2008). Neste estudo defeitos ósseos ficou demonstrada a capacidade de reparação e neoformação, ainda que temporária, de uma combinação de VEGF libertado a partir de estruturas de suporte porosas biocompatíveis, semeadas com células humanas estaminais de medula óssea (HBMSC).

Este factor vem adquirindo uma importância crescente uma vez que, de início, todos os implantes ósseos dependem da difusão de nutrientes e da remoção de produtos do metabolismo a partir dos tecidos circundantes, até que o próprio implante se torne vascularizado. Este facto pode ser crucial uma vez que, no caso de defeitos ósseos críticos, a difusão de nutrientes é considerada óptima dentro de distâncias de 150 a 200 μm a partir da fonte de irrigação sanguínea (Sutherland *et al.*, 1986, citado por Kanczler e Oreffo, 2008). Num estudo em ratinhos com a utilização de um material de suporte de dupla libertação de VEGF e BMP-2, foi demonstrada a eficácia deste factor no tratamento de defeitos críticos de fémur (Kanczler *et al.* (2008)

h) Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)

Como referido anteriormente, desempenha sobretudo um papel importante na osteoclastogénese,

i) Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF)

É um factor produzido pelos osteoblastos e células do estroma medular. Embora este factor não tenha um efeito directo sobre a actividade dos osteoclastos, é um factor essencial nas fases iniciais da osteoclastogénese por ser necessário para na formação das células gigantes multinucleadas.

j) Factor de necrose tumoral (TNF)

Este factor estimula *in vitro* a reabsorção óssea e está relacionado com a perda de osso associada a artrite e doença periodontal.

1.5.2.2. Proteínas da matriz

As proteínas da matriz actuam como moduladores dos factores de crescimento (Young, 2003). Estas encontram-se em concentrações milhares de vezes superiores aos factores de crescimento, pelo que podem desempenhar um papel fundamental na regulação das diferentes funções celulares (Horowitz, 2003).

Para além dos factos mencionados, estas proteínas participam ainda na diferenciação de várias células contidas na matriz.

Urist (1965) fez uma descoberta chave ao demonstrar que a matriz desmineralizada e liofilizada de coelho induzia a neoformação óssea no músculo.

1.5.2.3. Citocinas

Trata-se de polipéptidos sintetizados por células linfocitárias e monocitárias que desempenham um papel muito importante numa série de funções celulares como as respostas imunológicas, inflamação e hematopoiese. As citocinas actuam por efeito autócrino e ou parácrino.

a) Interleucina I (IL-1)

Estimula directamente a reabsorção óssea, aumentando a proliferação e diferenciação dos pré-osteoclastos, bem como a actividade osteoclástica e inibindo a apoptose dos osteoclastos (Compston, 2001). A acção desta interleucina, através da síntese de prostaglandinas pode ser directa ou indirecta. Há 3 tipos: IL-1 α , IL-1 β e IL-1 e esta última funciona como receptor antagonista que inibe os dois primeiros tipos.

b) Interleucina 6 (IL-6)

Estimula a reabsorção óssea e aparentemente está ligada à patogenia da doença de Paget (Roodman *et al.*, 1992). Desempenha um papel importante nas fases iniciais da osteoclastogénese e é produzida em resposta à PTH, IL-1 e 1,25 (OH) $_2$ D $_3$.

c) Interleucina 11 (IL-11)

É produzida na medula óssea e induz a osteoclastogénese.

d) Prostaglandinas (PGs)

Estimulam a reabsorção óssea *in vitro*, sobretudo a PGE $_2$ (Kawaguchi *et al.*, 1995). Estudos *in vivo* de Offenbacher *et al.*, (1993) demonstraram a sua participação na destruição óssea que ocorre na doença periodontal.

Como ficou demonstrado e dada a participação do osso numa vasta lista de funções orgânicas vitais, coloca-se a questão de como fazer face a perdas de osso críticas?

1.6. Soluções de continuidade e regeneração óssea

A regeneração de uma fractura é um processo semelhante à incorporação de um enxerto. Trata-se de um processo complexo durante o qual ocorre uma cascata de expressão de genes que conduzem à formação e reabsorção de vários tecidos culminando, eventualmente, com neoformação óssea a fazer uma união em ponte entre os dois topos ósseos fracturados.

Esta cascata de eventos que conduz à regeneração óssea é regulada por múltiplos factores que intervêm em pontos diferentes da linha condroblástica e osteoblástica através de processos como a migração, proliferação, quimiotaxia, diferenciação, inibição e síntese extracelular de proteínas (Dong e Canalis, Fakhry *et al.*, 2005; Gazzerro *et al.*, 2005; Giannoudis *et al.*, 2007b).

Sen e Micau (2007) identificam a maioria destes factores como sendo:

- a) Factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF);
- b) Factor de crescimento semelhante à insulina (IGF);
- c) Factor de crescimento dos fibroblastos (FGF);
- d) Factor β de transformação do crescimento (TGF- β);
- e) Interleucinas 1 e 6;
- f) Proteínas ósseas morfogenéticas-2, 4, 6 e 7 (BMPs).

A regeneração das fracturas envolve assim uma interacção entre mediadores moleculares e celulares (Bostrom, 1998, citado por Giannoudis *et al.*, 2007a).

A regeneração óssea é um processo fisiológico que envolve uma participação coordenada de células hematopoiéticas e células imunitárias da medula óssea em conjunto com percursores vasculares e esqueléticos, nomeadamente células estaminais mesenquimatosas recrutadas sistémica e localmente. Estas células estaminais mesenquimatosas encontram-se na medula óssea, no perióstio, pericítos vasculares e tecido circundante da fractura e diferenciam-se em células condrogénicas ou osteogénicas (Sen e Miclau, 2007).

As possíveis fontes de células de reparação após fractura ou osteotomia são:

- a) A camada interna osteogénica do perióstio;

- b) As células osteoprogenitoras associadas aos vasos sanguíneos do sistema de Havers dentro do osso cortical;
- c) As células endoteliais que cobrem o córtex na sua face interna, o endóstio;
- d) Células mesenquimatosas indiferenciadas da cavidade medular;
- e) Células de tecidos moles indiferenciados, dos músculos e tecido conjuntivo circundantes, baseado na sua capacidade para se diferenciarem à medida das necessidades (Shapiro, 2008).

Segundo Hing (2004) o osso fracturado regenera-se invariavelmente a partir de ossificação endocondral, através de um processo que envolve 5 etapas:

- a) Formação de um hematoma como resultado do trauma infringido ao perióstio e tecidos moles circundantes;
- b) Os osteócitos próximos do local da fractura morrem como consequência da quebra de irrigação sanguínea local, tendo como resultado uma necrose local do tecido ósseo. Simultaneamente é necessário actuar para reparar o osso, estabilizar a área lesionada e remover o tecido necrosado;
- c) Em resposta os macrófagos e os fibroblastos são recrutados, respectivamente, para remover tecido necrosado e para expressar a sua matriz extracelular. Em resposta aos factores de crescimento e citocinas libertadas por estas células inflamatórias, as células mesenquimatosas são recrutadas a partir da medula óssea e perióstio, transformando-se em células osteogénicas;
- d) Ocorre um espessamento aparente do perióstio e uma produção de “colares” de calo de fractura que circundam o local desta. As células osteogénicas que permaneceram próximas do osso intacto e que mantiveram o seu aporte vascular, diferenciam-se em osteoblastos e produzem osteóide que rapidamente calcifica, originando tecido ósseo. As células mesenquimatosas cujo aporte sanguíneo foi lesado, transformam-se em condroblastos que produzirão cartilagem. É desencadeada a angiogénese, há estabilização do local da fractura, e a cartilagem formada é substituída por osso esponjoso imaturo ou entrelaçado, mediante ossificação endocondral. Posteriormente os osteoclastos e células osteogénicas invadem o calo cartilágneo.

Nas fases precoces de ossificação o pico de neo-vascularização ocorre ao 7.º dia após a fractura, o que pode ser observado através de imagens de perfusão laser com “doppler” e quantificação histológica da densidade de capilares (Matsumoto *et al.*, 2008);

e) Todo o material não calcificado é reabsorvido e osso neoformado é depositado nas espículas remanescentes de cartilagem. O osso imaturo ou entrançado é remodelado em osso lamelar e o processo completa-se com o preenchimento por medula óssea nas zonas de osso esponjoso. Nas zonas de osso cortical, o espaço entre as trabéculas é gradualmente preenchido com sucessivas camadas de osso, dando origem a novos sistemas de Havers. Assim, ficam assegurados quer as capacidades de suporte de peso, quer uma nova rede vascular (Bourne, 1972, citado por Hing, 2004).

A taxa e a eficácia da regeneração dependem de factores inerentes ao próprio paciente como a idade e a factores resultantes do próprio traumatismo, como a gravidade, a geometria e localização do mesmo. Dependem ainda de factores que se expressam durante a regeneração, como o estado nutricional e hormonal do paciente no momento da fractura e ao longo do período de reparação da mesma. Aparentemente o número de osteoblastos gerados está relacionado com o número de células progenitoras. D'Ippolito *et al.*, (1999) concluíram que o micro-ambiente da medula óssea sofre alterações com a idade, resultando em interacções de célula-a-célula e célula-matriz óssea que podem ser desfavoráveis para a proliferação das células estaminais mesenquimatosas (MSCs), ou que podem favorecer a maturação destas células para outra linha como a linha adipogénica. Refira-se que o total de tecido adiposo aumenta com a idade. Por outro lado, o declínio na capacidade para reparar fracturas é um dado que está relacionado com a idade (Silver e Einhorn, 1995). A massa muscular diminui ao longo do tempo como resultado da diminuição dos níveis de hormonas circulantes (sobretudo os estrogénios na menopausa), mas também possivelmente pela diminuição dos efeitos anabólicos do esforço mecânico em consequência de uma diminuição da actividade física (Nordin *et al.*, 1990; Villareal *et al.*, 1994).

Independentemente do destino final da consolidação de uma fractura, é expectável que evolua para a consolidação num período de tempo definido. A

“Food and Drug Administration” (FDA) estabeleceu 9 meses como limite de tempo para consolidação natural ou cirúrgica de uma fractura. Ao fim deste período pode já ser considerada como uma não-união (Phieffer e Goulet, 2006).

As possíveis complicações que podem ocorrer de uma não consolidação de fractura incluem não-uniões ósseas, união retardada, fractura do enxerto ou extrusão do enxerto quando este é utilizado e infecção da ferida cirúrgica (Beaman *et al.*, 2006a).

Phieffer e Goulet (2006) classificam as não-uniões em atróficas, oligotróficas e hipertróficas. As atróficas têm pouco ou nenhum calo ósseo e caracterizam-se por uma reabsorção óssea acompanhada de uma normal regeneração, mas limitada por uma resposta biológica inadequada no local da fractura. Nestas, e pelas razões indicadas, para além da necessidade de promover a estabilidade mecânica da fractura, é vital restabelecer o suprimento sanguíneo da região como forma de fornecer oxigénio, citocinas, factores de crescimento e recrutamento de células osteoprogenitoras necessárias à reparação da fractura. Nas não-uniões oligotróficas e hipertróficas, o suprimento sanguíneo é adequado e são observados calos ósseos, sendo que a principal razão para uma não-união é uma instabilidade mecânica (Sen e Miclau, 2007).

No caso das não-uniões atróficas é necessário um estímulo biológico dado que o ambiente celular e molecular da fractura devem ser optimizados (Panagiotis, 2005).

Estima-se que 5 a 10% dos seis milhões de fracturas que ocorrem anualmente nos Estados Unidos da América, terminem em não-união ou união retardada (Brighton *et al.*, 1995, citado por Giannoudis *et al.*, 2007a) e requerem uma intervenção posterior à inicial devido a problemas na sua redução por interposição de tecidos moles, fixação inapropriada, perda de osso, distúrbios metabólicos, irrigação sanguínea deficiente e/ou infecção (Praemer *et al.*, 1992, citado por Logeart-Avramoglou *et al.*, 2005).

E como substituir osso em falta?

1.7. A substituição óssea

Anualmente o osso é utilizado em todo o mundo em mais de 2,2 milhões de transplantes para correcção de defeitos ósseos (ortopedia, neurocirurgia e cirurgia dentária) resultantes de traumatismos, recessão por tumor ou artrodése (Vaccaro, 2003; Giannoudis *et al.*, 2005). Deste número, cerca de 500.000 de cirurgias são realizados nos E.U.A e, aproximadamente, 50% desta cifra é utilizada em cirurgias de fusão espinal (Greenwald *et al.*, 2001).

O osso é o segundo tecido mais frequentemente transplantado só ultrapassado por transfusões de sangue (Giannoudis *et al.*, 2005; Kelly *et al.*, 2000 citado por Franch *et al.*, 2006).

Dadas as alternativas e para fazer face a uma procura crescente, Hing (2004) coloca a problemática da seguinte forma: “Reparação óssea no século XXI é biologia, química ou engenharia?”

As alternativas conhecidas até hoje são:

- a) “Colher” tecido ósseo quer por transplantes autólogos (autoenxerto), homólogos (homoenxerto) e heterólogos (xenoenxerto);
- b) “Criar” tecido ósseo recorrendo a substitutos ósseos que induzem no próprio organismo a produção de novo osso;
- c) “Criar” *ab initium* tecido ósseo por engenharia tecidual.

Relativamente à primeira, esta tem sido a solução utilizada ao longo da história e, teoricamente, é claramente a melhor alternativa, o chamado “gold standard”. A limitação da utilização desta alternativa prende-se entre outros factores, com o facto já anteriormente mencionado, do osso ser um recurso limitado sobretudo se as quantidades necessárias forem para fazer face a um defeito crítico.

A segunda alternativa tem por base a utilização de substitutos ósseos é aquela para a qual, nos últimos anos, mais projectos de investigação têm sido orientados. Trata-se para a maioria dos casos de estratégias osteoindutoras que podem ou não ser também osteogénicas.

A terceira alternativa, em termos clínico-cirúrgicos, ainda está numa fase

maioritariamente *in vitro*, pelo que nos dedicaremos a ela ainda com carácter informativo sobre os seus mais recentes desenvolvimentos. É no entanto nossa convicção de que associada ou não às outras alternativas será claramente o futuro da substituição óssea e de qualquer outro tipo de tecido. Trata-se basicamente de uma estratégia que reúne as três características: osteocondução, osteoindução e osteogénese.

A osteocondução, osteoindução e osteogénese e são as três condições, *sine qua non*, para que ocorra a regeneração óssea juntamente com a ligação final entre o osso do receptor e o material transplantado, o que se designa por osteointegração.

A compreensão destes três conceitos é assim fundamental:

- Osteoindutor – É uma substância ou célula que tem a capacidade de recrutar no ambiente local em que se encontra células capazes de produzir osso e de induzir, nessas mesmas células, a produção de osso. Normalmente as células recrutadas são células mesenquimatosas pluripotenciais que se diferenciam posteriormente em osteoblastos. Este processo é mediado por uma cascata de sinais e activação de um número considerável de receptores extra e intracelulares e é facilitado pela presença de factores de crescimento no próprio substituto ósseo, sobretudo BMPs (Greenwald *et al.* 2001; Bauer e Smith, 2002; Giannoudis e Pountos, 2005; Beaman *et al.*, 2006a,b; Laurencin *et al.*, 2006).

- Osteocondutor – É uma estrutura de suporte macro ou microscópica, que transporta ou atrai células ósseas, os osteoblastos ou células osteoprogenitoras e que assegura uma estrutura de interconexão através da qual podem ocorrer mais migrações celulares e formação de vasos sanguíneos e canais de Havers (Greenwald *et al.*, 2001; Bauer e Smith, 2002; Giannoudis *et al.*, 2005; Laurencin *et al.*, 2006).

- Osteogénico – É uma substância ou célula osteoprogenitora que tem a capacidade de originar células produtoras de osso, osteoblastos ou eventualmente osteócitos (Bauer e Smith, 2002).

Só os materiais que são capazes de osteointegração, osteocondução e osteoindução, devem ser considerados verdadeiros substitutos ósseos

(Constantino e Hiltzik *et al.*, 2002; Parikh, 2002).

Vaibhav *et al.*, (2007) estabelece outra classificação baseada nos conceitos anteriores, para a substituição ou mesmo a regeneração óssea:

Quadro 1.1. – Estratégias para a regeneração óssea de acordo com Vaibhav *et al.*, (2007).

Métodos osteogénicos	Métodos osteoindutivos	Métodos osteocondutivos	Agentes sistémicos
Enxertos ósseos autólogos	Proteínas ósseas morfogenéticas	Cerâmicas à base de cálcio;	Prostaglandinas;
Enxertos homólogos	Plasma rico em plaquetas contendo factores de crescimento como PDGF, IGF-1 e TGF- β .	Substitutos colagénio à base de cálcio;	Proteínas osteogénicas da circulação sistémica.
Enxertos de medula óssea.		Polímeros sintéticos	

Embora a maioria das classificações em todas as áreas possa pecar pela artificialidade, confusão de conceitos ou mesmo dupla classificação, esta classificação de Vaibhav *et al.*, (2007) peca, em nosso entender, pelo facto de não contemplar as soluções combinadas, ou seja, as que resultam da utilização de duas ou mais soluções em simultâneo. Esta estratégia é cada vez mais comum e cremos que será a estratégia do futuro, sendo de resto, a que utilizámos neste projecto. Esta classificação exclui ainda as soluções que passam por alterar as características físicas de determinado material tornando-o só por si, osteoindutor, sem recorrer e nenhum enriquecimento químico (Kuboki *et al.*, 2001).

De qualquer forma as estratégias para originar a neoformação óssea são muitas e variadas, mas destinam-se em última análise a facilitar a regeneração do tecido ósseo por parte dos seus vários tipos de células, constituintes da matriz extracelular e hidroxiapatite. A transposição dos resultados das pesquisas do laboratório para o paciente envolve um significativo esforço multidisciplinar com muito trabalho ainda para desenvolver (Dickson *et al.*, 2007).

1.7.1. Funções desejáveis dos substitutos ósseos:

A maioria dos tecidos envolve uma matriz com um ou vários tipos de células. A matriz *in vivo* é uma estrutura de suporte tridimensional para células, fornecendo-lhes um ambiente tecidual e uma arquitetura próprios (Kneser, 2002). A matriz pode também servir de reservatório de água, nutrientes, citocinas e factores de crescimento. Neste sentido e de forma a recuperar a função ou a regenerar um tecido, necessitamos de um material de suporte que permita a proliferação celular e a deposição da matriz óssea extracelular. Na área dos biomateriais utiliza-se este conceito de materiais de suporte ("scaffold") para designar uma estrutura, de duração temporária, que permita suportar células *in situ*, até que estas sejam capazes de produzir uma estrutura definitiva, geralmente com características semelhantes ao tecido original. Em regeneração óssea, esta estrutura irá permitir o crescimento de osso para o seu interior até que a neoformação óssea seja recuperada ou regenerada. Para além disso e de forma muito vital, estas estruturas servem também para a implantação de novos vasos sanguíneos que permitirão a sobrevivência do tecido neoformado.

As funções principais dos materiais de substituição são biológicas e estruturais.

As funções biológicas são suportar a adesão, o crescimento e proliferação celular. As funções estruturais são preencher defeitos de tecidos e propiciar um material de suporte ou matriz biocompatível que permita o crescimento para o seu interior de células, vasos sanguíneos, neoformação de tecidos e manutenção da matriz extracelular (Gogolewski *et al.*, 2008).

A MEC é em si própria uma estrutura arquitectónica tridimensional cujas propriedades mecânicas e potencial em termos de sinalização celular a tornam, sem dúvida, uma candidata muito interessante para a pesquisa de estruturas temporárias tridimensionais como propriedades biológicas favoráveis (Ingber e Levin, 2007).

Séculos após Leonardo da Vinci ter postulado que a compreensão da natureza é um pré-requisito para conceber soluções de engenharia, confirmamos hoje que a chave para a construção de tecidos, ou seja a engenharia tecidual,

passa certamente pela análise e estudo das MEC naturais, antes de se desenhar ou conceber qualquer estrutura temporária com características similares (Fernandes *et al.*, 2009).

Uma abordagem ideal poderia consistir no desenho de uma estrutura osteocondutora com osteoindutividade intrínseca, isto é, tendo em si própria a capacidade de recrutar e estimular os factores de crescimento ou as células estaminais do próprio paciente.

1.7.2. Características dos substitutos ósseos

1.7.2.1. Características físicas

Geralmente a arquitectura da estrutura temporária tem impacto na dureza, permeabilidade e condutividade. A maioria dos substitutos ósseos que se implantam peca pela diminuta resistência à tensão nas situações em que esta é requerida, pelo que actualmente a comunidade científica está activamente empenhada no aumento da resistência mecânica deste tipo de substitutos, sem que a sua bioactividade e a sua capacidade de bio-absorção sejam comprometidas.

a) Topografia da superfície: Segundo McFarland *et al.*, (1999) diferentes composições e diferentes superfícies têm efeitos distintos sobre o comportamento dos osteoblastos.

As células de qualquer tecido usam a topografia das superfícies para sua própria orientação, alinhamento e migração, reconhecendo determinadas particularidades destas e reagindo a elas, possivelmente através de uma alteração de forma dos seus filamentos de actina nos *filipodia* do citoesqueleto, tendo como resultado uma orientação de contacto. De cada vez que estas saliências encontram um local “adequado”, formam-se adesões locais às fibras de actina maduras. O processo de adesão a estas saliências pode, por exemplo, ser influenciado por descontinuidades nas superfícies dos materiais utilizados (Anselme, 2000, citado por Itthichaisri *et al.*, 2007). Desta forma pode relacionar-se a importância que a topografia de determinado estrutura de suporte tem sobre a resposta celular do tecido que a integra (Itthichaisri *et al.*, 2007).

Num modelo *in vitro* que estudou as interacções entre as células e os diferentes materiais, foram testadas diversas microtopografias com o objectivo de conhecer não só de que forma esta característica modula a resposta das células à textura do biomaterial utilizado, mas também como modular a sua morfologia através do sistema receptor das integrinas (Boyan *et al.*, 2003). Em superfícies microrrugosas os osteoblastos assumem formas cubóides e fixam-se à superfície através das *filipodia* dendríticas (Brunette, 1986). Em superfícies suaves, estas células aplanam-se e distendem-se, ficando com aparência de fibroblastos. Nestas superfícies suaves (plástico para cultura tecidular, vidro para cultura tecidular e titânio), as células aderem e multiplicam-se, mas exibem uma expressão baixa de marcadores de diferenciação. Em superfícies rugosas, com rugosidades médias de 4 a 7 μm , a multiplicação das células é reduzida, mas a diferenciação é estimulada, com aumento dos marcadores de diferenciação osteoblástica, como a produção de osteocalcina, o aumento da actividade específica da ALP e o aumento da produção de PGE_1 e PGE_2 , mas com depressão da actividade osteoclástica. A textura da superfície altera o estado de maturação da célula libertando esta os factores de sinalização típicos de determinado grau de maturação que assim têm as correspondentes respostas celulares. Estes estudos demonstraram que as células respondem à microtopografia de forma dependente do seu grau de maturação e a célula responde de forma diversa a factores de regulação exteriores também de acordo com o estágio de maturação. A maioria destes mecanismos processa-se por intermédio das integrinas, daí que o potencial de sinergia seja aumentado (Boyan *et al.*, 2003).

b) Forma das estruturas: Relativamente à forma das estruturas utilizadas, nos estudos de Kuboki *et al.*, (2001) foram implantadas subcutaneamente em ratos, várias estruturas de suporte de hidroxiapatite (iguais do ponto de vista químico, mas com formas físicas finais diferentes), semeadas com BMPs. Os mesmos materiais semeados com os mesmos BMPs induziram padrões separados de tecido (condrogénese, osteogénese e uma progressão da condrogénese para a osteogénese), dependendo da forma física da própria estrutura. Estes dados sugerem que a forma física da estrutura de suporte, bem

como a sua arquitectura intrínseca têm um papel fundamental nos resultados que produzem, sobretudo se se trabalha num contexto de manipulação de factores de crescimento.

c) Porosidade e diâmetro dos poros: A dimensão local do poro é definida pelo raio da esfera maior que inclui o ponto de interesse.

De acordo com Jones *et al.*, (2007) a dimensão dos poros pode ser medida directamente a partir de uma imagem tridimensional utilizando um algoritmo máximo de esferas cobertas (Serra, 1982, citado por Jones *et al.*, 2007).

Segundo Byrne *et al.*, (2007) a porosidade deve permitir a migração e a proliferação das células precursoras de osso, proporcionar um micro-ambiente apropriado para a proliferação e diferenciação celular e permitir uma transferência massiva de nutrientes e oxigénio para o interior da estrutura.

Salgado *et al.*, (2004) diz que para além da porosidade, a existência da microporosidade adequada permite o crescimento de capilares sanguíneos para o interior de uma estrutura.

De acordo com Byrne *et al.*, (2007) à medida que uma estrutura é reabsorvida, a porosidade aumenta, tendo como consequência a redução da resistência e dureza da estrutura. Uma vez a carga mecânica transferida para o osso regenerado, este deverá já possuir capacidade para o suportar. De forma a prevenir esta situação de perda precoce de integridade mecânica, as estruturas poderão ter inicialmente porosidades reduzidas ou as propriedades mecânicas iniciais deverão ser suficientes de forma a suportar peso.

Pode acontecer que materiais de suporte com diferentes dimensões de poros sejam necessários, dependendo da localização do defeito no sistema músculo-esquelético, ou seja, se trata de defeitos ósseos longos ou da região maxilo-facial (Gorna e Gogolewski, 2006).

A maioria dos substitutos ósseos tem porosidades na ordem dos 25 a 100 μm que são adequadas à migração e crescimento de grande parte das células (fibroblastos têm diâmetros de 10 a 15 μm). Os poros de 20 a 60 μm e 75 a 150 μm , são necessários para enxertos vasculares e crescimento ósseo, respectivamente (Bhattarai *et al.*, 2004).

Klawitter e Hulbert (1971) e Simske *et al.*, (1997), ambos citados por Deville *et al.*, (2006) estabeleceram 100 μm como diâmetro mínimo dos poros em estruturas de cerâmica para crescimento ósseo. Itälä (2001) afirma que os poros com diâmetro de cerca 50 μm já permitem algum crescimento ósseo.

Burg *et al.*, (2000) admite que poros de diâmetros médios de 200 a 400 μm promovam crescimento ósseo pois têm diâmetros semelhantes quando comparados com dimensão média dos osteónios humanos, ou seja cerca de 223 μm .

Em estudos de Shaug *et al.*, (1997) foi demonstrado que, para três tipos de materiais de suporte com diferentes dimensões de poros, 150 a 300 μm , 300 a 500 μm e 500 a 710 μm , a profundidade de crescimento para o interior das células estromais era mais pronunciada para as estruturas com os poros de maior dimensão.

Segundo Logeart-Avramoglou *et al.*, (2005) as porosidades na ordem de 200 a 900 μm têm desempenhos satisfatórios em estruturas temporárias tridimensionais, dado que permitem a migração de células endoteliais para o interior da matriz, desenvolvendo aí o leito vascular necessário para a nutrição do tecido neoformado.

Em estudos *in vitro* e *in vivo* de Zhang *et al.*, (2006) citado por Hutmacher *et al.*, (2007) e em estruturas de porosidades superiores a 300 μm , os resultados são satisfatórios pois permitem vascularização suficiente de enxertos para engenharia tecidual.

A utilização de estruturas de elevada porosidade e, conseqüentemente com propriedades de suporte mecânico fracas, permitem enxertos de elevada actividade biológica mas com propriedades estruturais reduzidas que podem contudo ser colmatadas recorrendo à sua utilização em zonas de não suporte de peso ou com auxílio de fixação interna e ou externa (Hutmacher, 2007).

De acordo com Hutmacher *et al.*, (2007) a osteogénese é estimulada *in vitro* pela porosidade, suprimindo a proliferação celular mas forçando a agregação celular. *In vivo* as porosidades elevadas com poros de grandes dimensões resultam na estimulação do crescimento ósseo. Por outro lado poros de pequenas

dimensões favorecem ambientes de hipoxia, conduzindo à ossificação osteocondral. Estruturas temporárias com arquitecturas macroporosas tornam-se, pelo contrário, rapidamente vascularizadas, conduzindo a osteogénese directa.

Segundo Sachlos *et al.*, (2003) a superfície da estrutura temporária não deverá permitir elevadas taxas de transferência de oxigénio e nutrientes, dado que estas condições promovem a mineralização precoce desta superfície o que limita a transferência destes produtos para o interior da estrutura.

Dada a vastidão de resultados favoráveis com diferentes porosidades, o paradigma actual para a dimensão mínima de poros, utilizando estruturas tridimensionais porosas como materiais de suporte para regeneração óssea, poderá ter que ser re-examinado.

d) Propriedades mecânicas: Teoricamente quanto mais elevado for o peso molecular do implante, a orientação da cadeia, a cristalinidade e a pureza do material, melhores propriedades mecânicas serão obtidas. Devemos ter em atenção contudo, que alterar estas propriedades físicas, traduzir-se-á num aumento de tempo necessário à completa reabsorção do implante (Gogolewski, 2000).

1.7.2.2. Características químicas

a) Biodegradabilidade

Quanto ao conceito de biodegradável este aplica-se normalmente a materiais poliméricos sólidos que se quebram por degradação macromolecular com dispersão *in vivo*, sem evidência de eliminação pelo organismo. Apresentam lenta degradação de volume e posterior reabsorção *in vivo*, ou seja, os polímeros são eliminados através de mecanismos naturais, por filtração simples ou após a sua metabolização. Os sistemas poliméricos podem ser atacados por elementos biológicos e, neste caso, a integridade do sistema, incluindo por vezes as macromoléculas, é afectada, dando origem a fragmentos, os "by-products". Estes fragmentos são afastados do local de acção, mas não necessariamente do organismo (Hutmacher, 2000).

Existe ainda o conceito de bio-absorvível que é aplicado geralmente a

materiais poliméricos sólidos que se podem dissolver em fluidos corporais sem que haja uma clivagem na cadeia polimérica, nem diminuição da massa molecular (Hutmacher, 2000). Este conceito de bio-absorção reflecte uma eliminação total do material estranho, biomaterial e dos seus “by-products”, sem efeitos residuais colaterais (Gogolewski, 2000; Hutmacher, 2000). Neste conceito os “by-products” são regra geral incorporados em ciclos de metabolismo naturais.

A taxa de degradação *in vivo* de materiais de implante poliméricos e bio-absorvíveis é fortemente afectada pela sua composição química. Alterando as proporções entre os monómeros que constituem a cadeia polimérica principal é possível ajustar, optimizando, o tempo de reabsorção do implante e nalguma extensão, as suas propriedades mecânicas (Gogolewski, 2000).

Segundo Martina e Hutmacher (2007) alterando a cadeia principal do polímero podem-se alterar as características da biodegradação, as propriedades mecânicas e sua biocompatibilidade. Estes autores consideram que em terapia celular desafio muito estimulante é a possível capacidade de, ao adicionar moléculas bioactivas a determinada estrutura temporária, este facto poder alterar a sua cito-compatibilidade uma vez que a maioria dos polímeros biodegradáveis não possuem, de origem, esta característica. Esta estratégia poderá passar pela utilização de polímeros que contenham grupos laterais bioactivos do ponto de vista da cito-compatibilidade.

Locais fortemente vascularizados, ambientes inóspitos, peso sobre a estrutura polimérica e a presença de aditivos de natureza diversa, aceleram a taxa de degradação (Gogolewski, 1992).

No caso de um substituto ósseo biodegradável, pretende-se que a taxa de degradação do substituto seja apropriada à taxa de crescimento ósseo local, para que no momento da total regeneração haja também total biodegradação (Langer e Vacanti, 1993).

De forma a otimizar a regeneração óssea, a taxa de degradação do substituto deve igualar a taxa de formação óssea já que, segundo Wenisch *et al.*, (2003) citado por Bodde *et al.*, (2007) uma degradação lenta pode resultar na persistência de material estranho ao organismo com reacção de corpo estranho.

Hutmacher (2000) refere que a matriz da estrutura temporária deve iniciar a

sua perda de propriedades mecânicas e a sua metabolização, sem produção de reacções de corpo estranho, ao fim de 12 a 18 meses após a implantação

Estruturas construídas a partir de materiais com taxas de dissolução elevadas têm vantagens óbvias em determinadas situações, mas podem provocar reacções adversas às próprias estruturas temporárias através de uma via de inflamação induzida pelas micropartículas que se libertam da própria estrutura (Lu *et al.*, 2004) por instabilidade à superfície da estrutura (Suzuki *et al.*, 1997) e ainda, por reabsorção incompleta (Anker *et al.*, 2005).

Uma outra desvantagem óbvia de uma biodegradação “aleatória” é o facto de se poder originar uma deterioração dramática da resistência do material. A diminuição de peso molecular da estrutura nas fases mais avançadas do seu processo de degradação é retardada devido à redução da área de superfície, resultante da hidrólise. A arquitectura da matriz deixa assim de suportar peso mecânico e inicia a sua perda de integridade (Hutmacher, 2007).

Uma das possíveis formas de intervir na biodegradabilidade das estruturas de suporte é manipulá-la no sentido de impor uma degradação controlada utilizando por exemplo segmentos peptídicos que possam sofrer clivagens enzimáticas e incorporá-los na referida estrutura (West e Hubbell, 1999). As células migram através da MEC adaptando a sua morfologia de modo a seleccionar o caminho de menor resistência ou criando um caminho utilizando proteases membranárias de activação local como as metaloproteínases e a plasmina (Gobbin e West, 2002, citados por Place *et al.*, 2009). Este processo pode ser recriado nos biomateriais incorporando proteínas da matriz como o colagénio ou a fibrina que naturalmente possuem sequências cliváveis por proteínas. Os sistemas sintéticos podem ser concebidos sob este prisma, incorporando grupos que desempenham esta funcionalidade (Place *et al.*, 2009).

Os materiais não absorvíveis como os metálicos, face aos anteriormente apresentados têm inúmeras desvantagens a este nível como o possível aumento do número de infecções por colonização dos implantes (Gravallese *et al.*, 1995 citado por Iera *et al.*, 2005; An *et al.*, 1996, citado por Iera *et al.*, 2005) e ainda uma possível atrofia óssea pelo fenómeno de “stress-shielding”, sobretudo em

estruturas ósseas longas (Tonino *et al.*, 1976; Paavolainen *et al.*, 1978; Wang, 2003). Existem relatos em pacientes jovens de patologias de crescimento consequentes à utilização de materiais deste tipo (Resnick *et al.*, 1990; Wong *et al.*, 1991; Wong *et al.*, 1993; Antikainen *et al.*, 1994; Yaremchuk *et al.*, 1994), ou ainda migração do aparelho por aposição de osso sobre o mesmo (Fearon *et al.*, 1995; Goldberg, 1995; Hönig *et al.*, 1995; Papay *et al.*, 1995; Yaremchuk *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1996; Stelnicki e Hoffman, 1998). Por todas estas razões, é frequente estas estruturas terem que ser retiradas recorrendo a nova cirurgia, com os riscos que lhe são inerentes. Para além disso, trata-se muitas vezes de estruturas rádio-opacas o que pode perturbar uma avaliação radiológica adequada (Weese *et al.*, 1984; Ebraheim *et al.*, 1992; Habal, 1991, citado por Iera *et al.*, 2005; Habal, 1998, citado por Iera *et al.*, 2005; Sullivan *et al.*, 1994).

Conclui-se assim que, embora com necessidade de estudos posteriores, a utilização de uma estrutura biodegradável é na grande maioria das situações que requerem uma substituição óssea, a opção preferível.

b) Grupos químicos que promovem adesão celular

As características de um material de suporte que possa ter originalmente uma fraca adesão à matriz podem ser alteradas recorrendo à fixação de péptidos de ligação celular (Shin *et al.*, 2003). Estes péptidos mimetizarão e induzirão a adesão às proteínas da matriz extracelular à superfície do biomaterial, através de métodos de modificação química ou física.

Muitas linhas de investigação pretendem conhecer as interações entre as células formadoras de osso com os vários domínios de ligação às integrinas, como o oligopéptido de arginina-glicerina-ácido aspártico, RGD (Healy *et al.*, 1999). Estes RGD modulam, como foi anteriormente mencionado, a adesão de vários tipos de células, incluindo células osteoprogenitoras, osteoblastos e mesmo células endoteliais (Logeart-Avramoglou *et al.*, 2005). Esta sequência medeia também a adesão a várias proteínas da matriz como fibronectina, vitronectina, osteopontina e sialoproteína óssea (Reyes *et al.*, 2007).

O fragmento RGD só por si regula a mineralização. (Schaffner e Dard, 2003).

Esta sequência ao ser adicionada às cadeias laterais de determinado biomaterial modificam a especificidade deste no sentido desejado. Estudos apontam mesmo para que esta possa ser uma possível, como estratégia de combate à osteoporose, utilizar diferentes subunidades de integrinas ou mesmos RGD-desintegrinas que inibam a adesão osteoclástica (Schaffner e Dard, 2003).

Outra das técnicas de adesão aos biomateriais é a utilização de determinados compostos “adesivos bioactivos” fazendo alterações de revestimento nas camadas superficiais, “coating”, dos mesmos. Desta forma é possível estimular a sua ligação a integrinas das proteínas da matriz extracelular ou mesmo provocar alterações na macro e/ou micro-porosidade (Reyes *et al.*, 2007). Pensa-se que a ligação a estes mesmos “adesivos”, possa activar fenómenos de sinalização que promovam a diferenciação osteoblástica e a mineralização da matriz (Garcia e Reyes 2005, citado por Reyes *et al.*, 2007). Determinado biomaterial ao ser submetido a uma cobertura com determinado péptido cria uma interface entre o biomaterial e as células às quais se pretende a adesão, obtendo assim um material bioactivo (Kantlehner *et al.* 1999, citado por Schaffner e Dard, 2003; Verrier *et al.*, 2002).

Gogolewski e Gorna, (2007) afirmam que a própria capacidade de atracção dos iões de cálcio de determinada estrutura pode também ser modificada e controlada através da selecção de monómeros adequados.

A bioactividade de um material artificial pode ser avaliada pela observação à superfície do mesmo, da formação de uma camada de apatite uma vez que um requisito fundamental de qualquer material artificial para se unir ao osso é a formação, à superfície do mesmo, desta camada semelhante à apatite óssea que seja biologicamente activa. Assim sendo e de acordo com este mesmo autor, a formação desta camada de apatite pode mesmo ser utilizada também como base para a produção de materiais bioactivos. A bioactividade pode ser induzida em materiais não bioactivos, quer pela formação de grupos funcionais que são capazes de induzir a formação de apatite, quer pela formação de fases de cerâmica finas que têm o potencial para formar esses mesmos grupos quando em contacto com determinados ambientes biológicos. Um exemplo deste tipo de

manipulação é a utilização de tratamento com hidróxido de sódio ou calor, de forma a induzir bioactividade (Kokubo *et al*, 2003).

No presente trabalho foram utilizadas modificações com um sistema creatina/putrescina e outro com lecitina bio-lizada. Estes componentes apresentam comprovada capacidade de adesão celular e biocompatibilidade (Todd *et al*, 2006; Wang *et al*, 2008) e superior hidrofiliabilidade (Wang *et al*, 2008).

1.7.2.3.Outras características

Como foi anteriormente mencionado, um pré-requisito fundamental para o êxito das sucessivas etapas do processo de regeneração óssea, independentemente do tipo de substituição óssea utilizada, é a existência de uma circulação sanguínea funcionante no local receptor. Nos materiais de suporte sintéticos não existe uma rede vascular pré-existente. A sobrevivência da estrutura de substituição óssea, quando implantada, depende da difusão massiva de oxigénio e nutrientes a partir da circulação envolvente, pois até à completa formação da rede vascular a estrutura não é, deste ponto de vista, auto-suficiente. Este aspecto é particularmente importante em defeitos críticos dado que a difusão de nutrientes é apenas efectiva dentro de uma área de 150 a 200 μm a partir da fonte de alimentação sanguínea (Logeart-Avramoglou *et al.*, 2005).

Rahn (1999) diz que só por si, a própria abordagem cirúrgica necessária para a colocação de qualquer substituto ósseo, introduz alguma interferência com a circulação local. Este mesmo autor refere ainda que uma das formas de avaliação da aceitação de determinado material num meio biológico, como por exemplo o osso, se pode mesmo aferir pela confirmação histológica da presença ou ausência de vasos sanguíneos nas proximidades do substituto ósseo utilizado. A visualização dos vasos com a injeção *per mortem* de micropartículas de substância como “indian ink”, que cora as estruturas vasculares de preto, demonstra a acessibilidade da circulação na zona preenchida, permitindo visualizar e compreender de forma tridimensional a árvore vascular. Rahn (1999) refere contudo que o facto de existir uma secção histológica sem a presença dessa substância, não significa necessariamente uma deficiente circulação, na

medida em que, nem todos os vasos são preenchidos de forma igual durante a injeção desta substância.

Um número significativo de abordagens têm sido desenvolvidas para colmatar o problema da escassez de vascularização dos substitutos ósseos, nomeadamente:

- Revestir uma matriz extracelular angiogénica do implante com uma linha celular cancerígena (Kidd *et al.*, 2002);
- Libertação genes por vectores que expressem factores de crescimento angiogénicos (Geiger *et al.*, 2005);
- Encapsulamento de factores angiogénicos bioactivos em materiais de suporte biodegradáveis semeados com células endoteliais ou osteoprogenitoras para estimular, *in situ*, uma resposta endógena angiogénica (Murphy *et al.*, 2000).

Outra alternativa pode ser a colocação de células estaminais mesenquimatosas sobre o perióstio e não na profundidade da estrutura, permitindo desta forma que o acesso precoce a condições normóxicas esteja assegurado (Bensaïd *et al.*, 2005).

De forma a potenciar a angiogénese e a induzir uma rede endotelial de vasos, Levenberg *et al.*, (2005) desenvolveram uma estrutura tridimensional em sistema de multicultura consistindo em mioblastos, fibroblastos embrionários e em células endoteliais co-semeadas em materiais altamente porosos e biodegradáveis. Este tipo de célula “múltipla” poderá ser aplicada para estimular o poder osteogénico de um defeito ósseo.

Todas as estratégias terapêuticas que estimulem a angiogénese irão em última análise afectar os mecanismos de reparação óssea particularmente nos enxertos ósseos pois a ausência de um suprimento sanguíneo adequado é frequentemente causa de falhas na integração de implantes. Considerando que a infiltração de vasos sanguíneos numa estrutura temporária macroporosa ocorre a uma taxa menor que 1 mm por dia e que, tipicamente, são necessárias uma a duas semanas para que a estrutura vascular complete a penetração em estruturas de espessura de cerca 3 mm, a necessidade de desenvolvimento de novas estratégias que melhorem a vascularização é evidente (Nomi *et al.*, 2002).

1.7.3. Substitutos ósseos

A importância crescente do desenvolvimento desta área da ciência é notório dado o facto de se realizarem cerca de 4 milhões de procedimentos por ano que envolvem enxertos e colocação de substitutos ósseos. Do ponto de vista financeiro estes números envolvem obviamente um interesse económico notável no desenvolvimento de biomateriais com aplicação clínica (Jorgensen *et al.*, 2004).

1.7.3.1. Substitutos naturais

Um biomaterial natural é uma substância para uso directo utilizada como complemento ou para substituição das funções de tecidos vivos. Um biomaterial colocado numa cavidade corporal natural ou criada cirurgicamente, por um período de 30 dias ou mais, denomina-se implante. Todavia e para proteger a saúde pública, a FDA (“Food and Drug Administration”), nos E.U.A. determinou que biomateriais inseridos por períodos mais curtos como por exemplo os agentes hemostáticos ou suturas reabsorvíveis, também sejam considerados implantes (Bauer e Smith, 2002).

Os materiais de origem natural têm a vantagem de, na maioria dos casos, dada a semelhança com o ambiente biológico em que são inseridos, desencadearem menor reacção inflamatória pois têm menor potencial imunogénico (Salgado *et al.*, 2004) e menor toxicidade. Por outro lado, são mais rapidamente degradados por acção enzimática, conduzindo eventualmente a uma metabolização por mecanismos fisiológicos. Esta característica de rápida degradabilidade, pode fazer com que, no cômputo final, possam torna-se piores candidatos à substituição de osso dada a imprevisibilidade que oferecem (Hutmacher, 2007).

1.7.3.1.1. Enxertos ósseos

Entende-se por enxerto ósseo a substituição de um tecido ósseo danificado ou em falta, por outro tecido vivo ósseo com características semelhantes ao original.

Segundo Muschler e Lane (1992) citado por Beaman *et al.*, (2006a) as aplicações clínicas mais comuns para um enxerto ósseo são as fusões ósseas (espinhais e das extremidades), a estabilização de fracturas (agudas, uniões retardadas e não-uniões) e os defeitos ósseos (cavitários, segmentares, osteocondrais e de artroplastia).

Segundo Parikh (2002), os enxertos são ainda necessários para proporcionar suporte físico e preencher vazios ósseos.

A escolha do tipo de enxerto a realizar depende da severidade da perda de tecido ósseo e das qualidades mecânicas que se desejam obter no segmento ósseo com perda. O carácter da lesão ou fractura dita a expectativa que o enxerto deverá cumprir (Ilán e Ladd, 2003).

O processo de incorporação do enxerto seja de que tipo for, é sequencial e em tudo semelhante ao da consolidação natural de uma fractura. A incorporação refere-se concretamente às interacções biológicas entre o material enxertado e o local receptor, das quais resulta a formação de osso que irá adquirir as propriedades mecânicas adequadas e desejadas. O *ratio* e a extensão da incorporação estão dependentes de vários factores, nomeadamente: tipo de material enxertado, tipo e estado dos tecidos na margem do enxerto e estado fisiológico do paciente receptor (Bauer e Muschler, 2000).

Uma vez existente a neoformação óssea no local receptor, o enxerto poderá ser substituído total ou parcialmente, num processo denominado de “creeping replacement” (Lind e Bunger 2002, citados por Beaman *et al.*, 2006a). Este fenómeno traduz-se pela formação de uma zona de tecido de granulação próximo do local de implantação do enxerto que permite criar uma ponte entre o tecido enxertado e o tecido receptor vizinho, vivo e vascularizado. Esta ponte permite a invasão por células BMSCs, que se diferenciam em células osteogénicas, com a neoformação óssea e a revitalização, parcial ou total, das trabéculas necrosadas

(Phemister, 2008).

Segundo Bauer e Muschler (2000) e Mroz *et al.* (2003) os eventos biológicos que ocorrem durante a incorporação de um enxerto incluem:

- Formação de um hematoma com libertação de citocinas e factores de crescimento;

- Inflamação, migração e proliferação de células mesenquimatosas;

- Desenvolvimento de tecido fibrovascular no interior e a rodear o enxerto.

Esta é a fase de se concretizar uma verdadeira osteoindução;

- Invasão vascular do enxerto, frequentemente através dos canais de Havers e Volkmann existentes;

- Reabsorção osteoclástica das superfícies do enxerto; Ossificação intramembranosa ou endocondral das superfícies do enxerto.

O hematoma que se forma é comprovadamente uma fonte de moléculas sinalizadoras (interleucinas IL-1, IL-6, factor de necrose tumoral - TNF- α , factor de crescimento dos fibroblastos - FGF, factor de crescimento semelhante à insulina - IGF, factor de crescimento derivado das plaquetas - PDGF, factor de crescimento endotelial vascular - VEGF e alguns membros da superfamília de factores β de transformação do crescimento - TGF- β) que induzem uma cascata de eventos celulares que, por sua vez, iniciam a regeneração. Estes factores são segregados pelas células endoteliais, plaquetas, macrófagos e monócitos, mas também por células estaminais mesenquimatosas, condrócitos, osteócitos e pelos próprios osteoblastos (Tsiridis *et al.*, 2007).

A origem intramembranosa ou endocondral dos enxertos condiciona também a sua integração, na medida em que os enxertos ósseos não vascularizados intramembranosos, sofrem menor reabsorção osteoclástica do que os endocondrais. Smith e Abramson (1974) citados por Coelho (2003) referem que o enxerto de osso intramembranoso mantém praticamente o seu volume original, o problema prende-se com as fontes de osso intramembranoso serem escassas, quase limitadas aos ossos craniofaciais, razão pela qual se recorre com muita frequência quando se pretende osso esponjoso aos enxertos de osso endocondral.

a) Enxerto ósseo autólogo

A classificação dos enxertos depende da sua origem biológica relativamente ao dador, e assim denomina-se osso autólogo ou autoenxerto, aquele em que o indivíduo dador é também o receptor. Utiliza-se geralmente tecido fresco. Normalmente trata-se de osso esponjoso e, em menor grau, de osso cortical. Tem a vantagem de fornecer volume ósseo, incorporar todas as características do osso original, não ter risco associado de transmissão de determinadas patologias e ser histocompatível. É unanimemente aceite, como já foi anteriormente referido, que o enxerto autólogo se trata do “gold standard” em termos de material de enxerto na medida em que fornece os três elementos necessários à produção e manutenção do tecido ósseo: estrutura de suporte para a osteocondução; factores de crescimento para a osteoindução e células progenitoras para a osteogénese.

A eficácia da maioria deste tipo de enxertos pode ser posta em causa, pois da totalidade de células transplantadas, apenas cerca de 10% se mantém viável após quebrar o contacto com o aporte sanguíneo e até ser repostas no local receptor (McLaughlin e Roush, 1998). A maioria das células transplantadas morre como resultado da isquémia directa ou por indução à apoptose. As células que são mais resistentes à isquémia e que afectam o transplante são as células mesenquimatosas primitivas presentes na medula óssea, bem como as células progenitoras das células endoteliais. A sobrevivência destas células é tida em conta como o factor que justifica em grande medida a sobrevivência e o sucesso dos enxertos autólogos em detrimento dos enxertos homólogos (Burchardt 1983, citado por Bauer e Muschler, 2000).

O enxerto autólogo de osso esponjoso requer normalmente algum grau de fixação interna ou externa, pois este não fornece suporte estrutural (Marsh, 2006). Embora este tipo de enxertos não ofereça estabilidade mecânica adequada, são rapidamente incorporados no local receptor (Khan *et al.*, 2005). Esta incorporação deve-se às suas capacidades osteogénicas, à abundância de factores de crescimento e à grande superfície necessária para que ocorra a formação óssea. Os enxertos autólogos exclusivamente de osso cortical, têm propriedades semelhantes, embora o número de células contidas no enxerto seja menor. A re-

vascularização é mais lenta assim como os fenómenos de reabsorção e remodelação (Khan *et al.*, 2005).

A incorporação de um enxerto está ligada ao local receptor, mais especificamente à sua vascularização e à quantidade e competência das células precursoras endoteliais e conjuntivas de que dispõe (Bauer e Muschler, 2000). No osso trabecular, a penetração dos vasos é de cerca 0,2 a 0,4 mm/dia e no osso compacto é de 0,15 a 0,3 mm/dia (Albrektsson, 1980a,b, citado por Coelho, 2003). Assim fica justificado o facto das velocidades de incorporação dos dois tipos de enxerto serem distintas.

Numa tentativa de ultrapassar os problemas de vascularização insuficiente dos enxertos autólogos “correntes” e de aumentar as possibilidades de sucesso, foram criados, graças ao advento da microcirurgia vascular, os enxertos autólogos vascularizados que, dadas as suas características, aumentam significativamente as possibilidades de sucesso pois permitem uma melhor e mais longa sobrevivência das células e assim, da capacidade osteogénica do próprio enxerto. Nestes enxertos o aporte sanguíneo é assegurado e transplantado, sendo restabelecida não só a circulação vascular da medula óssea, como a rede vascular do periósteo. Os locais mais comuns para colheita deste tipo de enxerto são: as costelas (vasos intercostais posteriores); crista ilíaca anterior (vasos ilíacos circunflexos profundos) e a fíbula (vasos peroniais) (Beaman *et al.*, 2006b). Este tipo de enxertos, não fora a sua escassez quantitativa, seriam claramente os ideais pois fornecem todos os elementos necessários ao sucesso do transplante. Este tipo de enxerto é adequado para defeitos de grandes dimensões e em locais fracamente vascularizados ou com vascularização comprometida pois é restabelecida toda a circulação vascular, sendo a sobrevivência das células transplantadas quase total, independentemente da qualidade vascular do local receptor.

Foi sugerido por Doi *et al.*, (1977) que, se a anastomose vascular for adequada e a estabilidade do enxerto for assegurada, mais de 90% dos osteócitos podem sobreviver ao transplante.

Este tipo de enxertos é mais resistente a processos infecciosos pelo facto de assegurar uma continuidade celular imediata, o que contribui também para o

sucesso da intervenção (Perry, 1999).

O facto de além de osso com a respectiva vascularização, serem transplantados tecidos moles bem vascularizados permite uma razoável flexibilidade no desenho da reconstrução no local dador. Este facto adquire particular importância na reconstrução oral, podendo atingir-se muitos dos objectivos morfológicos e funcionais desta mesma reconstrução (Ardary, 1993 citado por Coelho, 2003; Fasano *et al.*, 1996).

O retalho ideal deve fornecer osso vascularizado em altura e espessura de forma a ser simples e rapidamente moldável para que se possa atingir a forma original do osso ou segmento ósseo reccionado, e de forma ainda a permitir uma reconstrução imediata após a recessão. Esta actuação em simultâneo permite encurtar de forma significativa o tempo cirúrgico (Fasano *et al.*, 1996). A desvantagem é requererem períodos de protecção do local receptor mais longos de forma a prevenir fracturas (Marsh, 2006).

Nos enxertos autólogos não vascularizados, o osso é normalmente colhido da crista ilíaca anterior ou posterior. O defeito criado pode ser monocortical, bicortical ou tricortical, dependendo das características do local receptor e da intenção do cirurgião. A crista ilíaca é o local de eleição na medida em que, nos humanos, o acesso cirúrgico é simples, sobretudo no acesso anterior, e o osso esponjoso existe em qualidade e quantidade significativa, sobretudo no acesso posterior (Marsh, 2006). Pode também ser colhido na fíbula, cabeça femoral, tibia, calcâneo e nas costelas. O local de colheita dependerá da quantidade de osso necessária, do local receptor e da preferência do próprio cirurgião.

A quantidade máxima colhida varia de acordo com vários autores: segundo Bruno *et al.*, (2001), podem ser colhidos até 5,3 cm³ de osso esponjoso compactado. Lindberg *et al.* (1996), citado por DeOrio *et al.*, (2005) refere até 6,0 cm³ de osso esponjoso compactado e Moed *et al.*, (1998) citado por DeOrio *et al.*, (2005), refere até 30 cm³ de osso não compactado.

Bauer e Muschler (2000) referem ainda outro tipo de enxertos ósseos autólogos corticais não vascularizados, que são segmentos corticais em que a anastomose vascular foi comprometida. São compostos por osso desvitalizado

que não induz reacção de rejeição, tendo apenas a vantagem de promover suporte mecânico no local receptor.

O enxerto autólogo pode apresentar no local dador, entre outras complicações, a formação de hematomas, hemorragias, lesões nervosas, formação de hérnias, fracturas, lesões ureterais, instabilidade pélvica (colheita na crista ilíaca), transplante de células tumorais, defeitos cosméticos e, por vezes, dor crónica. Existe ainda a possibilidade da formação de fístula arterio-venosa e pseudo aneurisma da vasculatura pélvica (Catinella *et al.*, 1975 citado por Mroz *et al.*, 2003; Escales e De Wald, 1977 citado por Mroz *et al.*, 2003). O facto de se recorrer a um enxerto autólogo acarreta, normalmente um aumento do período operatório, na medida em que requer a colheita num local dador diferente e nem sempre próximo do local receptor (Betz, 2002; Vaccaro, 2002; Giannoudis *et al.*, 2005; Beaman *et al.* 2006b). Todos estes inconvenientes são colectivamente designados de morbilidade no local dador, e ocorrem em cerca de 20% dos casos (Perry, 1999; Fleming *et al.*, 2000). Segundo Mroz *et al.* (2003) a morbilidade pode mesmo atingir os 30%.

Este tipo de enxerto tem ainda como agravante o facto de que em defeitos ósseos de dimensão superior a seis centímetros, o sucesso torna-se ainda mais limitado dadas as elevadas taxas de reabsorção óssea (Gugala *et al.*, 2007).

b) Enxerto ósseo homólogo

O osso homólogo ou homoenxerto é aquele que é colhido entre indivíduos da mesma espécie. Dentro desta categoria podem ainda distinguir-se o isoenxerto, no qual existe identidade genética entre o dador e o recipiente e os aloenxertos, nos quais apesar da proveniência da mesma espécie, não existe identidade genética entre o dador e o recipiente. Esta opção é normalmente considerada a segunda escolha dos cirurgiões. Representam cerca de 1/3 dos transplantes efectuados os EUA (Boyce *et al.*, 1999).

Segundo Beaman *et al.*, (2006a) os exemplos da utilidade clínica destes enxertos prendem-se com: preenchimento de um vazio ósseo, seja qual for a origem; sistema de libertação *in vivo* de antibiótico; enxertos compostos dos quais faça parte um enxerto homólogo; enxertos homólogos osteoarticulares

(mosaicoplastia); enxertos “onlay” – enxertos em bloco na periferia do osso do receptor (casos de fracturas periprostéticas ou recessões ósseas em bloco).

Os enxertos homólogos eram inicialmente pouco utilizados. Desde meados dos anos oitenta que, com a criação de redes de dadores a nível mundial, a utilização destes enxertos tem sofrido um aumento exponencial. Geralmente os enxertos a partir de cadáveres são obtidos até vinte e quatro horas após a morte do dador, sendo posteriormente processados (Mroz *et al.*, 2003). Exemplos de fontes alternativas para este tipo de enxertos são as cabeças femorais doadas após aplicação de prótese da anca (Marsh, 2006). Os enxertos homólogos podem ser de osso esponjoso, cortical ou ambos.

Os enxertos homólogos existem em fresco (de forma teórica), congelado e liofilizado. Este tipo de enxerto não é normalmente utilizado em fresco, já que os riscos de rejeição ou transmissão de doença são exacerbados. A possibilidade deste tipo de enxerto funcionar como material infeccioso é real pois estimou-se que o risco de transmissão do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV ou VIH) é de 1 em 1,6 milhões (Boyce *et al.*, 1999). Há um caso relatado de transmissão de hepatite B e três casos de hepatite C, sendo o último caso relatado de 1992 (Asselmeier *et al.*, 1993; Tomford 1995; Laurencin *et al.*, 2006)

Para além destes casos, há ainda relatos de pacientes que desenvolvem artrites sépticas e clostridioses por recebem este tipo de enxertos homólogos. A razão da ocorrência destes casos deve-se ao facto destes tecidos terem sido assepticamente processados mas não submetidos a uma esterilização final (Ilán e Ladd, 2003). Por outro lado, a intensidade da reacção imunológica é tanto menos intensa quanto mais agressivo for o processamento do tecido ósseo a ser transplantado, podendo comprometer e debelar estas infecções. Porém, os processos de esterilização e desactivação eliminam também o cocktail de factores de crescimento e estruturas não proteicas existentes na matriz e que são essenciais para a osteoindução (Laurencin *et al.*, 2006).

Relativamente ao processo de liofilização, os enxertos homólogos são submetidos a uma dupla lavagem com antibiótico, congelados a -70° C e posteriormente secos, até adquirirem um grau de humidade relativa de 5%

(Giannoudis *et al.*, 2005). Os enxertos processados desta forma quando comparados com os enxertos homólogos frescos ou congelados de forma simples, são menos antigénicos e têm um potencial de armazenamento quase infinito. Contudo até cerca de 50% da sua capacidade mecânica é perdida (Mroz *et al.*, 2003). Desta forma e de acordo com Gazdag (1995), as capacidades de armazenamento podem estender-se durante anos à temperatura ambiente e o processo não produz alterações químicas no enxerto. Uma vez liofilizados são embalados e esterilizados por raios gama gerados por Cobalto 60. Quando são utilizados devem ser abertos em ambiente esterilizado e o osso re-hidratado numa solução salina (Dallari *et al.*, 2006).

Existem bancos de osso em que o material é guardado refrigerado ou congelado mas a sua distribuição não é uniforme a nível mundial, estando esta limitada por razões financeiras, religiosas ou culturais, pois há países em que a prática dos enxertos homólogos é culturalmente inaceitável (Carson e Bostrom, 2007).

Obviamente que este tipo de enxerto tem resultados clínicos mais variáveis que o enxerto autólogo (Togawa *et al.*, 2004) e existe ainda, mesmo se pouco significativa, a possibilidade de rejeição (Betz, 2002; Vaccaro, 2003; Barriga *et al.*, 2004; McCann, 2004; Giannoudis *et al.*, 2005).

Lin *et al.*, (2007), afirmam mesmo que os enxertos homólogos sofrem uma reabsorção mais prematura que os outros tipos de enxerto.

Nos enxertos homólogos ao contrário dos enxertos autólogos, uma vez formado o calo ósseo e estando este calcificado, o processo de regeneração óssea no córtex cessa, ficando um segmento considerável de osso necrosado não capaz de responder a solicitações mecânicas segundo a lei de Wolff. Assim, os enxertos homólogos têm uma esperança de vida limitada já que eventuais micro-fracturas que ocorram no seu interior, não poderão sofrer regeneração nem reparação. Estes enxertos quando são aplicados são rodeados por tecido fibrovascular de granulação e submetidos a uma invasão de percursoros osteogénicos e angiogénicos. A zona de interface ou contacto entre a zona fibrovascular e o enxerto será a zona de actividade osteoclástica e de reabsorção

óssea. Deverá haver um equilíbrio entre a osteólise e a osteogénese para que a integração do enxerto aconteça (Moran e Wood, 1997, citados por Beaman *et al.*, 2006a).

A incorporação deste tipo de enxertos é qualitativamente semelhante aos enxertos autólogos não vascularizados, apenas mais lenta e acompanhada de uma reacção inflamatória variável que pode ser atribuída, em algum grau, à rejeição por parte do paciente (Bauer e Muschler, 2000). A maioria dos enxertos homólogos funde-se ao osso receptor entre as junções córtex ao córtex ou medula a medula. Nas junções córtex ao córtex, a união ocorre por ossificação intramembranosa a partir do perióstio reconstituído e não por extensão das extremidades seccionadas. Em locais com estabilidade mecânica, a ossificação que ocorre num enxerto homólogo é do tipo intramembranosa, já que cartilagem só é observada caso haja mobilidade no local do enxerto (Bauer e Muschler, 2000). Os intervalos entre o local receptor e o enxerto podem ser preenchidos por osso que se estende a partir do perióstio, levando a que a extremidade do enxerto possa ser reconhecida imagiologicamente por uma linha de cimento persistente. Os osteónios do osso neoformado são perpendiculares aos do córtex do enxerto. Enneking e Mindell (1991) verificaram que a orientação perpendicular dos sistemas de Havers não sofre remodelação, permanecendo distinta da estrutura do enxerto homólogo durante 5 anos.

A taxa de insucesso deste tipo de enxertos é de 25 a 35%, isto por razões várias, tais como infecção, não-união e fractura (Ito *et al.*, 2005). As falhas clínicas deste tipo de enxertos devem-se sobretudo à incompleta re-vascularização e remodelação óssea.

Basicamente os enxertos homólogos quando utilizados sozinhos funcionam quase exclusivamente como estruturas de suporte osteocondutivas (Bauer e Muschler, 2000). Por esta razão os enxertos homólogos são normalmente utilizados em conjunto com outras substâncias com capacidades osteoindutoras e angiogénicas. Ito *et al.*, (2005) num estudo inovador com vírus adeno-associados (AAVs), que codificam para VEGF e um activador do receptor do factor nuclear κ B (RANKL), demonstraram que quando adsorvidos num enxerto homólogo preparado por liofilização, estimulam a vascularização e a remodelação num

modelo animal, o rato. Estes autores também demonstraram que o bloqueio da actividade destes AAVs, que codificam os receptores solúveis para VEGF e RANK, resultava na inibição da incorporação do enxerto homólogo, o que denota a importância destes factores na integração do mesmo. Assim, os últimos estudos apontam para um novo rumo nos enxertos homólogos, ou seja aquele que segue a via que promoverá a angiogénese no próprio enxerto ósseo, como referido anteriormente.

c) Aspirado de medula óssea

De acordo com Dallari *et al.*, (2006) a medula óssea, contém os precursores das células osteogénicas que produzem directamente osso. Esta potencialidade tem sido utilizada para reparar defeitos ósseos em diferentes modalidades: utilização de medula óssea fresca injectada na lesão esquelética; utilização de concentrado de medula óssea (esta concentração é obtida por centrifugação) e a utilização de células estaminais da medula óssea purificadas e expandidas *in vitro* (Healey *et al.*, 1990).

Num estudo de Kang *et al.*, (2008) utilizando células mesenquimatosas estaminais da medula óssea humana (BMMSCs) osteogenicamente diferenciadas (por engenharia genética de forma a super expressarem um gene osteogénico, por exemplo a BMP) semeadas num material de suporte de hidroxiapatite no dorso de ratos atímicos, os resultados são substancialmente mais promissores com neoformação óssea mais extensa do que a “simples” utilização de BMMSCs. Neste estudo as BMMSCs cultivadas num meio osteogénico suplementado com glicerofosfato, ácido ascórbico e dexametasona, sofreram diferenciação osteogénica *in vitro*, tendo demonstrado *in vivo*, uma mais extensa neoformação óssea após transplante. A medula óssea fresca tem uma quantidade diminuta de células estaminais (cerca 0,001%), ao passo que a utilização destas células expandidas *in vitro*, permite atingir uma quantidade significativa de células purificadas. O método de centrifugação diferencial é reconhecidamente o método mais eficaz na obtenção de uma maior densidade de células estaminais da medula óssea. De qualquer forma, estas células precisarão de uma estrutura de transporte que as coloque e permita que permaneçam *in loco*.

Os aspirados de medula óssea têm um uso limitado dado o reduzido número de células osteoprogenitoras que contêm, bem como as suas difíceis características de manuseamento. Outros inconvenientes são devidos ao reduzido número destas células e a sua diminuição com a idade, como já foi anteriormente referido, ou ainda o facto destas células tenderem a difundir-se para longe do local de aplicação. Os produtos que existem no mercado são “kits” de aspirado de medula óssea numa estrutura de matriz óssea desmineralizada (Sen e Miclau, 2007). No sentido de colmatar a fraca densidade de células osteoprogenitoras têm também sido utilizados aspirados múltiplos e técnicas de concentração celular. O número de células progenitoras transplantadas é estimado a partir do número de unidades de formação de colónias de fibroblastos (Hernigou *et al.*, 2005).

d) Matriz óssea desmineralizada (DBM)

É uma matriz que resulta da descalcificação do osso cortical ou cortico-esponjoso, produzindo um composto de proteínas não colagénicas, factores de crescimento e colagénio. O objectivo de desmineralizar, apesar de acarretar uma diminuição da força estrutural, da rigidez do osso e do potencial para a formação de novo osso, tem em vista a redução do potencial de infecção e rejeição a este substituto (Schieker *et al.*, 2006). Segundo Glowacki (1991) citado por Beaman *et al.*, (2006b) o processo de descalcificação implica porém a inability de localizar o material implantado na medida em que deixa de ser radioluciente.

Na DBM a estrutura trabecular colagénica é mantida e grande parte dos factores de crescimento permanecem viáveis e mais bio-disponíveis, pelo que esta estrutura pode ser inclusivamente mais osteoindutiva do que a matriz óssea original de um enxerto homólogo (Sandhu *et al.*, 1999; Fleming *et al.*, 2000; Schieker, *et al.*, 2006). Este tipo de substituto serve basicamente, como estrutura de suporte osteocondutiva. É mais utilizado como expansor de enxerto do que propriamente como substituto ósseo. O processo de obtenção da DBM é variável pelo que frequentemente também os seus resultados são variáveis (Lane *et al.*, 1999 citado por Giannoudis *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2000 citado por Giannoudis *et al.*, 2005; Truumees e Herkowitz, 1999, citado por Giannoudis *et al.*, 2005).

e) Enxerto ósseo heterólogo

O enxerto ósseo utiliza tecido de um ser vivo de outra espécie animal ou vegetal, ou seja, em que o dador e o recipiente são de espécies diferentes. Relatos de Haeseker (1988), Haeseker (1991); Sanan e Haines (1997); Durand *et al.*, (1997) descrevem o que poderá ter sido o primeiro enxerto ósseo (xenoenxerto) conhecido ocorrido no séc. XVII: o tratamento de um defeito ósseo craniano num soldado com osso de origem canina, realizado na Rússia por um cirurgião no seu país. Embora aparentemente bem sucedido, terá depois sido removido já que o receptor havia sido excomungado por esse motivo e, como pretendia voltar a professar a sua fé, pediu para que lhe fosse retirado o enxerto.

Um outro relato de época, este já do séc. XIX: “Nas minhas notas encontro um caso interessante de autoplastia teratológica que me foi referido pelo Sr. Eduardo Marques, intérprete sinólogo da repartição do expediente sínico de Macau. Apareceu n'aquella cidade um curandeiro a vender um unguento cuja qualidade recommendada era sarar com notável proficuidade qualquer ferimento. Como reclamo ao seu medicamento, cortava as pernas a uma gallinha e a um pato com um rapido golpe de parão (termo de Macau que significa faca de cortar lenha ou carne) e com a mesma rapidez adaptava as de um nas do outro, rodeando a junctura com uma grande cataplasma do seu unguento e com uma boa ligadura. Postos os animaes em capoeira apropriada, onde lhes não era possível o movimento, ao fim de alguns dias as pernas de um estavam perfeitamente adaptadas às do outro. Não há duvida que o principio da autoplastia extensivo ao systema osseo, recommendava o unguento, que naturalmente não tinha influencia alguma na operação” (Macgowan 1892).

f) Hidroxiapatite coralina – Trata-se de uma cerâmica de origem natural proveniente de um coral do Pacífico sul, *Gonipora*, que é tratado termo-quimicamente com fosfato de amónio e que demonstra uma porosidade semelhante ao osso esponjoso. Estes materiais apresentam uma micro-estrutura altamente organizada, com poros longitudinais de 500 a 600 µm de diâmetro e interconexões de 220 a 260 µm, simulando osso esponjoso humano (Bucholz *et al.*, 2002).

Dada a reduzida resistência intrínseca deste material só deverá ser utilizado em defeitos até 7 a 8 cm e deve ser utilizada a fixação interna para que, uma vez submetido a peso, o implante funcione do ponto de vista da resistência mecânica. Por estas razões e segundo Carson e Bostrom (2007) este material deverá ser utilizado sobretudo como expansor de enxertos autólogos. Este tipo de material apresenta a desvantagem de ter uma degradação muito lenta na medida em que os osteoclastos apenas degradam a superfície da estrutura, o que, segundo estes mesmos autores, faz com que este material deva ser utilizado em zonas onde a remodelação óssea não seja considerada crítica. A grande vantagem da utilização deste composto é o facto de a sua disponibilidade ser quase ilimitada (Salgado *et al.*, 2004).

Dentro deste grupo de substitutos ósseos heterólogos de origem natural, adquirem crescente importância os polímeros de origem natural, tendo como exemplos mais utilizados o colagénio e o amido. Existem muitos outros como o quitosano e o ácido hialurónico.

g) Colagénio – É um polímero natural que é também o constituinte primário da matriz óssea sendo aí a proteína que existe em maior quantidade. Isolado não actua como substituto ósseo eficaz mas em conjugação com BMPs, percursoros osteogénicos ou hidroxiapatite, aumenta de forma significativa a osteointegração do implante. Pode também ser utilizado, à semelhança da DBM, como expansor de enxertos autólogos (Zerwekh *et al.*, 1992; Muschler *et al.*, 1994; Chapman *et al.*, 1997).

h) Amido – este composto tem a vantagem de, à semelhança da hidroxiapatite coralina, a sua disponibilidade ser quase ilimitada (Salgado *et al.*, 2004).

O amido como material de origem natural evita alguns das possíveis complicações de poliésteres alifáticos como ácido poliláctico, o ácido poliglicólico, a poli caprolactona e os seus co-polímeros, que libertam produtos de degradação ácidos, podendo desencadear uma resposta inflamatória e prejudicar a integração pelo tecido hospedeiro (Behravesch *et al.*, 1999; Hutmacher, 2000).

Os sistemas baseados em amido polimérico são habitualmente conjugados

com polímeros termoplásticos como o acetato de celulose (CA) ou álcool etileno-vinil (EVOH) de forma a melhorar a sua resistência à degradação termomecânica e torná-los menos quebradiços e de processamento mais fácil (Reis *et al.*, 2001 citado por Salgado *et al.*, 2007).

Salgado *et al.*, (2007) estudaram a resposta endo óssea a três estruturas temporárias à base de amido (a - amido de milho conjugado com álcool etileno-vinil; b - a mesma composição mas revestida com uma camada de fosfato de cálcio bio-mimético e c - e uma conjugação de amido de milho e acetato de celulose), implantadas em ratos. Concluiu-se que todos os materiais exibiram uma resposta óssea favorável e que o tecido conectivo de formação rápida, observado em redor das estruturas temporárias referidas, se tratava de uma forma de formação óssea precoce.

A questão que se coloca com a utilização de amido ou outros polímeros de origem natural, ainda que com resultados de sucesso em aplicações pontuais, é a sua fraca versatilidade de fabrico face aos polímeros sintéticos. A vantagem inultrapassável é de facto e, como já anteriormente referido, o facto de sendo um material de origem natural, teoricamente, haverá menor possibilidade de desencadear reacções inflamatórias, das fontes serem quase inesgotáveis e a matéria-prima de base ser a baixo custo.

Como ficou demonstrado, a substituição do osso por enxertos não é totalmente eficiente, nem do ponto de vista funcional, nem do ponto de vista quantitativo e, dado o osso não ser, por enquanto, um recurso inesgotável, a necessidade de dispor de fontes de osso alternativas em quantidade significativa, é premente.

A dicotomia entre enxertos ou substitutos ósseos sintéticos coloca-se diariamente a todos os cirurgiões ortopédicos, maxilo-faciais e estomatologistas. A decisão é difícil, mas certamente a investigação nesta área tem cabimento e actualidade, na medida em que, até hoje, não existe nenhum substituto ósseo ideal, verdadeiramente capaz de substituir, na íntegra, o osso.

1.7.3.2. Substitutos sintéticos

Os materiais sintéticos por oposição aos que ocorrem naturalmente, têm a vantagem de se poderem manipular física e quimicamente, não tendo assim resultados finais tão imprevisíveis (Vacanti, 2006). Estes materiais de suporte podem mimetizar os componentes do tecido que pretendem substituir.

Desde épocas mais remotas em que foram dados os primeiros passos na substituição óssea, passando pela primeira utilização de gesso de Paris até aos dias de hoje, esta área tem sofrido um crescimento exponencial, sendo talvez um dos temas sobre o qual mais investigação é realizada e sobre o qual mais artigos se publicam.

Certamente uma das vantagens significativas da utilização de substitutos sintéticos é o facto de poder haver disponibilidade imediata em várias formas e tamanhos possíveis, poderem ser fabricados à medida das necessidades, sem toxicidade associada, na quantidade pretendida, e certamente com custos de produção menores (Place *et al.*, 2009). Estes substitutos não apresentam nenhum grau de morbidade no local dador para além de, na maioria dos casos, haver fontes inesgotáveis de material.

Os materiais de suporte sintéticos apresentam mesmo a possibilidade de virem a ter um melhor desempenho que os enxertos autólogos pois representam a única possibilidade de actuar, quer como suporte para o crescimento ósseo, quer como fonte de estabilidade mecânica. Assim, o objectivo último final, é criar um enxerto sintético que ofereça resistência à compressão superior à dos enxertos autólogos, que seja reabsorvível para permitir o crescimento para o seu interior de osso neoformado e vasos sanguíneos e, que a sua resistência vá aumentando à medida que se processa a remodelação do novo osso (Carson e Bostrom, 2007). Por último estes materiais deverão ser de manipulação e esterilização fáceis (Doll *et al.*, 2001).

A engenharia tecidual desempenha aqui um papel fulcral sendo definida por Langer e Vacanti (1993) como uma área própria e interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e das ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter e melhorar as funções tecidulares.

A origem da engenharia tecidual na produção de substitutos biológicos tem origens tão remotas, sendo que, de acordo com Vacanti (2006) as primeiras citações a esta área da ciência são do livro do *Genesis* quando a partir de uma costela de Adão, Deus cria a mulher.

De forma generalizada podemos agrupar estes substitutos ósseos em três grandes categorias: metais, cerâmicas e polímeros (Salgado *et al.*, 2004).

1.7.3.2.1. Metais

Este grupo de substitutos ósseos é largamente utilizado. Na história da substituição óssea é o grupo com relatos de utilização mais antiga pois as primeiras osteossínteses relatadas datam de 1565 por Petronius com a utilização de uma placa de ouro para correcção de uma fenda palatina (Sulong e Aziz, 1990).

Na área da ortopedia raramente são utilizados isoladamente mas sim como suporte de enxertos ósseos em reconstruções temporárias ou definitivas.

A sua característica principal é o facto de serem dotados de grande resistência mecânica. Do ponto de vista biológico a sua capacidade de resistência à corrosão pode conduzir à libertação de iões metálicos muitas vezes não desejáveis. Este fenómeno é particularmente notório no ambiente bucal (Coelho, 2003).

Diversos metais após contactos prolongados com o organismo têm a potencialidade para desencadear fenómenos indesejáveis como do tipo inflamatório, alérgico ou mesmo tóxico. Entre os metais o titânio e algumas das suas ligas, são as próteses metálicas mais utilizadas, sobretudo em cirurgia maxilo-facial e ortodôncia. Estes apresentam as propriedades ideais como sendo excelente resistência à corrosão com fraca difusão iónica no local receptor, baixa densidade e elevada resistência mecânica. A utilização de placas rígidas neste material para reconstrução mandibular é segura e eficaz para restaurar a continuidade e cosmética mandibular (Coelho, 2003).

1.7.3.2.2. Cerâmicas

Uma cerâmica é um sal mineral aquecido a temperaturas muito elevadas,

acima de 1000°C, num processo denominado aglomeração. Trata-se de um material de utilização segura, não imunogénico, com uma elevada capacidade de adesão ao osso. Demonstra no entanto alguma fragilidade mecânica com uma baixa capacidade de distensão e resistência à fractura (Mroz *et al.*, 2003).

As cerâmicas de fosfato de cálcio, geralmente trifosfato (TPC) e as hidroxiapatites (HA) têm características químicas e cristalográficas semelhantes ao osso (Schieker *et al.*, 2006). Caracterizam-se por serem biocompatíveis (Aoki, 1994, citado por Wang, 2003) e a maioria é também bioactiva e osteocondutora. Pensa-se que a biocompatibilidade se deve à sua semelhança química e estrutural com a fase mineral do osso (Rizzi *et al.*, 2001).

Uma das características importantes a ter em conta na utilização deste tipo de material é o diâmetro dos seus poros. A dimensão considerada adequada em termos de osteocondutividade para as cerâmicas situa-se entre 150 a 500 µm (Flatley *et al.*, 1983, citado por Carson e Bostrom, 2007). Caso haja um aumento da dimensão dos poros o substituto não é capaz de manter a força compressiva necessária.

As cerâmicas bioactivas estimulam, comprovadamente, a diferenciação dos osteoblastos assim como o próprio crescimento destas células (Marra *et al.*, 1999 citado por Kim *et al.*, 2006; Ambrósio *et al.*, 2001 citado por Kim *et al.*, 2006).

As porosidades típicas para as estruturas de hidroxiapatite descritas na literatura são de cerca 35% (Pilliar *et al.*, 2001; Simske 1997, citado por Deville *et al.*, 2006) a 75% (Tamai *et al.*, 2002), com diâmetros dos poros de 50 µm (Chang *et al.*, 2000; Itälä *et al.*, 2001) a 400 µm (Tsuruga *et al.*, 1997; Flautre *et al.*, 2001; Pilliar *et al.*, 2001; Tamai *et al.*, 2002).

A sua utilização mais frequente é como cobertura bioactiva das cabeças de fémur, nas próteses totais da anca (Geesink, 1992, citado por Wang, 2003).

O sulfato de cálcio é também uma cerâmica osteocondutiva, detém a mais longa história na aplicação clínica como substituto ósseo e elevados níveis de segurança (Pietrzak e Ronk, 2000), sendo também biocompatível, bio-absorvível e osteocondutor. Do ponto de vista terapêutico é utilizado como expansor, como

ligante e como barreira física de protecção dos enxertos ósseos (Tay *et al.*, 1999; Sottosanti, 1995).

As desvantagens da utilização das cerâmicas prendem-se com o facto destas ocuparem um espaço que poderia ser também ocupado por osso viável, para além de impedirem a vascularização e poderem introduzir algum “stress” de concentração no local de implantação. Por outro lado as cerâmicas são quebradiças devido à sua falta de capacidade de deformação elástica e plástica (Wang, 2003). Por estas razões e pelo facto de no caso específico da hidroxiapatite, ter uma taxa de degradação muito lenta (Van Landuyt *et al.*, 1995) as aplicações clínicas isoladas das cerâmicas de origem sintéticas são limitadas.

As vantagens da utilização destes substitutos poderão ser incrementadas se utilizados conjuntamente com enxertos autólogos, pois dessa forma podem não só adquirir propriedades osteoindutoras como expandir o volume do enxerto, servir de estrutura de suporte, permitir que o enxerto adquira alguma estabilidade e protegê-lo contra a infiltração por tecidos moles.

1.7.3.2.3. Polímeros

Os substitutos poliméricos sintéticos são os substitutos ósseos que mais condições reúnem para se aproximarem do substituto ideal.

Inicialmente utilizados na indústria, estes polímeros vieram a ser utilizados pela razão que se pensava inicialmente ser uma desvantagem significativa, ou seja, o facto de perderem estabilidade ao longo do tempo. Essa desvantagem tornou-se depois numa vantagem, já que a estrutura de suporte permite o crescimento ósseo para o seu interior e, quando a quantidade de osso neoformado é suficiente, o material implantado começa a ser gradualmente degradado. Desta forma estes implantes permitem que o tecido ósseo neoformado ocupe o espaço anteriormente ocupado por si próprio, o que não acontece com outros materiais de substituição, nomeadamente as cerâmicas ou metais.

Os polímeros sintéticos são utilizados há muitos anos, sobretudo o polimetilmetacrilato, como substitutos ósseos para preenchimento de defeitos e na reconstrução de fracturas complexas.

Nas últimas três décadas o interesse por polímeros tem crescido, em particular sobre os ácidos poli(α -hidroxiácidos). Estes polímeros rígidos com temperaturas de transição semelhantes ao vidro (a cerca de 50° C) podem ser produzidos em implantes sólidos, por processos baseados na fusão, que são utilizados para a fixação de fracturas ósseas. Refira-se contudo que os materiais de suporte produzidos a partir destes materiais rígidos sofrem deformação plástica sob pressão mecânica muitas vezes acompanhada de uma diminuição da porosidade do próprio material de suporte (Gorna e Gogolewski, 2006).

Os monómeros que compõem cada polímero podem ter vários substituintes ou seja, grupos químicos “activos” em substituição de átomos de hidrogénio. Estas diferenças entre monómeros afectam diversas propriedades dos polímeros, entre as quais a solubilidade, a flexibilidade e a solidez. E estas mesmas diferenças podem ser utilizadas e manipuladas no sentido desejado de forma a obter um substituto com características específicas e desejadas.

Ao longo do tempo novos polímeros têm vindo a ser sintetizados como forma de fazer face a desvantagens específicas demonstradas por polímeros já existentes. Os mais comuns e de utilização mais generalizada actualmente são, como mencionado anteriormente, os polihidroxiácidos e dentro deste grupo os polímeros parcialmente biodegradáveis de ácidos como o ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), policaprolactona (PCL) e os seus co-polímeros e o ácido poli-L-láctico (PLLA). Estes poliésteres degradam-se por hidrólise, podendo daí resultar oligómeros ou monómeros, que entram em ciclos metabólicos naturais (Amass *et al.*, 1988). Estes polímeros já existem no mercado sob a forma de suturas, material de pensos e cateteres (Albertsson e Varma, 2003). A maioria destes polímeros são hidrófobos o que pode constituir uma desvantagem em regeneração tecidular sobretudo no que respeita à sua biodegradação e adesão celular.

No caso concreto da substituição óssea, os polímeros têm sido sintetizados sob a forma de parafusos, membranas e esponjas e têm sido utilizados com taxas de sucesso elevadas em fracturas extensas (Carson e Bostrom, 2007). A utilização dos polímeros representa cerca de 10% das substituições ósseas realizadas a nível mundial (Betz, 2002, citado por Bodde *et al.*, 2007).

Estas estruturas poliméricas devem ser dotadas de um elevado *modulus* elástico de forma a permitir um suporte mecânico temporário, sem sinais de fadiga ou falha, devendo ser mantidas no local para o qual foram construídas e providenciar espaço suficiente para o crescimento do novo tecido (Brekke e Toth, 1998).

Mais recentemente, têm surgido outros polímeros utilizando os policarbonatos, como por exemplo os poliuretanos, PU (Place et al., 2009).

O poliuretano elastomérico, biocompatível, biodegradável e segmentado, é um dos promissores candidatos a implante ósseo (Gorna *et al.*, 2001) e até como alternativa aos poliésteres para aplicações em tecidos moles e duros (Sokolsky-Papkov *et al.*, 2007). Este composto é de particular interesse pela sua versatilidade química, podendo ser fabricado “à medida” do ponto de vista químico e físico, podendo ser rígido ou elástico, hidrófobo, hidrófilo ou anfílico.

PU pode ser preparado por moldagem líquida reactiva tornando-o ainda potencialmente utilizável como biomaterial injectável em terapias não invasivas (Guelcher, 2008). Por outro lado, a interacção do PU com as células e os tecidos pode ser promovida, à semelhança do que pode ocorrer com outros polímeros, pela incorporação de radicais ou substituintes por meio de ligações covalentes à cadeia principal do polímero ou às cadeias laterais (Gogolewski *et al.*, 2008).

Como foi anteriormente mencionado, o PU é um promissor substituto e uma das substâncias em estudo neste trabalho, o que faz com que mereça especial destaque.

1.7.3.2.3.1. Poliuretano

a) Definição e principais características

Por poliuretano entende-se qualquer polímero que compreenda uma cadeia de unidades orgânicas unidas por ligações uretânicas. A principal reacção de produção de poliuretanos tem como reagentes um di-isocianato disponível em cadeias alifáticas ou aromáticas e um poliol (como o etilenoglicol, 1,4 butanodiol, dietilenoglicol, glicerol ou trimetiolpropano) ou um poliol-poliéster na presença de catalisador e de materiais para o controlo da estrutura das células (surfactantes)

no caso de espumas. O poliuretano pode ter uma variedade de densidades e de durezas, que variam de acordo com o tipo de monómero usado e de acordo com a adição ou não de substâncias modificadoras da suas propriedades (Britannica 2008).

O poliuretano pode possuir uma vasta gama de propriedades através da variabilidade do seu segmento duro (di-isocianato) ou mole (poliol ou poliésteres), dos extensores de cadeia e das taxas sobre as quais estes componentes reagem entre si (Martina e Hutmacher, 2007).

b) Origem e história de utilização industrial

O poliuretano é um material de origem industrial utilizado na construção desde o fim dos anos trinta. A sua produção está ligada a Otto Bayer (1902-1982) reconhecido pelo pai do poliuretano pela invenção do processo que está na origem da produção deste polímero, a poli-adição básica de di-isocianato.

A origem deste material está essencialmente ligada ao início da segunda guerra mundial pois nessa altura foi utilizado como substituto da borracha. Nessa época os revestimentos de poliuretano eram utilizados para a impregnação de papel e fabrico de roupa resistente ao gás mostarda, acabamentos aeronáuticos, material de protecção à corrosão e agressões químicas para metais, madeira e alvenaria. No período final da segunda guerra mundial o poliuretano era já fabricado e utilizado em larga escala, sendo mesmo fabricado à medida para determinadas aplicações mais específicas. Na década de 50 o poliuretano é encontrado numa variedade de revestimentos, adesivos, elastómeros e espumas rígidas. No fim desta década começaram a ser produzidas esponjas de poliuretano flexíveis disponíveis para comércio. Desde o desenvolvimento dos poliál poliéster de baixo custo que as espumas flexíveis invadiram o mercado, sendo o seu fabrico e consequente a sua utilização em massa, canalizado para uso doméstico e na indústria automóvel. No final da década de cinquenta surgiram as espumas como constituintes de confortáveis colchões disponíveis para venda. Nos últimos anos as técnicas de fabrico têm sido largamente aperfeiçoadas, não só em termos do processo em si, mas também no que concerne à alteração das características base da própria substância, recorrendo a diferentes aditivos. Mais de três quartos

do consumo global de poliuretano é sob a forma de espumas dos tipos flexível e rígido, aproximadamente iguais quanto à fatia de mercado que cada um ocupa. Em ambos os casos, a espuma está geralmente dissimulada por outros materiais. As espumas rígidas estão dentro das paredes metálicas ou plásticas da maioria dos frigoríficos e congeladores ou no interior das paredes de alvenaria, caso sejam usadas como isolamento térmico na construção civil. As espumas flexíveis estão no interior de revestimentos móveis e colchões, por exemplo.

As espumas poliuretânicas flexíveis e semi-flexíveis são amplamente utilizadas nos componentes do interior de automóveis. Actualmente os poliuretanos podem ser encontrados em inúmeros objectos do dia-a-dia desde mesas, cadeiras, carros, roupa, colchões, calçado, electrodomésticos, camas e isolamento térmico de paredes, chão e tectos (CPI, 2009)

c) Utilização médica

Nos últimos anos e apesar da sua origem industrial, o poliuretano segmentado tem seguido também outros rumos: o poliuretano bio-estável é actualmente utilizado em numerosas áreas da medicina. Por ser um material em geral biocompatível, tem sido utilizado numa variedade de aplicações médicas dada a sua extraordinária versatilidade química, que lhe permite poder ser fabricado como bio-estável ou biodegradável e rígido ou elástico, dependendo da sua aplicação posterior (Gogolewski, 1992). Como exemplos mais comuns são utilizados na reconstrução dos ligamentos e do menisco (Spaans *et al.*, 2000; Gisselfält *et al.*, 2002) em contentores de sangue (Lelah *et al.*, 1987 citado por Kavlock *et al.*, 2007; Oertel, 1994, citado por Kavlock *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2001), bombas de infusão (Szycher, 1999, citado por Kavlock *et al.*, 2007), válvulas cardíacas (Hoffman *et al.*, 1993 citado por Kavlock *et al.*, 2007), isoladores para eléctrodos de “pacemaker” (Capone 1992 citado por Kavlock *et al.*, 2007), material de pensos ou cateteres endovenosos, pele artificial (Gogolewski e Pennings, 1983 citado por Gorna e Gogolewski, 2006), implantes cardiovasculares (Gogolewski *et al.*, 1987, citado por Gorna e Gogolewski, 2006; Gogolewski *et al.*, 1987, citado por Gorna e Gogolewski, 2006), fibras nervosas e substitutos de osso esponjoso (Gogolewski *et al.*, 2001a; Gogolewski *et al.*, 2006).

De acordo com Gogolewski e Gorna (2007), os polímeros bio-absorvíveis ou biodegradáveis são candidatos promissores a substitutos ósseos. A utilização de substitutos ósseos rígidos promove normalmente micro-movimentações no local de interface osso-implante que podem levar à acumulação de detritos celulares e que podem também retardar ou mesmo impedir a regeneração óssea. Isto é tanto mais válido quanto maior for a rigidez do substituto em questão. Quando o substituto é suficientemente elástico e expansível e é colocado no local do defeito sob pressão, pode expandir-se à *posteriori*, estabelecendo um contacto íntimo com as interfaces de ligação ao osso nativo, diminuindo as micro-movimentações e permitindo o crescimento celular nestas zonas cruciais. Este facto permite ainda que a sua elasticidade intrínseca o proteja contra as “shear forces” no local de interface do implante com o osso nativo. Estes factos facilitam a proliferação de células osteogénicas do osso para o implante, promovendo assim a regeneração óssea. Este fenómeno acontece com substitutos elastoméricos como é o caso do PU (Gogolewski e Gorna, 2007).

O poliuretano como estrutura de suporte demonstrou uma recuperação elástica sem deformação plástica após sujeição a peso. Estas estruturas temporárias ou materiais de suporte de poliuretano suportam a acção de carga física até 25% de deformação e sofrem uma recuperação elástica sem pouca ou nenhuma deformação final (Gorna e Gogolewski, 2006) ou sequer alterações quer na geometria, quer no diâmetro dos poros. Estas propriedades são desejáveis para materiais de suporte indicados para a engenharia tecidual de tecidos submetidos a carga mecânica, como é o caso do osso (Gogolewski *et al.*, 2008). A deformação plástica observa-se por exemplo nas estruturas produzidas a partir de polímeros rígidos como os polihidroácidos.

Lee *et al.*, (2005) afirmou que uma vantagem distinta do poliuretano face a outras estruturas temporárias macroporosas é possuir integridade mecânica suficiente para suportar peso mas ser simultaneamente manipulável para cultura *in vitro* e para implantação *in vivo*. Esta dualidade é uma vantagem vital do poliuretano face aos outros polímeros sintéticos.

As propriedades osteocondutoras de uma estrutura temporária de

poliuretano podem ser incrementadas colocando no interior da estrutura, cerâmicas de fosfato de cálcio, de preferência de nanodimensão.

Como foi também referido, nenhum dos substitutos ósseos que se conhece é *per se* universal para todo o tipo de tecidos ou órgãos, reunindo sozinho todas as características necessárias para conseguir uma reconstituição *ad integrum*. Nesta perspectiva, os materiais de suporte de poliuretano poderão ser impregnados com células autólogas *ex vivo* e posteriormente, estas estruturas podem utilizar-se como implantes (Gorna e Gogolewski, 2006), conferindo assim um potencial osteoindutor adicional ao implante.

Outra forma de promover a bioactividade da estrutura de poliuretano com células, tecidos e fluidos orgânicos poderá ser promovida de forma adicional através da utilização de grupos funcionais bioactivos (substituintes) como anteriormente mencionado. Esta incorporação ou impregnação de grupos bioactivos pode ser conseguida de duas formas. A primeira consiste numa impregnação simples durante a síntese da cadeia polimérica de poliuretano como por exemplo a sua imersão numa solução de polímero fundido. Este procedimento, embora simples, não é totalmente eficaz na medida em que o grupo activo é facilmente removido por água ou mesmo diluído. A segunda possibilidade consiste em processos mais sofisticados, mas mais exigentes: nestes casos os grupos funcionalmente activos são incorporados na cadeia polimérica através de síntese por ligações químicas covalentes. Neste caso não poderão ser facilmente removidas quando da imersão em soluções aquosas, como por exemplo, a solução de lactato de Ringer usada para humedecer o implante antes da sua colocação e só se libertam por cisão da cadeia polimérica, aquando a degradação do polímero (Gogolewski e Gorna, 2007).

Do ponto de vista racional a utilização do poliuretano como substituto ósseo tem várias vantagens: propicia uma calcificação *in vivo* que é uma característica desejável para qualquer substituto ósseo; pode ser sintetizado com um amplo leque de características mecânicas, permitindo a produção de estruturas temporárias com propriedades elásticas controláveis (Gogolewski e Gorna, 2007), como foi anteriormente mencionado.

Chia *et al.*, (2006) refere os polímeros candidatos a periósteo artificial formados por ácidos polihidroxi e por poliuretanos, sendo estes últimos particularmente interessantes, uma vez que podem ser produzidos com controlo das propriedades elásticas que conferem uma maleabilidade e suturas fáceis.

Num estudo de Hill *et al.*, (2005) foram implantadas no tecido subcutâneo de ratos “nude”, estruturas de poliuretano às quais foram adicionados osteoblastos, e quer os exames radiográficos, quer as secções histológicas, demonstraram a promoção significativa da formação óssea dentro das próprias estruturas ao fim de cinco semanas. Ao fim deste período, a maioria do material de poliuretano já tinha sido reabsorvido. No mesmo trabalho, para além da presença de uma quantidade significativa de osso neoformado imaturo e entrançado, a maioria das áreas encontrava-se povoada com células, sobretudo células cartilaginárias, indicando um processo de ossificação endocondral. Pode também criar-se um ambiente osteoindutivo ao impregnar o material de suporte com medula óssea ou plasma rico em plaquetas (Gorna e Gogolewski, 2006).

O poliuretano é assim um material com características que o tornam um promissor candidato ao substituto ósseo dos actualmente existentes, com características próximas do ideal. Pode ser utilizado cirurgicamente em ortopedia como substitutos ósseos na forma de esponjas, membranas microporosas ou ainda, numa forma não porosa, como barreiras de adesão.

O poliuretano alifático utilizado foi produzido utilizando 1,4:3,6-dianhidro-D-sorbitol (“isosorbide”) como extensor da cadeia para a produção de poliuretano biodegradável uma vez que este composto foi considerado particularmente promissor para este tipo de aplicações biomédicas (Gorna e Gogolewski, 2003). O “isosorbide” e os seus derivados são farmacologicamente activos como vasodilatadores (Capper *et al.*, 2003) e como agentes promotores da formação de osso (Jamal *et al.*, 2004). Especula-se que a incorporação desta molécula na estrutura posterior da cadeia de poliuretano possa originar um material com actividade biológica acrescida, sobretudo por ter permeabilidade aumentada da membrana celular (Jamal *et al.*, 2004). É também certo que este tipo de estrutura de poliuretano poroso elastomérico tem um efeito promotor de adesão e

proliferação de determinado tipo específico de células, estimulando assim o seu potencial reparativo e regenerativo. Assim utilizados como substituto do osso esponjoso, estes materiais de suporte baseados em “isosorbide”, poderão promover a regeneração óssea (Gorna e Gogolewski, 2006).

Outros trabalhos demonstraram também que esponjas tridimensionais porosas e membranas microporosas de poliuretano permitiram a adesão, crescimento e proliferação de condrócitos de bovino (Grad *et al.*, 2003; Grad *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005; Chia *et al.*, 2006). Estes estudos preliminares em modelo animal e em cultura de células, sugerem que estruturas de poliuretanos à base de “isosorbides” biodegradáveis podem de facto ser promissores candidatos a substitutos de osso esponjoso e como substitutos para reparação das cartilagens articulares (Gorna e Gogolewski, 2006).

Um problema recorrente da utilização de produtos sintéticos prende-se com a sua possível toxicidade uma vez que são produtos que por degradação podem produzir “by products” ácidos, como anteriormente mencionado, desencadeando uma reacção inflamatória que pode perturbar a regeneração óssea. Este problema foi equacionado e eliminado uma vez que no substituto de poliuretano tridimensional elastomérico que utilizámos foram efectuadas análises de toxicidade. Em trabalhos de Gogolewski *et al.*, (2008) aplicando estudos *in vitro* de citotoxicidade MTT, foi demonstrada a ausência de toxicidade deste composto de poliuretano. Estes resultados estão em boa correlação com os dados de um estudo paralelo *in vivo*, onde os mesmos materiais de suporte foram semeados com osteoblastos e implantados no músculo de ratos *nude* e demonstraram boa biocompatibilidade e promoveram neoformação óssea (Hill *et al.*, 2005).

As quantidades de citocinas pró- e anti-inflamatórias, Interleucina-6 e Interleucina-8, libertadas por leucócitos de sangue humano em contacto com este composto em concreto, foram semelhantes ou inferiores ao grupo controlo de leucócitos expostos ao poliestirene (“polystyrene”). Os ensaios colorimétricos MTT medem a actividade metabólica de células viáveis neste caso leucócitos, cultivadas em presença do material a testar. Estes ensaios baseiam-se na habilidade do enzima mitocondrial di-hidrogenase de células viáveis, em clivar os

anéis de tetrazolium do MTT amarelo pálido para formarem um sal de formazan azul-escuro insolúvel em água. Este formazan intracelular é então solubilizado e quantificado por espectrofotometria. A quantidade de corante formazan gerada pelas di-hidrogenases nas células é directamente proporcional ao número de células viáveis. Quanto mais elevado for o número de células sobreviventes, menos tóxico será o material.

Em contraste com os ácidos polihidroxi e segundo Gombotz e Pettit (1995), os poliuretanos são degradados via erosão de superfície sem produção de produtos de degradação ácidos, o que é obviamente uma vantagem acrescida.

De acordo com Guelcher (2008) os PU biodegradáveis são concebidos para sofrer degradação hidrolítica ou enzimática *in vivo* para produtos não citotóxicos. Este mesmo autor refere um estudo utilizando Artelon® para reconstrução de ligamento cruzado anterior em que também foi estudada a decomposição dos PU e aos 24 meses após a implantação, embora tenham sido identificados macrófagos e células gigantes de corpo estranho junto da superfície do implante, não foi observada qualquer reacção adversa da articulação nem sinais macroscópicos de inflamação.

Spaans (2000) citado por Minnen *et al.*, (2008) demonstrou que os efeitos a longo prazo dos PU biodegradáveis não são preocupantes dado que no seu estudo *in vivo* este produto se degrada em produtos que ocorrem naturalmente no organismo. Minnen *et al.*, (2008) demonstrou que ao fim de 18 meses não é possível localizar nos gânglios linfáticos adjacentes ao local de implantação subcutânea de PU, macrófagos contendo resíduos deste polímero. Após 24 meses, 30 meses e 36 meses, apenas se conseguem localizar macrófagos simples contendo produtos de degradação dos PU no local da implantação.

A susceptibilidade dos poliuretanos à degradação pode ser aumentada mediante a incorporação, na cadeia polimérica, de vários fragmentos lábeis sensíveis à hidrólise e/ou à acção enzimática. Como em qualquer polímero, o tipo de monómeros utilizados na síntese do poliuretano estará dependente em grande medida do objectivo da aplicação do referido material. Os poliuretanos hidrofílicos serão preferíveis na preparação de implantes em contacto com sangue ou

barreiras de adesão e materiais mais hidrófobos podem ser úteis em substitutos de osso esponjoso e para culturas celulares (Gorna e Gogolewski, 2000; Gorna e Gogolewski 2001).

Segundo Gogolewski *et al.*, (2006) a movimentação de tecidos contíguos e em contacto com implantes poliméricos bio-absorvíveis, sólidos ou porosos, acelera a degradação de superfície nos mesmos. Este problema pode ser evitado de duas formas: os implantes de poliuretano podem ser cobertos com membranas microporosas colocadas a cobrir o defeito ósseo e consequentemente o implante, ou alternativamente construindo estruturas de poliuretano de forma a que a camada de superfície seja de um poliuretano mais resistente à degradação do que o resto da estrutura. A estratégia por nós adoptada foi a de colocar uma membrana microporosa.

1.8. Membranas osteopromotoras:

A utilização de membranas poliméricas data dos anos sessenta e implica a colocação de uma barreira em forma de membrana a isolar o defeito ósseo, proporcionando assim um espaço “fechado” de forma a que a regeneração óssea ocorra sem interposições, evitando que tecidos moles e outras células penetrem no local do defeito interferindo com a osteogénese (Linde *et al.*, 1993).

Dahlin *et al.* (1988) concluiu que os diferentes componentes celulares têm taxas de migração diferentes para as áreas de regeneração, daí que tenha surgido a técnica de utilizar uma membrana protectora de forma a exercer um controlo programado no processo de regeneração óssea.

Estas membranas desempenham a importante função de interface entre o defeito ósseo e os tecidos circundantes. O facto da membrana poder ser perfurada, para além de impedir a entrada de tecidos moles para o defeito ósseo permitindo assim a regeneração, permite também a difusão de fluido intersticial em ambos os sentidos. Por outro lado a presença da membrana quando é aplicada sobre um substituto ósseo tem também a função de evitar a reabsorção excessiva, permitir uma adequada vascularização e nutrição deste a partir dos tecidos circundantes mantendo, simultaneamente, o substituto ósseo no local desejado e

promovendo um substrato para células osteogénicas (Gugala e Gogolewski, 1999).

Refira-se que o interesse em utilizar uma membrana perfurada se impõe dado que em estudos de Hedner e Linde (1995) quando utilizaram uma não perfurada, este facto só por si impediu a degradação do material que se utilizou como veículo, podendo reduzir fortemente a disponibilidade da substância osteoindutora aí contida. Estes estudos foram feitos com o objectivo de provar a eficácia de BMP, associadas a membranas osteopromotoras de politetrafluoretileno (PTFE) não perfuradas, verificou-se que apesar dos resultados anteriores que apontavam para uma que a preparação de BMP fosse fortemente osteoindutora, nas preparações de BMP com as referidas membranas, os resultados não foram para além dos resultados dos grupos em que se utilizaram as membranas isoladamente, o que sugere que a presença da membrana de PTFE (não porosa) possa ter impedido a degradação do colagénio, reduzindo fortemente a biodisponibilidade da BMP.

Deve notar-se que as funções das diferentes membranas no processo da regeneração óssea podem diferir dependendo da dimensão e tipo de defeito tratado, da sua localização e mesmo da espécie utilizada como modelo animal (Gogolewski *et al.*, 2000).

A utilização destas membranas dependendo da sua natureza, pode apenas implicar o crescimento do tecido ósseo ao longo da superfície da estrutura implantada, o que, para este caso específico de crescimento ósseo foi designado por crescimento ósseo guiado (COG ou GBR) ou regeneração óssea guiada (ROG ou GBR). Esta técnica, originalmente empregue para restaurar a adesão dentária em pacientes com periodontite (Nyman *et al.*, 1982), foi nos últimos dez anos alargada a toda a medicina regenerativa, em particular à ortopedia.

As primeiras membranas a serem utilizadas eram membranas não reabsorvíveis de politetrafluoretileno (PTFE) e foi sobre estas que mais estudos incidiram. Entre eles foram publicados estudos animais e clínicos com resultados satisfatórios de produção de osso (Reedy *et al.*, 1999).

As membranas utilizadas poderão ser não reabsorvíveis como o PTFE acima referido, ou reabsorvíveis. Estas últimas têm obviamente como mais valia o facto de uma eventual reacção de corpo estranho se ir atenuando à medida que a

reabsorção se processa.

Dentro das membranas biodegradáveis é preferível a utilização de membranas que desempenhem não só a referida função de interface, mas também o facto de poder ter em si próprias propriedades osteogénicas. Estudos de Hollinger (1983), de Schmitz e Hollinger (1988), de Gogolewski *et al.*, (2000) e de Martina e Hutmacher, (2007) indicam que os poliésteres alifáticos e os ácidos poliglicólicos (PGA), polilácticos (PLA), poli L-lácticos, poli-D, L-lácticos (PDLA) e co-polímeros dos ácido láctico e glicólico podem ter potencial osteogénico *per se* (Martina e Hutmacher, 2007).

Song *et al.*, (2007) propôs a aplicação de um sistema composto de membranas de colagénio-apatite 20 e 40%, respectivamente, quando organizado numa nanoescala. As razões desta proposta prenderam-se com o facto de quer a apatite quer o colagénio serem os elementos prevalecentes da componente mineral e orgânica do osso, respectivamente, resultando num sistema de composição muito semelhante a este último. Estas membranas demonstraram propriedades mecânicas acrescidas (dureza e resistência à tracção) e maior estabilidade enzimática quando comparadas com estruturas de colagénio puro.

As características das membranas (dependentes da sua composição) como a susceptibilidade à degradação, progresso da degradação do implante, a taxa de libertação e “clearance” dos eventuais produtos de degradação acídicos, podem afectar o processo de regeneração óssea, podendo mesmo inibi-la ou estimulá-la (Gogolewski *et al.*, 2000).

As células inflamatórias recrutadas pelas membranas de determinada natureza química podem mesmo ser em parte responsáveis pela acção inibidora desenvolvida pela fibronectina e pelos efeitos de quimiotaxia desta substância sobre os fibroblastos e na deposição de colagénio. Desta forma a neoformação óssea está dependente deste efeito protector físico das membranas nas fases iniciais da regeneração óssea, limitando o acesso a estas células (Lim *et al.*, 2000).

No nosso estudo a membrana utilizada foi produzida por um processo de fase inversa (Gogolewski e Pennings, 1983) tendo como matéria-prima o ácido

poli(L/DL láctico) 80/20. A membrana utilizada era microporosa, sendo o diâmetro dos poros de 100 a 150 µm.

Do ponto de vista da eventual capacidade inflamatória desta membrana e num estudo de Gogolewski *et al.*, (2000) com uma membrana de composição idêntica e no grupos tratados, não se observou qualquer indicação de alterações patológicas provocadas pelo ensaio e não foi encontrado material polimérico nos linfonodos.

1.9 Perspectivas futuras:

Estratégias osteoindutivas – A produção de tecido ósseo junto de células-alvo, células osteoprodutoras: factores de crescimento, citocinas, BMP.

Estratégias osteogénicas – A célula utilizada com este fim diferencia-se ela própria numa célula produtora de tecido ósseo: medula óssea, plasma rico em plaquetas.

Estratégias compostas – resulta de várias combinações possíveis entre as estratégias osteoindutiva, osteogénica e osteocondutora.

Como se sabe tem sido percorrido um longo caminho com a utilização de inúmeras estruturas de suporte e, nenhuma deles reúne as características do material ideal. Assim, uma das soluções promissoras e emergentes poderá advir de um substituto resultante da combinação de duas ou mais soluções, ou seja um substituto composto que contenha células bioactivas e osteogénicas numa matriz sintética osteocondutora. A abordagem mais eficaz pode passar por “semear” o material de suporte *ex vitro*, com células autólogas e posteriormente utilizar estas estruturas “semeadas” como implantes. Estas soluções compostas compensam ou reforçam, respectivamente, as desvantagens e vantagens de um e de outro biomaterial (Bloemers *et al.*, 2003).

Um exemplo de estrutura de suporte composta foi apresentado por Khan *et al.*, (2004) com a utilização de um compósito com polímeros biodegradáveis como o ácido poli(glicólico) ou ácido poli(láctico) e cerâmicas de fosfato de cálcio. Desta forma obteve-se uma melhor manipulação do material e controlo da sua estrutura macro e microscópica, na modelagem destas estruturas de forma a se poderem

adaptarem de forma mais adequada aos defeitos ósseos. Nos estudos desta autora com compósitos de hidroxiapatite e ácido poli(D, L-láctico e glicólico), produzidos pelos métodos de formação de gás e dissolução selectiva de partículas de sacrifício em ratos atímicos, estas estruturas demonstraram, *in vivo* e *in vitro*, um potencial osteogénico, assim como propriedades mecânicas satisfatórias. Uma outra das estruturas testadas foi uma gelatina em hidrogel que permitiu manter os factores de crescimento imobilizados através de ligações electrostáticas com as moléculas de gelatina. Estes factores poderão libertar-se à medida que a estrutura for sendo degradada. Comparativamente à matriz de colagénio a gelatina tem como vantagem ter um processo de extracção e preparação mais fácil, o que resulta numa produção de matriz mais barata e de qualidade superior. Por outro lado e em condições fisiológicas, a gelatina ao contrário do colagénio, não expressa antigenicidade (Sela e Arnon, 1960, citados por Rohanizadeh *et al.*, 2007).

Obviamente que para as estratégias propostas, a forma mais simples seria a colocação directa do factor ou célula seleccionada(o) em solução no local do defeito ósseo directamente, não recorrendo a um veículo. Isto não é eficaz dada a existência de uma rede vascular que difunde rapidamente a substância em questão para longe do local onde deveria actuar. Estes factores ou células poderão também ser sujeitos a digestão enzimática ou mesmo a desactivações (Hokugo *et al.*, 2007).

Na maioria dos casos é assim necessário recorrer a veículos de transporte e suporte destes factores. Assim, e independentemente do tipo de molécula ou factor utilizada(o) existem, teoricamente, três possibilidades que permitem a imobilização destas moléculas bioactivas no local pretendido: a) uma ligação covalente através de um processo químico que não altere a actividade biológica da proteína imobilizada (Jennissen 2002); b) uma ligação não covalente de factores de crescimento através de moléculas específicas (moléculas tipo-heparina) imobilizadas à superfície da estrutura temporária (Maire *et al.*, 2005); c) o aprisionamento dos factores de crescimento em veículos de entrega e libertação dos mesmos, durante o processo de degradação da estrutura temporária (Uludag

et al., 2001).

Pelos factos acima mencionados, o conceito base para que estas estratégias possam ser eficazes é a obtenção de um veículo de transporte e libertação *in situ* de uma substância osteoindutora ou mesmo osteogénica que induza ou produza a formação de osso. Será então o receptor que originará o seu próprio tecido ósseo em resposta ao factor osteoindutor ou osteogénico. O veículo ou sistema deverá ser cirurgicamente conveniente, permanecer estável no local em que é implantado, permitir o crescimento ósseo no local do defeito e ser capaz de libertar as substâncias que transporta, imediatamente ou de forma retardada. A libertação destas mesmas substâncias, poderá ocorrer isoladamente ou em conjunto, caso veicule mais do que uma e de acordo com o efeito pretendido.

Estes materiais de suporte sintéticos enriquecidos, ao contrário das simples “cápsulas” de libertação de qualquer fármaco que apenas controlam a sequência de tempo na libertação da referida substância, permitem uma melhor localização para a libertação desta substância, quer no tempo, quer no espaço. Por exemplo, os factores de crescimento veiculados pelos materiais de suporte são assim mais susceptíveis de se manterem nos locais de crescimento ósseo, isto é, nos poros da própria estrutura. Por outro lado nas cápsulas de transporte, a substância pode ser libertada por um período de tempo demasiado extenso ao passo que com este tipo de estruturas, a libertação é gradual visto que o estímulo biológico (do osteoindutor) se faz à medida que a própria estrutura é reabsorvida. Este facto permite que o factor de crescimento seja aplicado de forma contínua e gradual à medida que o calo ósseo também aumenta, o que do ponto de vista da sequência cronológica se traduz numa temporização adequada. Segundo Carson e Bostrom (2007), os benefícios obtidos com este tipo de estrutura são como um produto “2 em 1”: em primeiro lugar maximiza a potência deste produto biológico na medida em que o concentra no local da área onde se dá a regeneração e em segundo lugar, permite que a margem onde ocorre a libertação do factor de crescimento avance ao longo da estrutura de suporte, favorecendo assim, o crescimento do calo ósseo.

1.9.1 Terapia genética

A terapia genética envolve a incorporação de genes específicos ou transgênicos em células com o intuito de alterar a sua função biológica. Normalmente utilizam-se vectores virais (adenovírus, herpesvírus e retrovírus) ou não virais. Nos vectores virais estes são submetidos a processos de engenharia destinados a impedir a sua replicação (Mroz *et al.*, 2003).

Na terapia genética poderemos actuar de duas formas distintas: poderá substituir-se uma porção do genoma pelo ADN terapêutico que será incorporado no ADN cromossómico, expresso em replicação e alterando o genótipo das células descendentes, ou poderá permanecer independente, sob a forma de um epissoma (adenovírus e vírus herpes simplex) infectando todas as células, replicantes ou não, sem modificar o genótipo das células descendentes (Scaduto e Lieberman, 1999). Desta forma poderá regular-se a duração da síntese proteica pretendida.

A utilização de vírus é quase obrigatória na medida em que estes para assegurar o seu ciclo de vida, têm que necessariamente expressar os seus ácidos nucleicos, libertando assim os genes osteogénicos “manipulados”. As células transplantadas diferenciar-se-ão de acordo com o próprio factor de crescimento secretado e do micro-ambiente que as envolve (Doll *et al.*, 2001).

São aplicáveis no tratamento de patologias genéticas com defeitos genéticos específicos, em que se pretende a substituição do gene eliminado ou a inserção de um gene ou ainda, aumentar a produção de determinada proteína específica. Pode mesmo perspectivar-se a inclusão de factores de crescimento dentro do genoma de vírus atenuados, podendo estes assim promover a produção de factores osteogénicos. Estes procedimentos podem ser feitos com a libertação *in situ* por manipulação genética da célula hospedeira alvo ou mesmo por via sistémica (Boden, 2000).

É fundamental que se conheça o período de tempo normal da expressão dos genes que participam na regeneração óssea para que esta informação seja tida em conta na programação do design das estruturas de suporte. Os perfis de degradação terão que ser pré-determinados de forma a controlar uma sequência de libertação dos produtos genéticos identificados como essenciais para a regeneração óssea (Dickson *et al.*, 2007).

Boden (2000) apresentou um estudo experimental de coelho sobre artrodese postero-lateral da coluna vertebral utilizando terapia genética com sucesso: a identificação, a clonagem e a sequenciação de um ADN complementar (cADN) codificando a proteína intracelular LMP-1 expressa nas primeiras horas de diferenciação osteoblástica, foi capaz de induzir vários tipos de BMPs, os seus receptores e outros factores de crescimento, obtendo-se fusão vertebral em 100% dos casos (nove animais em nove). Neste estudo foram implantadas células de medula óssea transfectadas *ex vivo* por um vector não viral, um plasmídeo com cADN codificando a LMP-1, num lipossoma. Nos locais de controlo sem LMP-1, não se obteve qualquer formação óssea.

Uma outra abordagem possível com vista à promoção da formação óssea, utiliza também o princípio da terapia genética mas, neste caso, a estrutura de suporte temporário é o próprio veículo de entrega de genes que codificam para determinado factor de crescimento. As células implantadas em contacto com a superfície do material integrarão o ADN actuando assim como bioreactor local *in vivo*, segregando proteínas codificadas em plasmídeos que estimulam a reparação tecidual e a regeneração e de forma transitória, uma vez que o ADN plasmídico (transfectado) não será incluído no genoma (Bonadio, 2000) Estas matrizes geneticamente activadas têm, comparativamente às matrizes simples cobertas com factores de crescimento, a vantagem de serem específicas relativamente à molécula imobilizada, terem custos de produção baixos e a capacidade de modular o padrão de expressão dos factores de crescimento dado a escolha extremamente específica do promotor que se associa ao gene de interesse (Logeart-Avramoglou *et al.*, 2005).

A utilização da terapia genética tem também como vantagem, face a outras alternativas osteoindutivas, colmatar o problema das elevadas doses de factores de crescimento necessárias quando estes são utilizados de forma isolada.

1.9.2. Endocultura/Engenharia tecidual endógena

Esta estratégia utiliza o próprio organismo como bioreactor. A utilização de um bioreactor pode ter como vantagem adicional o facto de apenas num acto

cirúrgico poderemos fazer a colheita de células, a sementeira das mesmas na estrutura temporária e a sua implantação.

Warnke *et al.*, (2006) utilizou uma estrutura de suporte pré-fabricada, contendo os biomateriais implantados e os factores de crescimento adequados que foi colocada num local extra-esquelético como o músculo vasto dorsal de forma a obter um transplante vitalizado adequado à reparação do defeito (Warnke *et al.*, 2004). Este auto-transplante, uma vez observada a neoformação óssea no seu interior, foi posteriormente implantado com sucesso no local do defeito ósseo a reparar.

Num estudo de Stevens *et al.*, (2005) com coelhos neo zelandeses, foi injectada uma solução de soro fisiológico entre a tíbia e o perióstio criando uma pequena cavidade artificial, bioreactor, repleta de fluido. De forma a prevenir o colapso desta mesma cavidade e à medida que o soro ia sendo absorvido pelo organismo, foi injectado um gel contendo alginato (composto rico em cálcio o qual auxilia e atrai células do perióstio) promovendo a sua diferenciação em osso neoformado. Ao fim de seis semanas, observou-se o preenchimento total da cavidade artificial com osso neoformado, maioritariamente por ossificação intramembranosa. Este osso foi posteriormente transplantado com sucesso para locais onde estava em falta, servindo assim de local dador iatrogénico, utilizando o próprio organismo como bioreactor. Nos locais receptores, ao fim de seis semanas, o osso neoformado estava totalmente integrado, não havendo sinais de aparente morbilidade no local dador.

O conceito de engenharia tecidual endógena foi introduzido por Elshahat *et al.*, (2005) num estudo realizado em coelhos, em que o perióstio a nível do ilíaco foi cirurgicamente elevado e retirada ou perfurada uma porção da cortical. A cavidade assim criada foi preenchida com uma esponja absorvível, com ou sem membrana, que promoveu a obtenção de osso autólogo neoformado na forma e volume pretendidos e que poderá ser utilizado como substituto noutras zonas do corpo. Esta técnica apenas depende da integridade do perióstio e da sua adequada vascularização, servindo o próprio perióstio como barreira natural para ROG. O suprimento sanguíneo e o acesso de células osteogénicas é assegurado

pelas perfurações do osso cortical do ilíaco (Weng *et al.*, 2000).

1.9.3. Utilização de proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs)

As BMPs foram descobertas em 1965 por Marshall Urist, como foi já mencionado anteriormente, e são membros da super família de factores β de transformação do crescimento (TGF- β). Este conjunto de factores de crescimento compreende proteínas codificadas por uma sequência de 45 genes cuja característica é conservar 7 motivos de cisteína no seu domínio maduro. Esta super família contém: 5 isoformas de TGF- β (de 1-5), as BMPs, factores de crescimento de diferenciação (GDFs), activinas, inibinas e substância de inibição de Mullerian.

Trata-se de moléculas diméricas, com duas cadeias polipeptídicas, (idênticas ou não, sendo activa das duas formas) unidas por uma ponte disulfídica. A sua estrutura primária é em 40 a 50% idêntica à molécula de TGF- β , sendo a dimerização um pré-requisito para a indução óssea (Granjeiro *et al.*, 2005).

Segundo Griffith *et al.*, (1996) e Granjeiro *et al.*, (2005) as BMPs constituem o maior subgrupo incluído na super família de TGF- β . São sintetizadas e armazenadas no citoplasma como grandes proteínas diméricas e clivadas por proteases durante a secreção. A estrutura das BMPs melhor estudada é a da OP-1, tratando-se de um polipéptido que contém 431 aminoácidos de conformação dimérica com duas cadeias polipeptídicas ligadas entre si por uma única ponte disulfídica, com uma estrutura primária com cerca de 40-50 aminoácidos de semelhança com a TGF- β .

De acordo com Sakou (1998) e Termaat *et al.*, (2005) existem já 18 moléculas homólogas das BMPs, embora só 15 estejam identificadas na espécie humana.

São verdadeiros morfogenes pleiomórficos dado intervirem nos três pontos-chave da cascata da osteogénese: quimiotaxia e mitose, diferenciação em cartilagem e posterior substituição por osso. Adicionalmente regulam a hematopoiese, estimulam a síntese da matriz extracelular, e influenciam a manutenção da sobrevivência celular e apoptose (Reddi, 2001).

As BMPs estimulam as células mesenquimatosas a proliferarem e a diferenciarem-se em condrócitos. Esta transformação leva cerca de 5 a 7 dias e é seguida de uma invasão capilar. Os condrócitos sofrem posteriormente uma hipertrofia e calcificam-se, dando origem aos osteoblastos. O osso neoformado é observado ao fim de 9 a 12 dias, seguindo-se a remodelação e formação de osso dentro dos catorze a vinte e um dias subsequentes. Este processo é semelhante à regeneração óssea endocondral. Os estudos *in vitro* de Sampath e Reddi (1981), Wozney (1993) citado por Vaibhav *et al.*, (2007) e Sampath (1994), citado por Vaibhav *et al.*, (2007) demonstraram que um processo semelhante à regeneração intramembranosa também se verifica mas com concentrações elevadas de BMP.

As BMPs regulam vários aspectos do desenvolvimento embrionário como a formação de cartilagem e osso, a estrutura e padrão da mesoderme, o desenvolvimento craniofacial e dos membros, assim como a formação pós-natal de osso. Estes resultados são obtidos através da regulação do crescimento, diferenciação e apoptose de vários tipos de células, incluindo células mesenquimatosas, osteoblastos, condroblastos, células neurais e epiteliais (Sakou, 1998; Termaat *et al.*, 2005; Wan e Cao, 2005). Estas substâncias actuam de forma autócrina ou parácrina (Lieberman *et al.*, 2002).

As BMPs têm outras acções para além dos conhecidos efeitos ósseos que foram demonstrados num estudo de Reddi (2001) em ratos BMP-2 “null” que apresentavam defeitos no desenvolvimento cardíaco: a BMP-7 desempenha um papel crítico no desenvolvimento do olho e do rim. Este autor diz mesmo que o seu efeito é tão vasto que deveriam ser designadas “Body Morphogenetic Proteins” e não apenas “Bone Morphogenetic Proteins”.

Segundo Rosen *et al.*, (1990) citado por Heckman *et al.*, (1999) o factor β de transformação do crescimento quando implantado ortotopicamente desencadeia a formação de osso mas estes efeitos osteoindutivos não se observam se for implantado heterotopicamente. Este mesmo factor faz com que as células mesenquimatosas se diferenciem em condrócitos (Seyedin *et al.*, 1986) e estimulem os condrócitos a iniciarem o caminho da ossificação endocondral (Boyan *et al.*, 1999). Segundo Heckman *et al.*, (1999) estes factos sugerem que o

TGF- β pode actuar em sinergia com as BMPs, potenciando os efeitos destas, por exemplo em situações de não-união óssea.

O TGF- β quando implantado isoladamente numa estrutura de suporte não desencadeia o processo de reparação óssea. Esta ausência de resposta pode estar ligada a uma baixa dose deste factor, a uma libertação com um “timing” não adequado (quando o ambiente celular envolvente não estava ainda preparado para responder), à inactivação deste mesmo factor por factores locais como pH alterado ou a uma rápida eliminação de TGF – β pela corrente sanguínea.

Heckman *et al.*, (1999) observou que a espécie animal em que é aplicado o tratamento é relevante quanto à eficácia da utilização das BMPs, pois no modelo canino de não-união exposto à proteína morfogenética bovina não se observou regeneração, ao passo que neste mesmo modelo houve uma significativa formação óssea quando exposto à proteína morfogenética canina. O modelo canino mimetiza a situação clínica de não-união crónica em humanos. O osso de bovino que serviu de base à preparação da proteína morfogenética bovina foi desmineralizado pelo que, teoricamente, o material antigénico foi removido. Contudo o próprio processo de desmineralização pode ter criado uma alteração química na estrutura da matriz bovina que pode ter sido reconhecida pelo cão.

Embora a eficácia experimental destes elementos biológicos seja muito promissora no tratamento de defeitos ósseos críticos, *in vivo* a resposta é muito variável. A sua aplicação de rotina tem sido dificultada pelas elevadas concentrações necessárias para produzir efeito clínico. A sua eficácia custo/benefício tem sido uma permanente preocupação. Por outro lado os implantes utilizados actualmente no tratamento dos defeitos ósseos não são ainda desenhados de forma a actuar de forma sinérgica com estes elementos para que expressem, de forma plena, as suas potencialidades biológicas (Gugala *et al.*, 2007).

De acordo com Granjeiro *et al.*, (2005) foi possível identificar antagonistas das BMPs, “chordin” e “noggin”, bem como membros da família DAN (exemplo: “gremlin”). Estes antagonistas têm a mesma afinidade que as BMPs para os receptores, bloqueando assim a transdução do sinal e diminuindo a formação de

osso. Estas substâncias poderão ser utilizadas de forma terapêutica em condições patológicas caracterizadas pela formação excessiva de osso (Gripe *et al.*, 2002).

1.9.3.1. Modo de acção das BMPs

Segundo Vasilhas *et al.*, (2007) as BMPs exercem o seu efeito através da activação de um complexo de receptores transmembranários do tipo I e II. A especificidade dos sinais intracelulares é determinada sobretudo pelos receptores do tipo I. As BMPs ligam-se a três tipos distintos de receptores do tipo I chamados receptores-quinase de activina, ALK-2, ALK-3 e ALK-6, também designado por BMPR-IB (Miyazono *et al.*, 2005 citado por Vaibhav *et al.*, 2007).

Relativamente aos receptores do tipo II, as BMPs ligam-se a três tipos distintos: BMP receptor tipo II (BMPR-II), receptor tipo II activina (ActR-II) e receptores tipo IIB activina (ActR-IIB). Os receptores quinase activados fosforilam os factores de transcrição Smad 1, 5 e 8. Estes Smads fosforilados formam então um complexo heterodimérico com o Smad 4 no núcleo e activam a expressão dos genes-alvo. Os Smads são sinalizadores intracelulares, regulam a transcrição dos genes alvo no núcleo, ligando-se directamente a sequências específicas de ADN, interagindo com outras proteínas ligadas a este e recrutando co-activadores e co-repressores transcripcionais (Massagué, 1998; Wozney, 1998). Uma vez activados são translocados ao núcleo onde participam na regulação transcripcional de genes envolvidos na formação de cartilagem e osso

As BMPs estão dependentes de determinado limiar de concentração, o que pode tornar crítica a sua actuação em ambientes localizados. Sofrem também variações de acordo com o micro-ambiente que as envolve. As baixas concentrações de BMPs *in vitro* promovem a diferenciação de células mesenquimatosas em adipócitos, ao passo que concentrações elevadas promovem a diferenciação osteoblástica. Este facto fortalece a importância do conhecimento da dose terapêutica adequada (Carrington *et al.*, 1991).

1.9.3.2. Produção das BMPs

As BMPs são produzidas *in vitro* de forma rotineira utilizando a tecnologia do ADN recombinante, dando origem a grandes quantidades de proteína pura

(Jovanovic *et al.*, 2007). São contudo necessárias doses elevadas de matriz desmineralizada para produzir alguns microgramas de BMPs. De acordo com Granjeiro *et al.*, (2005) a purificação das BMPs a partir da matriz desmineralizada pode ser obtida por: digestão enzimática dado que resistem à collagenase; extracção por etileno glicol dada a natureza hidrofóbica da molécula de BMP; separação através da utilização de uma solução de 6 M de ureia com 0,5 M de CaCl_2 , dado que as BMP's podem ser dissociadas de outras proteínas não colagénicas por em solventes caotróficos; cromatografia específica (Concanavalina A) dada a sua natureza hidrofóbica e pelo facto de possuírem carboidratos na sua estrutura).

Todos estes processos são extraordinariamente laboriosos e com resultados pouco compensadores, daí que nos últimos anos se tenha apostado pelas técnicas de biologia molecular de clonagem e expressão destas proteínas (Granjeiro *et al.*, 2005).

1.9.3.3. Efeitos indesejáveis devido ao uso das BMPs

Em estudos pré-clínicos foi observado que as BMPs são relativamente seguras quanto a efeitos adversos e carcinogénicos, mas são necessários mais estudos de forma a clarificar a sua capacidade para formar osso ectópico antes de as utilizar em larga escala em humanos (Vaibhav *et al.*, 2007). Existem estudos pré-clínicos de Soda *et al.*, (1998) e de Orui *et al.*, (2000) que demonstraram que BMPs têm um efeito inibitório sobre o osteosarcoma humano da próstata, pulmão, mama e da língua. Relativamente à sua toxicidade local e sistémica existem também vários estudos pré-clínicos em que as BMPs sempre demonstraram um excelente perfil de segurança (Orui *et al.*, 2000).

Em estudos pré-clínicos realizados por Poynton e Lane (2002) e Walker e Wright (2002) a injeção directamente na corrente sanguínea de doses elevadas de BMP2 recombinada (5,3 mg/kg) não provocou efeitos adversos, o que poderá estar relacionado com a sua semi-vida extremamente curta. Nas administrações locais o nível sérico máximo é cerca de 0,1% do total implantado, sendo este eliminado rapidamente através da corrente sanguínea.

Outro risco da utilização destas substâncias é uma indução de formação óssea excessiva no local da aplicação ou indução ectópica de osso (Boden *et al.* 2002; Vaccaro *et al.*, 2003).

Em resumo, embora com a maioria dos estudos experimentais se tenham obtido resultados promissores, há dois factores importantes a ter em conta que são o tempo ideal de administração da substância e a dose efectiva adequada a ser administrada. Estes dois factores podem influenciar o efeito exercido por qualquer uma das substâncias (Giannoudis *et al.*, 2007.a).

1.9.3.4. Estruturas de transporte e suporte das BMPs

Dado o osso ser uma estrutura extremamente vascularizada as estruturas de transporte e suporte das BMPs devem permitir a angiogénese para o seu interior, deverão também ser fáceis de manusear, terem um baixo custo de produção, poderem ser fabricadas em larga escala e poderem ser esterilizadas e armazenadas em condições estáveis (Seeherman e Wozney, 1997, citados por Vaibhav *et al.*, 2007).

De acordo com Vaibhav *et al.*, (2007) a matriz de transporte e suporte das BMPs deverá desempenhar uma função tripla: manter um limiar de concentração crítico no local de implantação durante o período pretendido (distribuição temporal); permitir que as estruturas sirvam de matriz para a infiltração celular mas mantendo espaço ou volume no qual deverá ocorrer a regeneração; manter as BMPs no local e impedir assim a formação ectópica de osso (confinamento espacial).

A configuração óptima da estrutura de transporte das BMPs está dependente do tipo de tecido e das necessidades de suporte mecânico do tecido que se pretende regenerar (Itoh *et al.*, 1998; McKay e Sandhu, 2002; den Boer *et al.*, 2003; Seeherman e Wozney, 2005).

De acordo com Cancedda *et al.*, (2007) as BMPs têm uma natureza química instável o que obriga a condições específicas de incorporação destas moléculas no interior das suas estruturas de suporte para que não se libertem antes da obtenção do efeito desejado.

De acordo com Vaibhav *et al.* (2007) foram até à data, aprovadas pela FDA para uso clínico, dois tipos de aplicações enriquecidas com BMPs:

- Esponjas absorvíveis de matriz colagénio tipo I com rhBMP-2. Esta aplicação tem aplicações específicas;².

- Uma composição de OP-1 (rhBMP-7) numa matriz de colagénio bovino combinada com carboximetilcelulose. Esta aplicação, aprovada pela FDA, tem aplicações específicas como substituto de enxertos ossos autólogos (Cancedda *et al.*, 2007).³

1.9.3.5. Utilização de BMPs

Johnson *et al.*, (1988) foi pioneiro na utilização das BMPs para tratamento com sucesso de uma não-união femoral. Depois disso têm sido realizados numerosos ensaios pré-clínicos e clínicos de enxertos compostos com BMPs com resultados muito variáveis. No entanto naqueles onde foram utilizados os BMP-2 e BMP-7 inseridos numa estrutura de suporte osteocondutora, obtiveram-se resultados muito promissores do ponto de vista da sua capacidade osteoindutora (Giannoudis *et al.*, 2005).

Existem vários estudos e ensaios clínicos sobre a capacidade das BMPs acelerarem a consolidação de fracturas recentes, sobretudo relativamente à BMP-2 e à BMP-7. Nos ensaios clínicos em tibia de ovelha, ulna de coelho e fémur de rato, a aceleração do processo de regeneração foi na ordem de 30 a 40% (Bax *et al.*, 1999; Bouxsein *et al.*, 2001; den Boer *et al.*, 2002; Einhorn *et al.*, 2003).

sabe-se também que a dose mínima efectiva de rhBMP-2 é determinada por vários aspectos nomeadamente, o facto de existir uma dependência directa da resposta face à espécie animal em questão: para induzir osso neoformado os primatas respondem a quantidades na ordem dos miligramas ao passo que para os roedores não são necessárias doses superiores a alguns microgramas (Reddi, 1998). De acordo com Cancedda *et al.*, (2007) os humanos necessitam ainda de

² a) Procedimentos de fusão espinal em pacientes esqueléticamente maduros com doença degenerativa de disco a nível das vértebras lombo-sagradas; b) Tratamento de fracturas expostas agudas da tibia (Cancedda *et al.*, 2007).

³ Alternativas a enxertos autólogos: a) Não-uniões ósseas recidivadas onde o enxerto autólogo é impraticável e onde não haja terapêuticas alternativas; b) Pacientes em que é necessária uma fusão espinal postero-lateral lombar e onde os enxertos autólogos não são praticáveis ou não se esperam que promovam fusão (Cancedda *et al.*, 2007).

doses adequadas mais elevadas que os roedores ou os cães.

A implantação de BMP recombinada e purificada numa matriz de colagénio ósseo em tecido subcutâneo de ratos induziu uma sequência de eventos celulares que conduziram à formação de novo osso com todos os elementos celulares que o caracterizam Hogan (1996a).

As proteínas morfogenéticas humana, bovina e canina, demonstraram induzir neoformação óssea heterotópica nas fáscias subcutâneas do tórax e músculos da coxa (Johnson *et al.*, 1988). Estas mesmas preparações induziram *in vitro* as células mesenquimatosas dos músculos dos ratos a expressarem um fenótipo condrogénico, como se comprovou pela incorporação de sulfato-S (Wozney *et al.*, 1988) em glicosaminoglicanos (Nathanson, 1983) Quando são colocados nos tecidos *in vivo* estes factores de crescimento normalmente induzem formação óssea endocondral.

Zegzula *et al.*, (1997) citados por Heckman *et al.*, (1999) demonstraram que num defeito crítico no rádio de coelhos se pode induzir regeneração óssea mediante a utilização de um implante de ácido poli(DL-láctico) que contém proteína humana morfogenética recombinada (rhBMP-2).

Partridge *et al.*, (2002) e Peterson *et al.*, (2005) obtiveram resultados satisfatórios na consolidação de defeitos ósseos críticos num modelo animal, através da utilização de células mesenquimatosas estaminais (com origem no tecido adiposo e medula óssea) após transferência genética por um vector adenoviral transportador do gene de BMP-2, incluídos numa estrutura de suporte biodegradável.

Em macacos uma única injeção percutânea de rhBMP-2 e um substituto ósseo denominado alfa-BSM provocou uma aceleração de 40% no processo de regeneração óssea (Seeherman *et al.*, 2004). Relativamente aos estudos pouco numerosos, em humanos, estes têm sido efectuados em fracturas tibiais expostas, um modelo normalmente associado a um risco elevado de complicações, sobretudo não-uniões ósseas. Aqui, a administração de rhBMP-2 está associada a uma regeneração mais rápida, uma redução na taxa de infecções, uma menor necessidade de procedimentos invasivos, menor necessidade de enxertos ósseos

e uma redução da necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica (Govender *et al.*, 2002 citado por Seeherman *et al.*, 2004; Swiontkowski *et al.*, 2006).

Presentemente a matriz óssea desmineralizada (DBM) e as proteínas morfogenéticas humanas recombinadas (rhBMP-2, rhBMP-7) são os elementos osteoindutivos mais potentes e clinicamente aprovados para a utilização em deficiências de osso (Gugala *et al.*, 2007).

1.9.4. Células estaminais

As células estaminais são células únicas na sua capacidade de auto-renovação e na diferenciação na grande maioria dos tipos de células existentes no organismo. Estas capacidades são teoricamente infinitas. A utilização deste tipo de células é habitualmente designada de terapia celular inserida numa medicina reparativa ou regenerativa.

Trata-se de células com características muito particulares, pois podem multiplicar-se de forma indiferenciada através de divisão celular ou, sob a influência de determinadas condições fisiológicas ou experimentais, em células com funções específicas.

Existem dois grandes grupos: células estaminais embrionárias, ESCs e células estaminais adultas. As ESCs embora o seu potencial seja quase infinito dada a sua auto-reprodutibilidade e pluripotencialidade, a sua utilização prática está ainda limitada por regulações celulares, considerações éticas e manipulação genética (Mizuno, 2009).

A importância do estudo das células estaminais é tão elevada que só no ano de 2008 decorreram mais de 800 ensaios clínicos que investigaram o uso de células estaminais adultas como forma de tratamento de uma variedade de patologias.

Relativamente ao estudo do osso, a aplicação das células estaminais adultas exige, na maioria dos casos, uma estrutura de suporte como matriz extracelular sintética para regular a sua localização e libertação (Hsiong *et al.*, 2008).

Dentro das células estaminais adultas e dentro da medicina regenerativa

aplicada ao osso, as que são mais utilizadas são as células estaminais da medula óssea (BMSCs), as células estaminais hematopoiéticas (HSCs), as células mesenquimatosas estaminais da medula óssea (BMMSCs) e as células mesenquimatosas estaminais do tecido adiposo (ASCs).

De acordo com Gimble *et al.*, (2007) citado por Mizuno (2009) uma célula estaminal utilizada para aplicações médicas regenerativas deve cumprir os seguintes requisitos: ser encontrada em quantidades abundantes (milhões a bilhões de células); a sua colheita deve ser um procedimento de mínima invasão; a sua diferenciação em múltiplas linhas celulares deve ser um processo regulável e reprodutível; deve poder ser transplantada de forma segura e efectiva para um receptor autólogo ou heterólogo e deve poder ser fabricada de acordo com as linhas de orientação “Good Manufacturing Practice”. As ASCs cumprem estes critérios por inteiro.

Relativamente às ESCs os resultados *in vitro* foram satisfatórios, observando-se estas células a expressarem marcadores osteogénicos e mineralização. As células foram posteriormente semeadas num material de suporte de cerâmica e diferenciaram-se em osteoblastos. Estas células foram então implantadas em ratos imunodeficientes, não tendo havido produção de osso (Bielby *et al.*, 2004) embora se tenham detectado zonas de mineralização. As células que histologicamente definem o osso, osteócitos, medula óssea e células de revestimento ósseo, não foram observadas.

Dada a multiplicidade de locais potencialmente produtores deste tipo de células, optámos pela descrição daqueles cuja produção pode ser eficazmente utilizada com fins terapêuticos, ou seja MSCs e ASCs.

As MSCs têm um potencial osteogénico comprovado em ratos e cabras com uma quantidade significativa de osso neoformado no local de implantação da estrutura de suporte que transporta estas células. Contudo para as MSCs humanas implantadas em modelos animais ou utilizadas em ensaios clínicos, os resultados foram insatisfatórios não tendo sido a quantidade de osso neoformado suficiente para fazer uma ponte de união entre os topos de um defeito ósseo crítico (Meijer *et al.*, 2007, citado por Jukes *et al.*, 2008). Por outro lado, observou-



se uma variação de acordo com o tipo de dador relativamente à quantidade de osso formada. Todas estas razões obrigam assim a uma melhor e mais eficiente definição de protocolos de utilização das MSCs em humanos (Jukes *et al.*, 2008).

As possíveis desvantagens da utilização destas células estaminais são o potencial para formação de teratomas. Este facto não é insignificante pois estes autores identificaram-nos em estruturas implantadas em ratos. Estas estruturas já tinham sido submetidas a três semanas de diferenciações *in vitro*, o que pode indicar que uma pequena quantidade de células permanece indiferenciada e que *in vivo* o seu potencial para promover crescimento tecidual pode ser devastador.

As ASCs são células multipotentes que em presença de determinados factores podem dar origem a osteoblastos. Comparadas com as BMSCs estas células tem inúmeras vantagens como a facilidade no seu isolamento, a sua relativa abundância, a rapidez de expansão, uma multipotência independente da fonte e qualidade do aspirado (Zuk *et al.*, 2001) e uma recolha pouco invasiva (Mizuno, 2009). Por outro lado com o aumento da incidência na obesidade nas populações modernas, o tecido subcutâneo adiposo tornou-se uma fonte abundante e de fácil acesso deste tipo de tecido (Mizuno, 2009).

As ASCs quando cultivadas em meio osteogénico (Zuk *et al.*, 2002), ou quando modificadas geneticamente, expressando intensamente o gene BMP-2 (Dragoo *et al.*, 2005), diferenciam-se em células da linhagem osteogénica (Cui *et al.*, 2007).

A formação de matriz osteóide foi observada quando ASCs osteo-induzidas foram semeadas em estruturas temporárias de hidroxiapatite/fosfato tricálcico e implantadas subcutaneamente em ratos “nude” (Hicok *et al.*, 2004).

Cui *et al.*, (2007) conduziram um ensaio em cães de forma a investigar se as ASCs poderiam regenerar defeitos críticos craniais em animais imunocompetentes. Assim, ASCs de cães adultos foram expandidas *in vitro* durante uma semana, induzidas osteogenicamente e semeadas em materiais de suporte de coral. Estes complexos foram cultivados *in vitro* por uma semana e implantados *in vivo* para tratar defeitos craniais em cães (20 mm X 20 mm). Ao fim de 6 meses foi atingido o sucesso terapêutico, indicando que as ASCs autólogas

numa estrutura temporária de coral são potenciais candidatas para a regeneração óssea.

Tobita *et al.*, (2008) citado por Mizuno (2009) demonstrou de forma inequívoca que as ASCs podem promover a regeneração tecidual periodontal num modelo de rato. Estas células com PRP obtidas de ratos “inbred” foram implantadas num defeito do tecido periodontal e ao fim de oito semanas foi observada regeneração óssea alveolar.

Outros tipos promissores de células estaminais são as células progenitoras adultas do sangue periférico, as PB CD34+. Estas células contêm comprovadamente células progenitoras endoteliais (EPCs) assim como as HSC's, que promovem vasculogénese embrionária (Matsumoto *et al.*, 2008).

As células CD34+ estão relacionadas não só com as células endoteliais mas também com as células murais perivasculares, pericítos e células de músculo liso (Matsumoto *et al.*, 2008).

Obviamente que um aspecto fundamental da investigação em engenharia tecidual é identificar os vários e diferentes estímulos que dirigem a actividade celular das células estaminais na direcção da regeneração tecidual pretendida.

As EPCs respondem à isquémia tecidual e às citocinas, que se mobilizam a partir da medula óssea em PB, migrando para regiões onde se processa a neo-vascularização para se diferenciarem em células endoteliais maduras, promovendo a vasculogénese (Takahashi *et al.*, 1999, citado por Matsumoto *et al.*, 2008).

Contrariamente ao que se pensava até recentemente, as linhas celulares das células progenitoras que originam células endoteliais e osteoblásticas, sobrepõem-se, pois *in vitro*, CD34+ e CD133+ são não só hematopoiéticas, como vasculogénicas e são ainda capazes de se diferenciarem em osteoblastos, ao passo que *in vivo* uma população não aderente de células de medula óssea, contendo células primitivas, foi capaz de originar linhas hematopoiéticas e osteogénicas (Olmsted-Davis *et al.*, 2003, citado por Matsumoto *et al.*, 2008).

De um ponto de vista clínico esta população de células é apelativa pois podem ser obtidas através de uma técnica de mínima invasão, segura e eficaz

pois a aspiração de sangue periférico (PB) não requer qualquer anestesia (Matsumoto *et al.*, 2008).

Em engenharia tecidual o conceito das células mesenquimatosas estaminais e a possibilidade da sua expansão *in vitro* são muito importantes na medida em que a maioria das abordagens terapêuticas requer um número elevado de células com o objectivo de compensar o número relativamente baixo de células precursoras existentes na medula óssea que é de $10^3 / \text{cm}^3$ (Hutmacher e Sittering 2003, citados por Schieker *et al.*, 2006).

Segundo Schieker *et al.*, (2006) há em geral dois tipos de abordagens para as “sementeiras”: as estáticas e as dinâmicas. As condições estáticas são as mais simples pois envolvem tão-somente uma aplicação da suspensão celular. Pelo contrário as condições dinâmicas ou mesmo condições mais complexas podem oferecer algumas vantagens uma vez que é dado mais tempo às células e, por conseguinte, mais oportunidades de adesão tornando a “sementeira” mais eficaz. Há já trabalhos não publicados por estes autores de aumentos de eficácia de “sementeira” na ordem dos 30 a 90%, quando são utilizadas técnicas mais sofisticadas que envolvem uma rotação regular das estruturas temporárias, bem como aplicações repetidas da suspensão celular ao longo de um determinado período de tempo. Estas construções devem mimetizar as propriedades do tecido original e as células deverão ser cultivadas sob condições o mais semelhante possível ao seu ambiente natural para que constituam um estímulo para a regeneração funcional dos tecidos.

1.9.5. Outros produtos utilizados na estratégia osteoindutiva

1.9.5.1. Isoflavona

De acordo com estudos de Ito *et al.*, (2007) a ipriflavona ou 7-isopropoxyisoflavona (IP) derivada da isoflavona da soja, tem importantes efeitos no metabolismo ósseo já que a IP é eficaz na redução da renovação óssea sobretudo por inibição da reabsorção óssea. Esta substância actua pela inibição da activação de osteoclastos maduros e pela inibição da formação de novos osteoclastos (Bonucci *et al.*, 1992, citado por Coelho 2003, Ito *et al.*, 2007). A IP e

os seus metabolitos actuam também através da estimulação da formação óssea mediante a proliferação da linha osteoblástica, aumentando a actividade da ALP e estimulando a formação de colagénio (Benvenuti *et al.*, 1991).

De acordo com estudos *in vitro* de Cheng *et al.*, (1994) estas substâncias regulam a diferenciação osteoblástica, estimulando a expressão de importantes proteínas da matriz óssea e facilitando a sua mineralização.

Estudos em humanos também sugerem que a IP previne a perda de massa óssea (Agnusdei *et al.*, 1997) e aumenta a massa óssea no período pós-menopausa (Passeri *et al.*, 1992 citado por Ito *et al.*, 2007).

Através da isoflavona, em teoria, podemos intervir no metabolismo ósseo manipulando apenas os factores nutricionais.

1.9.5.2. Plasma rico em plaquetas (PRP)

Trata-se de uma fonte autóloga rica em factores de crescimento que é obtida fazendo uma ultra-concentração de sangue centrifugado. Este concentrado de plaquetas numa ínfima quantidade de plasma, contém inúmeros factores de crescimento tais como: factor de crescimento das plaquetas (PGF), Factor β de transformação do crescimento (TGF- β -1), factor de crescimento epitelial (EGF) e factor de crescimento endotelial vascular (VEGF) Weibrich, (2002) e PDGF-AB (Ehrenfest *et al.*, 2009).

O facto das plaquetas serem os principais reguladores da fase inflamatória e da fase de diferenciação levou a que os cientistas propusessem o seu uso concentrado como estratégia para iniciar o caminho da regeneração no decurso da regeneração óssea (Intini, 2009)

É um método simples, de baixo custo de produção, de mínima invasão e que permite, num veículo adequado, a aplicação local de múltiplos factores de crescimento. Basicamente o seu aparecimento surgiu para fazer face a hemorragias provocadas por trombocitopenias severas.

A utilização dos derivados de sangue para o encerramento/selagem de feridas para evitar a sua contaminação começou pela aplicação de colas de fibrina mas este produto é de uso limitado dada a complexidade dos seus protocolos de

produção daí que o PRP tenha vindo a ser utilizado com este fim, como foi sugerido inicialmente por Whitman *et al.*, (1997).

O primeiro estudo *in vitro* publicado demonstrou uma tendência do PRP para estimular vários tipos de células como osteoblastos (Clausen *et al.*, 2006), fibroblastos (Krasna *et al.*, 2007 citado por Ehrenfest *et al.*, 2009), células de tendões (Anitua *et al.*, 2005), condrócitos (Akeda *et al.*, 2006, citado por Ehrenfest *et al.*, 2009), células dos ligamentos periodônticos (Okuda *et al.*, 2003) e BMSCs (Lucarelli *et al.*, 2003).

Outros estudos *in vitro* apontam para que os efeitos do PRP *in vivo* sejam de curta duração o que impede utilizações em que se pretenda um efeito prolongado no tempo (Ehrenfest *et al.*, 2009). Ainda outros estudos clínicos indicam que gel de PRP tem efeitos positivos na redução do tempo de recuperação pós cirúrgica (Everts *et al.*, 2007 citado por Ehrenfest *et al.*, 2009), reparação de tecidos moles (Lindeboom *et al.*, 2007) e regeneração óssea mas por períodos de acção curta (Thor *et al.*, 2007).

Num estudo de Rai *et al.*, (2008) a adição de PRP a uma estrutura de policaprolactona acelerou o crescimento vascular e melhorou a longo prazo a integração desta mesma estrutura.

Num outro estudo a adição de PRP a uma estrutura de transporte de colagénio, juntamente com células estaminais da medula óssea resultou na neoformação de osso num enxerto homólogo (Lucarelli *et al.*, 2005). Estudos *in vitro* de Lucarelli *et al.* (2003) demonstraram também que a adição de plasma enriquecido de plaquetas a 10% é suficiente para promover uma acentuada proliferação de células estaminais da medula óssea. Relativamente a enxertos ósseos e de acordo com Marx *et al.*, (1998) citado por Dallari *et al.*, (2006) a adição de PRP aumenta de forma significativa o tempo necessário para promover a consolidação do enxerto bem como a maturação e densidade óssea trabecular.

Em engenharia óssea tecidular há estudos da utilização do PRP com resultados promissores: BMSCs foram colhidas da crista ilíaca e tratadas com PRP como cultura de células e meio de implantação, com o objectivo de substituir o soro fetal bovino em materiais re-implantados para evitar a contaminação e a

resposta imunitária (Doucet *et al.*, 2005). O PRP demonstrou estimular de forma significativa a proliferação de BMSCs mas inibir sua diferenciação (Lucarelli *et al.*, 2003). Este método de engenharia tecidual pode ser benéfico em cirurgia reconstrutiva crânio-facial (Hibi *et al.*, 2006, citado por Ehrenfest *et al.*, 2009) ou ortopédica (Kitoh *et al.*, 2007). Estes protocolos invasivos foram testados em cirurgia periodontal (Yamada *et al.*, 2006 citado por Ehrenfest *et al.*, 2009) e cirurgia de implantes (Ueda *et al.*, 2005 citado por Ehrenfest *et al.*, 2009) embora o seu uso de forma rotineira seja impraticável.

Comparativamente a outro tipo de soluções com factores de crescimento, nomeadamente as BMPs, o PRP demonstrou alguma ineficiência que se poderá atribuir à fraca concentração celular deste tipo de factor de crescimento em solução (Carreon *et al.*, 2005, citado por Sen e Miclau, 2007). Mesmo em ortopedia o PRP tem demonstrado resultados contraditórios (Gandhi *et al.*, 2006).

Efectivamente a maioria destes estudos tem tido resultados contraditórios que se revelam por exemplo num estudo em que a osteogénese é estimulada (Clausen *et al.*, (2006) e noutro em que esta é inibida (Cenni *et al.*, 2005). Crê-se que estas contradições se devam ao elevado número de protocolos de produção de PRP, cada um deles originando produtos com diferentes concentrações de plaquetas (Ehrenfest *et al.*, 2009; Intini, 2009) e também ao facto dos próprios protocolos de activação destas mesmas plaquetas serem também muito variáveis (Intini, 2009). Este autor responsabiliza também a trombina utilizada para activar as plaquetas como um dos possíveis factores responsáveis pelos “insucessos” resultantes da utilização deste preparado e propõe mesmo a sua substituição de forma a que este produto possa ser implementado de forma efectiva na terapia óssea reconstrutiva.

Os resultados da aplicação dos vários tipos de PRP e a divulgação destes também tem sido algo confusa muito pelo facto de existirem inúmeras técnicas descritas para a concentração de plaquetas, o que faz com que cada técnica origine um produto com potencial biológico distinto (Ehrenfest *et al.*, 2009;). Segundo Ehrenfest *et al.*, (2009) a classificação, deve ser feita de acordo com a concentração de leucócitos e o conteúdo de fibrina que contém.

A influência dos leucócitos na biologia dos vários produtos disponíveis requer estudos mais aprofundados pois pode ser essa razão de tantos resultados contraditórios na literatura existente. Poderá ser aplicado um método básico e de aplicação simples que é o PRF (plasma rico em fibrina) de Choukroun (Choukroun *et al.*, 2001 citado por Ehrenfest *et al.*, 2009). Basicamente consiste numa amostra de sangue sem anticoagulante o que faz com que se dê, rapidamente, a activação das plaquetas e a polimerização da fibrina, dando origem a uma estrutura arquitectónica tridimensional com elevada concentração de plaquetas e leucócitos (Dohan *et al.*, 2006). Este coágulo comprimido entre duas compressas torna-se uma membrana de dureza e resistência significativas, tendo sido a aplicação deste material autólogo descrita com sucesso em cirurgia oral (Choukroun *et al.*, 2006a), maxilo-facial (Choukroun *et al.*, 2006b), otorrinolaringologia (Choukroun *et al.*, 2007 citado por Ehrenfest *et al.*, 2009) e cirurgia plástica (Braccini e Dohan 2007 citados por Ehrenfest *et al.*, 2009). Trata-se da produção de uma estrutura temporária tridimensional de produção simples, a baixo custo e rica em factores de crescimento uma vez que durante o processamento as plaquetas são activadas e os leucócitos também (Dohan *et al.*, 2006), como referido anteriormente.

Considerações finais

A busca por substitutos ósseos deverá prosseguir, mas sempre tendo uma mente aberta a estratégias arrojadas e inovadoras pois o potencial à nossa disposição é quase infinito. A aplicação da terapia génica, dos factores de crescimento e das células estaminais, vieram certamente alargar muito o horizonte e têm infinitas possibilidades das quais apenas uma quantidade ínfima é conhecida. A área da engenharia tecidual e a inovação das estruturas temporárias para substituir osso são um mundo vasto à nossa frente que nem sempre visível e de facto, frequentemente “o que é essencial é invisível aos olhos”.

OBJECTIVOS DO ESTUDO

2. OBJECTIVOS DO ESTUDO

1. Avaliar num modelo experimental ovino a regeneração óssea guiada por membrana de ácido poli(L/DL-láctico) 80/20 no tratamento de defeitos ósseos de dimensões críticas no osso ilíaco e na tuberosidade da tíbia. O defeito vazio foi utilizado como controlo, de acordo com as seguintes hipóteses experimentais:

H0: O ácido poli(L/DL-láctico) 80/20 sob a forma de membrana não apresenta resultados diferentes dos evidenciados pelo defeito vazio.

H1: O ácido poli(L/DL-láctico) 80/20 sob a forma de membrana apresenta resultados diferentes dos evidenciados pelo defeito vazio.

2. Avaliar num modelo experimental ovino uma esponja de poliuretano enriquecida com hidroxiapatite nanométrica conjugada com sistema de creatina/putrescina (composição A) no tratamento de defeitos ósseos de dimensões críticas no osso ilíaco e na tuberosidade da tíbia cobertos com a membrana de ácido poli(L/DL-láctico) 80/20. Foi utilizado como controlo o defeito vazio coberto com a referida membrana de acordo com as seguintes hipóteses experimentais:

H0: A esponja de poliuretano enriquecida com hidroxiapatite nanométrica conjugada com sistema de creatina/putrescina (composição A) coberta com a membrana de ácido poli(L/DL-láctico) 80/20 não apresenta resultados diferentes dos evidenciados pelo defeito vazio e coberto apenas pela membrana de ácido poli(L/D- láctico) 80/20.

H1: A esponja de poliuretano enriquecida com hidroxiapatite nanométrica conjugada com sistema de creatina/putrescina (composição A) coberta com a membrana de ácido poli(L/DL-láctico) 80/20 apresenta resultados diferentes dos evidenciados pelo defeito vazio e coberto apenas pela membrana de ácido poli(L/DL-láctico) 80/20.

3. Avaliar num modelo experimental ovino uma esponja de poliuretano enriquecida com hidroxiapatite nanométrica conjugada com sistema de lecitina de soja (composição B) no tratamento de defeitos ósseos de dimensões críticas no osso ilíaco e na tuberosidade da tíbia cobertos com a membrana de ácido poli(L/DL-láctico) 80/20. Foi utilizado como controlo o defeito vazio coberto com a referida membrana de acordo com as seguintes hipóteses experimentais:

H0: A esponja de poliuretano enriquecida com hidroxiapatite nanométrica conjugada com lecitina de soja (composição B) coberta com a membrana de ácido poli(L/DL-láctico) 80/20 não apresenta resultados diferentes dos evidenciados pelo defeito vazio e coberto apenas pela membrana de ácido poli(L/DL-láctico) 80/20.

H1: A esponja de poliuretano enriquecida com hidroxiapatite nanométrica conjugada com lecitina de soja (composição B) coberta com a membrana de ácido poli(L/DL-láctico) 80/20 apresenta resultados diferentes dos evidenciados pelo defeito vazio e coberto apenas pela membrana de ácido poli(L/DL-láctico) 80/20.

4. Comparar duas formulações de uma esponja de poliuretano enriquecida com hidroxiapatite nanométrica, num modelo experimental ovino para o tratamento de defeitos ósseos de dimensões críticas no osso ilíaco e na tuberosidade da tíbia cobertos com uma membrana polimérica de ácido poli (L/DL láctico) 80/20. Uma formulação conjugada com um sistema de creatina/putrescina (composição A) e outra conjugada com um sistema de lecitina de soja (composição B). A comparação realiza-se de acordo com as seguintes hipóteses experimentais:

H0: A esponja de poliuretano enriquecida com hidroxiapatite nanométrica conjugada com sistema de creatina/putrescina (composição A) não apresenta resultados diferentes dos evidenciados pela conjugação com um sistema de lecitina de soja (composição B).

H1: A esponja de poliuretano enriquecida com hidroxiapatite nanométrica conjugada com sistema de creatina/putrescina (composição A) apresenta resultados diferentes dos evidenciados pela conjugação com um sistema de lecitina de soja (composição B).

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais testados

Foram testados 3 tipos de implantes experimentais: Membrana osteopromotora de ácido poli(L/DL-láctico) 80/20 (PDLA), esponja de poliuretano com hidroxiapatite nanométrica enriquecida com sistema de creatina/putrescina e esponja de poliuretano com hidroxiapatite nanométrica enriquecida com lecitina de soja. As aplicações, vantagens e limitações foram revistas na introdução.

3.1.1 Membrana osteopromotora de ácido poli(L/DL-láctico) 80/20

Foi utilizada uma membrana polimérica porosa de um polímero ácido poli(L/DL-láctico) 80/20 com um peso molecular médio de 2×10^5 Dalton (Da), com uma espessura de 300 μm e com poros de diâmetro entre 100 a 150 μm (Fig. 3.1.). Estas membranas foram desenvolvidos pelo Polymer Research Group da AO/ASIF-ARI e a sua síntese está descrita no anexo 1.

Esta membrana de ácido poliláctico, devidamente esterilizada e envolta numa camada tripla de papel e plástico próprios para esterilização antes de ser utilizada foi termo moldada em lactato de Ringer a de 25° C, de forma a torná-la moldável antes de ser fixada. Antes de ser colocada foi cortada à medida do defeito com a necessária margem para fixação (Fig. 3.2 A e B).

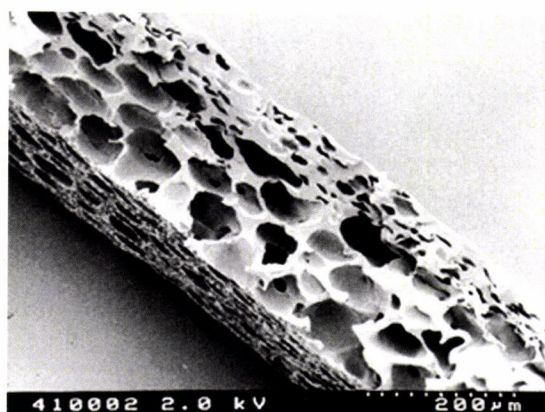


Fig.. 3.1. – Membrana osteopromotora.
Fotografia de microscopia electrónica de varrimento (Modelo Hitachi S-4100, Tóquio, Japão). A observação foi realizada com 2 kV.
(Cortesia do Professor Doutor Sylwester Gogolewski).

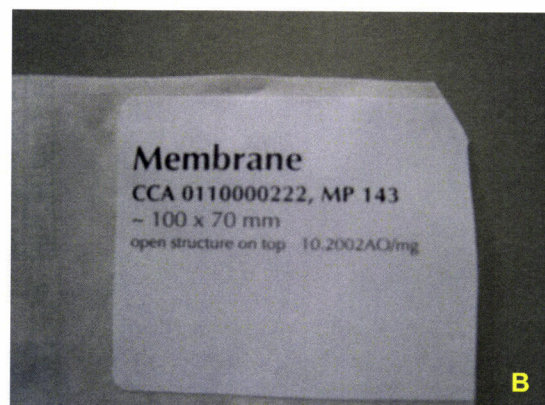
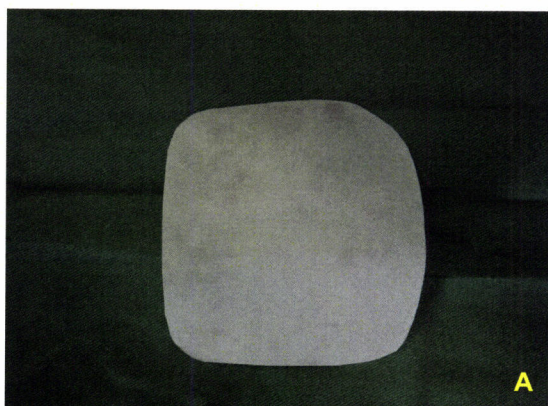


Fig. 3.2. **A)** Membrana osteopromotora. **B)** Identificação e invólucro da membrana osteopromotora

3.1.2. Esponjas de poliuretano

Foram utilizadas esponjas porosas tridimensionais e biodegradáveis que serviram como material de suporte. As estruturas utilizadas neste estudo foram baseadas em poliuretanos biodegradáveis desenvolvidos pelo Polymer Research Group da AO/ASIF-ARI (Fig. 3.3; 3.4 A e B e Fig. 3.5) e a sua síntese está descrita no anexo 1.

Foram assim utilizadas as seguintes composições:

Composição A (PUA): A esponja constava de di-isocianato alifático hexametileno, poliol com 50% componente hidrofílica (constituída por poli diol de óxido de etileno), 50% da componente hidrofóbica (constituída por poli diol de ϵ -caprolactona), cristais de hidroxiapatite nanométrica modificada com um sistema de creatina/putrescina.

Composição B (PUB): A esponja constava de di-isocianato alifático hexametileno, poliol com 50% componente hidrofílica (constituída por poli diol de óxido de etileno), 50% da componente hidrofóbica (constituída por poli diol de ϵ -caprolactona), cristais de hidroxiapatite nanométrica modificada com lecitina de soja.

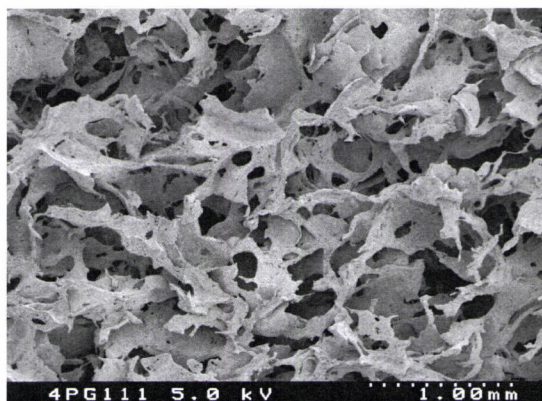


Fig. 3.3. Esponja de poliuretano. Fotografia de microscopia eletrônica de varrimento (Modelo Hitachi S-4100, Tóquio, Japão). A observação foi realizada com 5kV
(Cortesia Professor Doutor Sylwester Gogolewski).

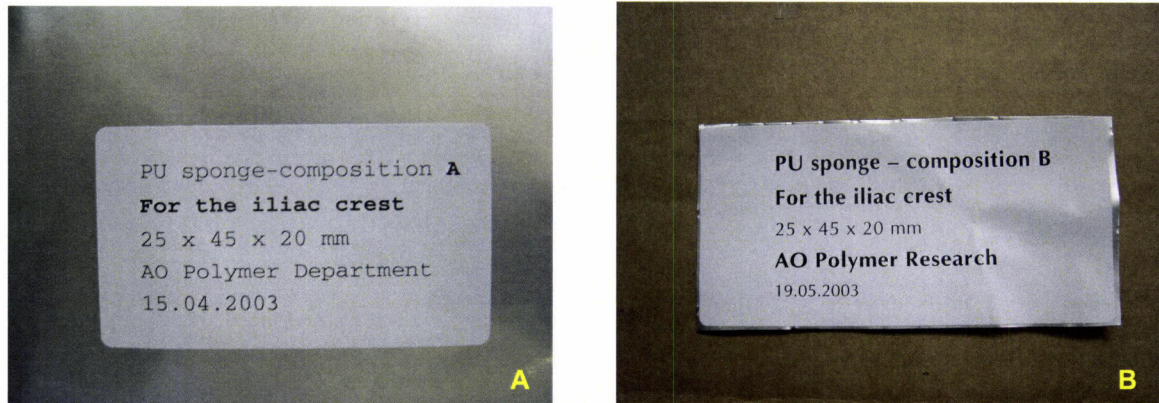


Fig. 3.4. A) Identificação da esponja de poliuretano, composição A para o defeito ilíaco.
B) Identificação e invólucro da esponja de poliuretano, composição B para o defeito ilíaco.

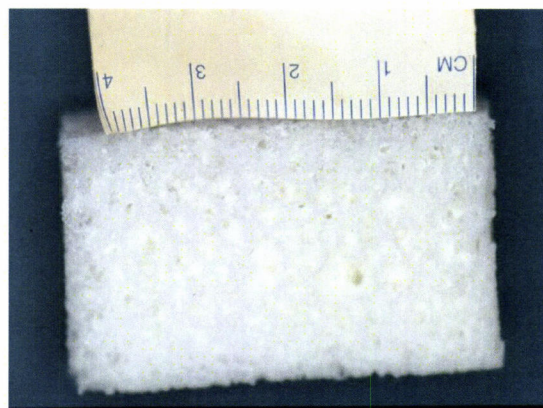


Fig. 3.5. Esponja de poliuretano para o defeito ilíaco antes da sua colocação.

3.1.2.2. Características da estrutura

- Dimensão média dos poros – 80 a 380 μm
- Densidade das estruturas – 90 a 270 kg/m^3
- *Ratio* poro-volume – 75 a 90%
- Permeabilidade à água – $3,4 \times 10^{-11} \text{ g/m}^3 \text{ hPa}$
- Força compressão – 0,025 a 0,03 MPa
- *Modullus* – 0,06 a 0,09 MPa.

Toda a informação relativa à preparação, fabrico e caracterização dos materiais de suporte de poliuretano e membrana polimérica utilizados neste estudo, encontram-se, como anteriormente, referido no anexo 1 e em artigos publicados anteriormente (Gugala e Gogolewski, 1999; Gorna e Gogolewski, 2006 e Gogolewski *et al.*, 2008).

3.2. Modelo experimental animal

3.2.1 Grupos experimentais

Para a realização de estudos quantitativos com relevância estatística, tornou-se necessário que cada grupo experimental de animais tivesse no mínimo seis animais (An e Bell, 1999). Por esse motivo foram utilizados quatro grupos com seis indivíduos cada, um grupo por cada uma das substâncias experimentais a utilizar como substituto ósseo e um grupo controlo. Foram utilizadas vinte e quatro ovelhas de raça merina, com três a cinco anos de idade e peso corporal compreendido entre os 50 e os 60 quilogramas provenientes de uma exploração oficial pertencente ao MADRP. As ovelhas foram distribuídas aleatoriamente por quatro grupos experimentais:

- Grupo I – Neste grupo foram criados os defeitos ósseos, não sendo utilizada nenhuma substância experimental de substituição – grupo controlo.

- Grupo II – Foi utilizada uma membrana de ácido poli(L/DL-láctico) 80/20, anteriormente descrita, para cobrir os defeitos ósseos vazios. A membrana foi fixada na tibia com dois parafusos de titânio de 2 mm de diâmetro, um no pólo proximal do defeito e outro no pólo distal do defeito e na crista ilíaca com quatro a seis parafusos, também de titânio e do mesmo diâmetro referido. Estes parafusos foram produzidos pelo AO/ASIF-ARI.

- Grupo III – Os defeitos foram preenchidos com uma esponja de poliuretano PUA. Toda a estrutura foi coberta com a membrana de ácido poli(L/DL-láctico) 80/20, tal como descrito para o Grupo II.

- Grupo IV – Os defeitos foram preenchidos com uma esponja de poliuretano PUB. Toda a estrutura foi coberta com a membrana de ácido poli(L/DL láctico) 80/20, tal como descrito para o Grupo II.

3.3. Delineamento experimental

A fase de experimentação animal foi realizada no Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas (INIAP), Estação Zootécnica Nacional (EZN), no Vale de Santarém, pólo do Instituto de Tecnologia Biomédica (ITB).

O completo desenrolar da experimentação e bem-estar animal foram sendo assegurados e monitorizados por mim própria e por médicos-veterinários e pessoal auxiliar da EZN.

As intervenções cirúrgicas foram realizadas sob anestesia geral, sendo respeitados os princípios de assepsia rigorosa (Fig. 3.6. A e B) em todas as fases.



Fig. 3.6. A) Bloco operatório do pólo do ITB na Estação Zootécnica Nacional. **B)** Acesso à crista da tibia

No período pré-operatório todos os animais foram sujeitos a um exame físico completo e a um período de jejum pré-operatório de 48h de jejum para sólidos e 24h para líquidos.

O protocolo analgésico consistiu na administração intramuscular de dipirona e hioscina (Diplabiol®, Sabiol, Portugal) 40 mg/kg/dia por via intra muscular (IM).

O protocolo anestésico consta da tabela 3.1.

Quadro 3.1. – Protocolo anestésico

	Drogas	Dose	Via e administração	
Pré anestésico	Acepromazina (Calmivet®, Vetoquinol, França)	0,5 mg/kg	IV (20 minutos antes da cirurgia)	
Indução	Tiopental sódico (Pentothal®, Abbott).	20 mg/kg a 2,5%	IV	
Manutenção	Oxigénio e isoflurano (Isoflo® – Abbott).	1, 5 a 2%	Via aérea	

O protocolo incluiu todos os requisitos destinados a limitar o sofrimento dos animais, incluindo a administração de analgésico pré, intra e pós-operatória, bem como a antibioterapia intra e pós-operatória.

O projecto de investigação foi aprovado pela Direcção Geral de Veterinária a 26 de Março de 2002 e executado segundo as normas nacionais e europeias (Portaria 1005/92).

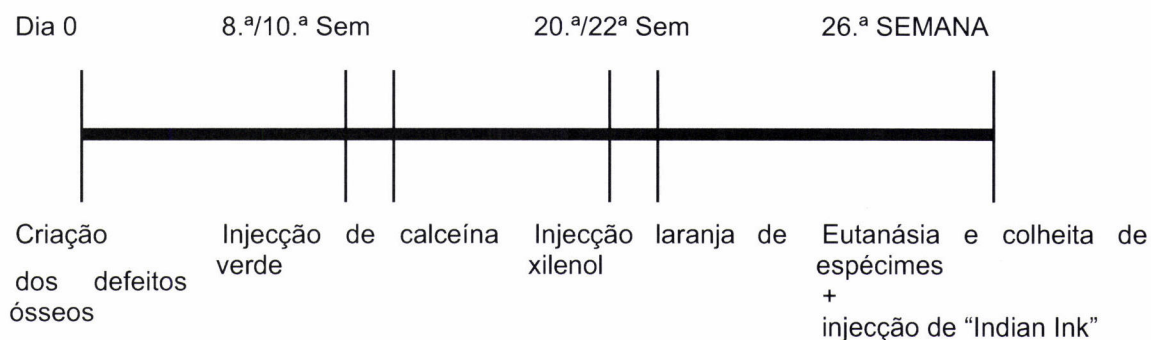
O protocolo cirúrgico constou de duas fases (tabela 3.2.):

1.^a a) Criação dos defeitos ósseos na tuberosidade da tíbia e crista do osso ilíaco;

b) Reconstrução das zonas ressecadas e encerramento dos planos cirúrgicos

2.^a Eutanásia e colheita dos espécimes.

Quadro 3.2. – Cronograma da experimentação animal



3.3.1. Primeira fase - Criação dos defeitos ósseos na tuberosidade da tíbia e crista do osso ilíaco; Reconstrução das zonas ressecadas e encerramento dos planos cirúrgicos

a) Criação dos defeitos ósseos na tuberosidade da tíbia e crista do osso ilíaco:

Procedeu-se à criação dos defeitos ósseos, monocortical da tíbia e tricortical do ilíaco. Esta ressecção consubstancia, neste modelo animal, um defeito ósseo crítico, *i.e.*, um defeito que não pode regenerar sem que se aplique algum tipo de substituto ósseo. A fase de ressecção óssea é comum aos quatro grupos de animais.

Na tíbia a incisão teve como referência a crista. Procedeu-se à incisão dorso-lateral (Fig. 3.7), medialmente à crista e com cerca de 10 cm de comprimento. Depois de incididos a pele e tecido subcutâneo, os músculos flexor profundo do pé e tibial cranial foram afastados e a zona da mesa tibial foi exposta tendo sido criado o defeito (Fig. 3.7 e 3.8). Com o auxílio de uma régua esterilizada o defeito foi delimitado como um quadrado com 15 mm de lado (Fig. 3.8. A). Esta delimitação foi feita com uma turbina de alta velocidade (Type 652A, Kaltenbach & Voigt, Alemanha), sendo depois aprofundada com osteótomo (AceEurope, E.U.A.) de 6 mm (Fig. 3.8.B). Foi removida uma porção quadrangular de cortical e posteriormente removido um fragmento de medula óssea em forma de cubo. A

de cubo. A cortical contra-lateral ficou assim exposta, já que se tratava de um defeito monocortical (Fig. 3.8.C).

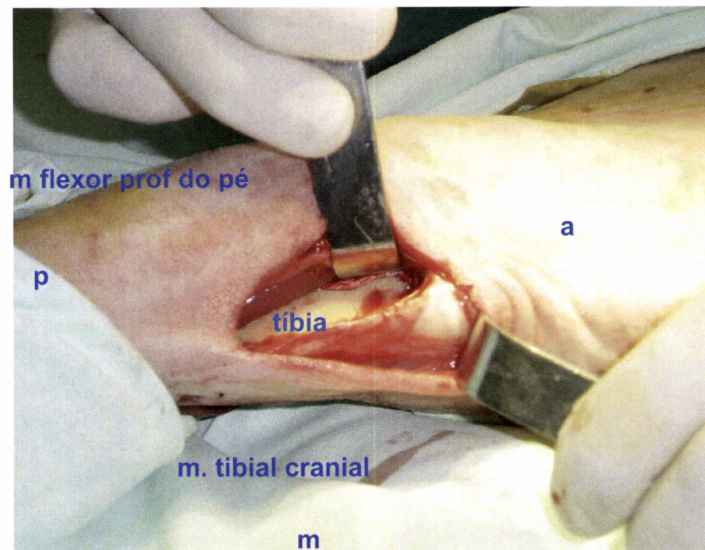


Fig. 3.7. – Acesso à tibia. **a** – Face anterior, **p** – Face posterior, **l** – Face lateral, **m** – Face medial.

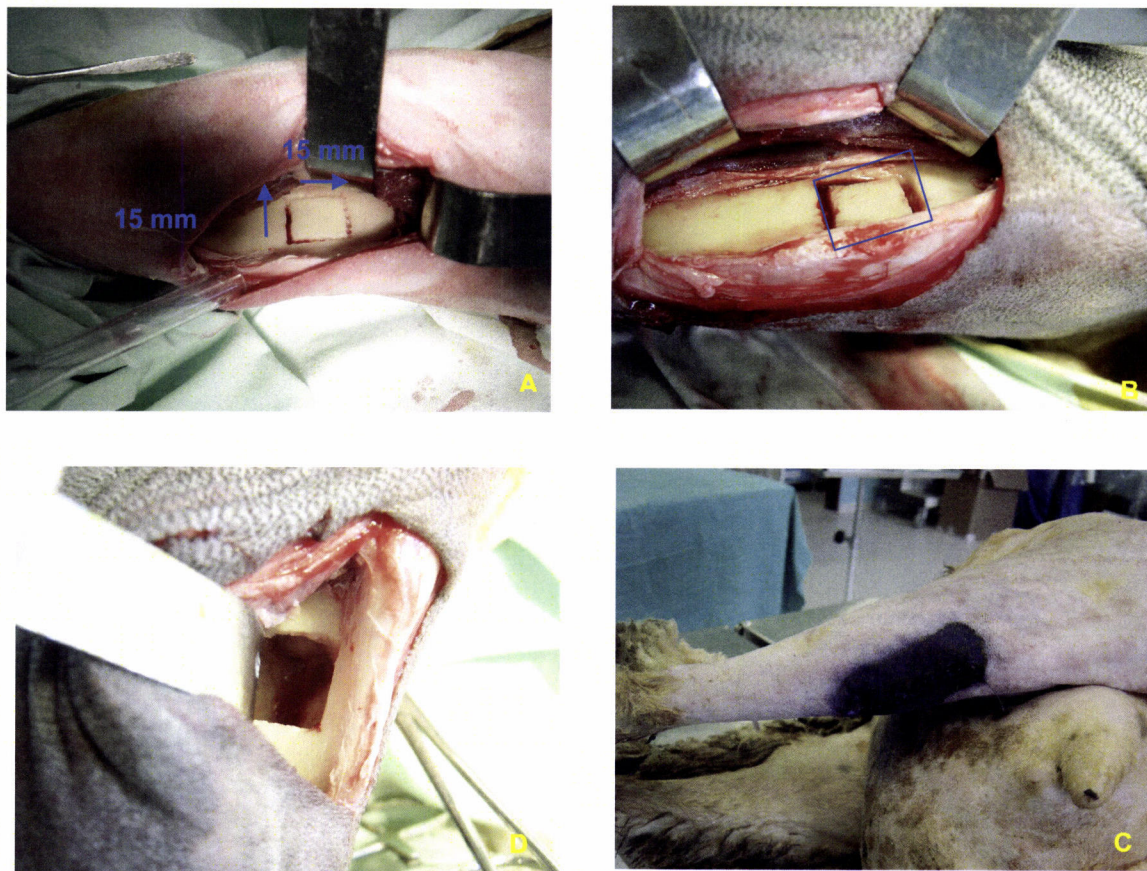


Fig. 3.8. – **A)** Defeito tíbia delimitado; **B)** Defeito tibial *in situ* mas solto; **C)** Defeito tibial monocortical criado, observando-se a contra lateral cortical; **D)** Sutura cutânea coberta com nebulizador de terramicina®.

Na crista ilíaca, a incisão foi feita sobre a própria crista até serem visíveis os músculos glúteos médios e acessório. Estes foram posteriormente incididos e afastados até à exposição de todas as superfícies da crista ilíaca (Fig. 3.10 A). Uma vez exposta a crista, na sua face posterior na zona da fossa glútea foi criado o defeito tricortical com auxílio de uma serra de aço oscilante, para a obtenção de um fragmento rectângular de 40X20 mm (Fig. 3.10 B, C e D.).

As estruturas anatómicas acima mencionadas estão representadas na figura. 3.9. onde se identificam as estruturas ósseas e musculares seccionadas e o local anatómico onde foi criado o defeito ósseo crítico em questão.

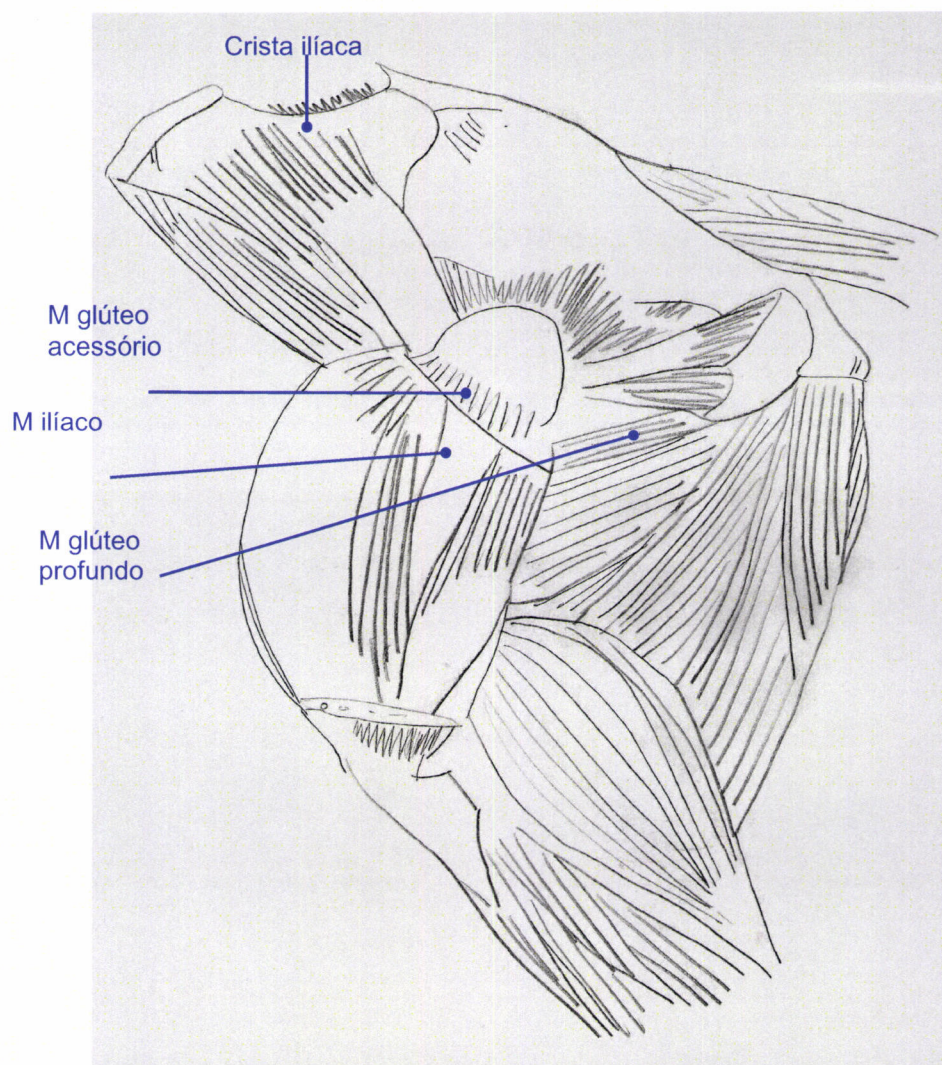


Fig. 3.9. – Acesso à zonal ilíaca. Representação gráfica adaptada de Barone (2000).

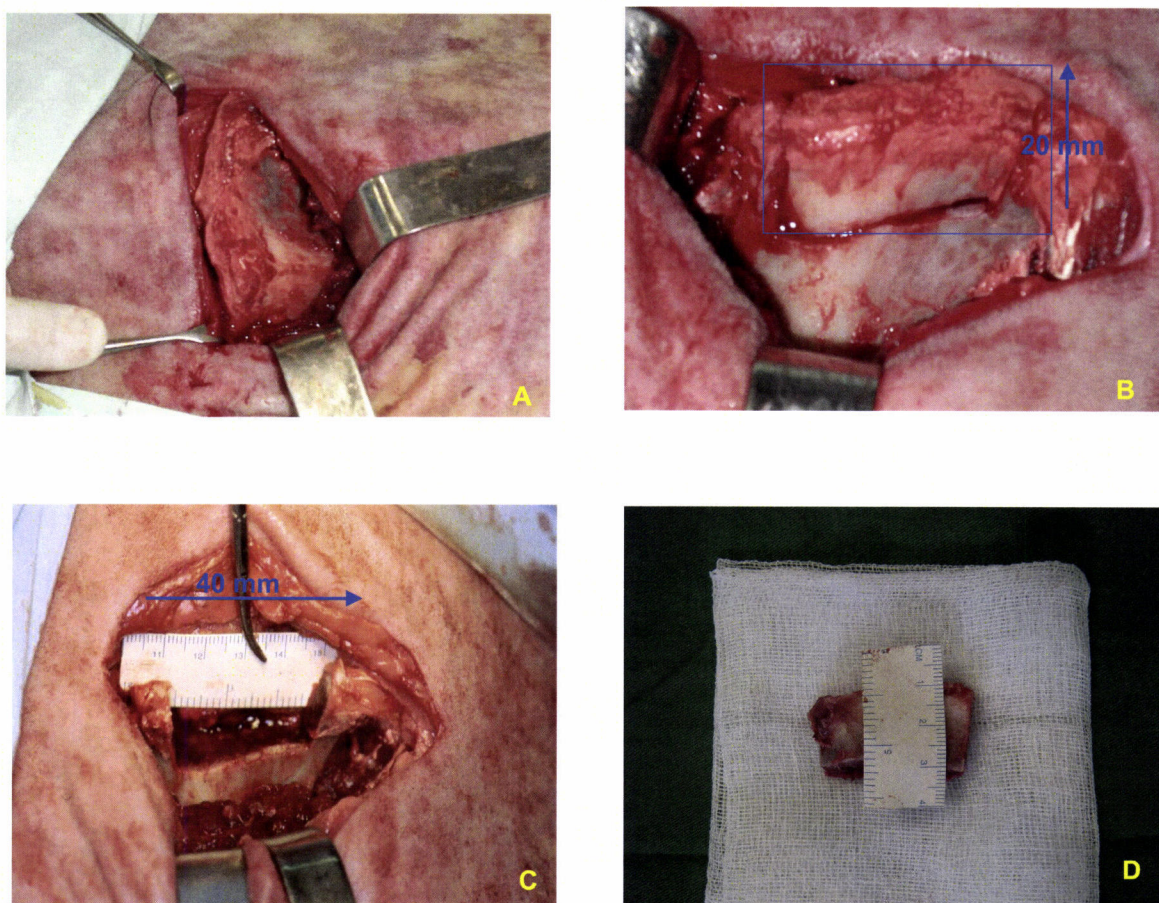


Fig. 3.10.: **A)** Crista ilíaca posterior exposta. **a** – Face anterior; **p** – Face posterior; **B)** Fragmento removido mas *in situ*; **C)** Defeito ilíaco tricortical; **D)** Fragmento retirado do da zona onde foi criado o defeito ilíaco.

b) Reconstrução das zonas ressecadas e encerramento dos planos cirúrgicos

1. Preenchimento dos defeitos com as substâncias PUA e PUB

As espojas de PU foram colocadas nos defeitos criados com conformação tri-dimensional e adaptadas e embebidas em Lactato de Ringer e sangue (Fig. 3.11. A, Fig. 3.12 A e B).

2. Envolvimento dos defeitos preenchidos com PUA e PUB com membranas de ácido poli (L/DL láctico) 80/20

Envolvimento dos defeitos criados com as membranas poliméricas e fixação das mesmas, com os parafusos acima referidos (Fig 3.11 B e Fig. 3.12. C e D).

Para finalizar a técnica cirúrgica, foi feito o encerramento das feridas cirúrgicas: na tibia foi feita a aproximação dos músculos flexor profundo do pé e tibial cranial e sutura dos mesmos ao perióstio da face medial da crista da tibia, usando sutura continua de poliglatina 1 (Vicryl®). A pele foi suturada com pontos simples usando fio de seda 1 (Mersilk®). (Fig. 3.8 D e Fig. 3.13. A).

No ilíaco foi feita a aproximação dos músculos glúteos médios de forma a cobrirem todo o defeito e a criar uma protecção reforçada na zona intervencionada e posteriormente a aproximação do tecido subcutâneo, utilizando uma sutura continua de poliglatina 1 (Vicryl®). A pele foi suturada com pontos simples e fio de seda 1, Mersilk® (Fig. 3.13.B).

Na zona da crista ilíaca posterior foi colocado, durante 24 a 48h, dependendo do grau de intensidade de drenagem observado. O dreno aspirativo foi de 150 ml (Mini Redovac®, B. Braun Medical, Portugal) e colocado de modo a limitar a acumulação de sangue consecutiva à incisão das massas musculares muito irrigadas (Fig. 3.14 A).

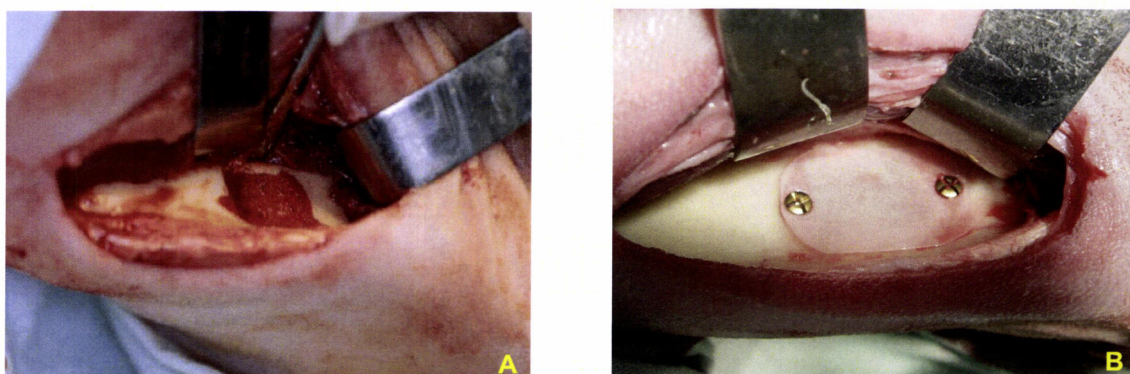


Fig. 3.11. A) Defeito tibial preenchido com esponja de poliuretano. **B)** Defeito tibial coberto com membrana osteopromotora e fixado com parafusos de titânio.

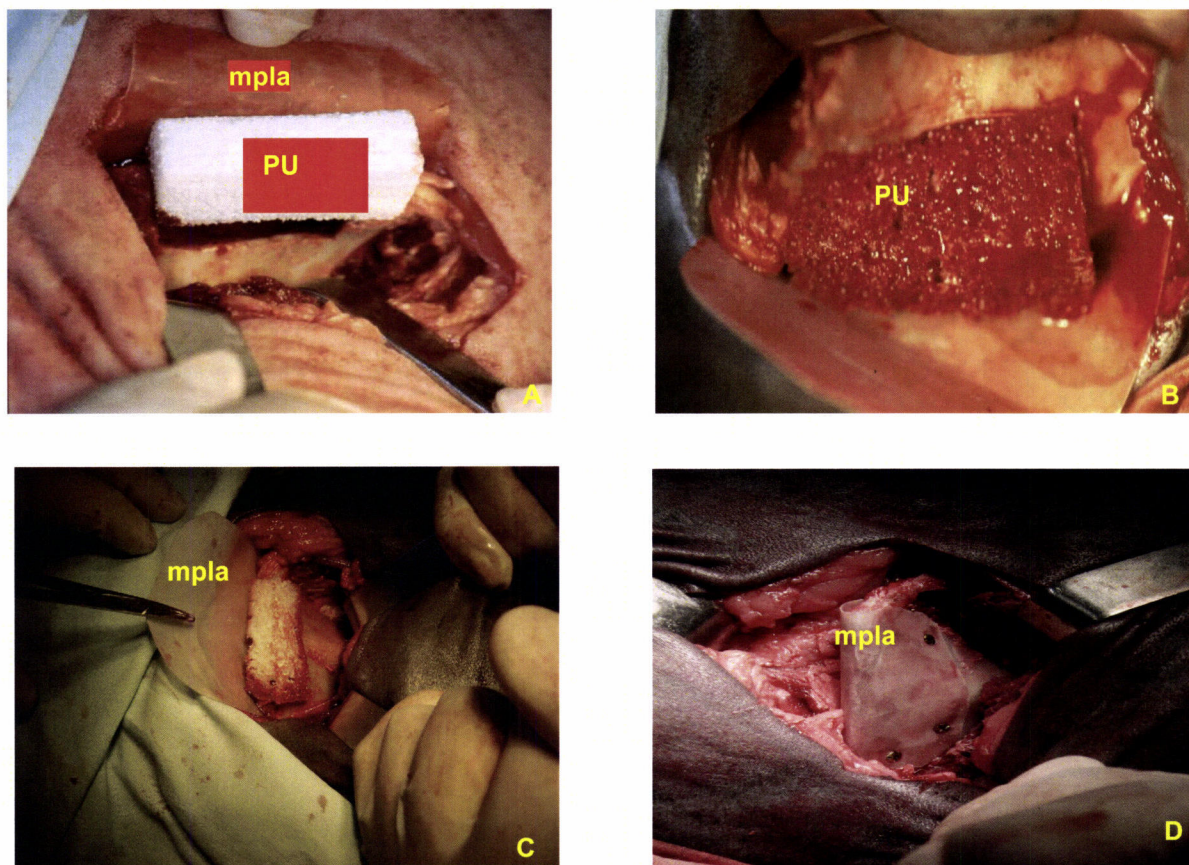


Fig.3.12. **A)** Esponja de poliuretano *in situ* (PU). **B)** Esponja de poliuretano *in situ*, embebida em sangue (PU); **C)** Esponja de poliuretano *in situ* envolvida por membrana osteopromotora, **mpla**. **D)** Esponja de poliuretano *in situ* coberta com membrana osteopromotora e fixada com parafusos de titânio.



Fig. 3.13. **A)** Sutura cutânea da tíbia. **B)** Sutura cutânea do íliaco.

3.3.2. Período pós-operatório

Durante os primeiros dez dias do pós-operatório os animais foram mantidos numa jaula individual, de modelo aprovado (Fig. 3.14. A) com 0,70 x 1,10 m na

sala de recobro ventilada e apropriada à prestação de cuidados intensivos, com uma temperatura constante de 21°C e humidade relativa de 50%. A medicação aplicada consistiu numa antibioterapia tópica com oxitetraciclina (Nebulizador de Terramicina®, Laboratórios Pfizer, Portugal) sobre a sutura. A antibioterapia sistémica consistiu na administração de cefalexina 15 mg/kg/dia (Ceporex®, Glaxowellcome, Portugal) por via intramuscular durante oito dias. Procedeu-se à analgesia com injeção intramuscular de dipirona e hioscina (Diplabiol®, Sabiol, Portugal) 40 mg/kg/dia por via intramuscular (IM) durante as primeiras setenta e duas horas.

Os drenos aspirativos foram removidos, dependendo do grau de drenagem observado, vinte e quatro ou quarenta e oito pós operatórias, como referido anteriormente.

As suturas cutâneas foram removidas ao décimo dia sendo os animais colocados num parque exterior, contíguo ao bloco operatório, com restrição de movimento, onde terminou o período pós-operatório (Fig.3.14 B). Neste parque continuaram a ser monitorizados até ao fim do período experimental, vinte e seis semanas.



Fig. 3.14. – A) Jaula de recobro de modelo aprovado; B) Parque exterior

3.3.2.1. Maneio dos animais

Alimentação – Durante o período experimental os animais foram alimentados com feno de aveia *ad libidum* e 300 g/dia/animal duma ração completa formulada

na própria EZN, e com adequado equilíbrio nutricional. Esta ração era à base de cereais, milho e como fonte proteica o bagaço de soja. Os animais dispunham também de água *ad libidum*.

Na tabela 3.3. está indicada a composição qualitativa e quantitativa da ração.

Quadro 3.3. – Composição qualitativa do alimento completo para ovinos, utilizado na alimentação dos animais experimentais.

Composição da ração completa	
Proteína bruta	18,3 %
Gordura bruta	2,4 %
Fibra bruta	6,8 %
Amidos	34,7 %
Hidratos de carbono	3,3 %
Amidos e açúcares	38,0 %
Sódio	0,57 %
Cloro	0,67 %
Potássio	0,79 %
Magnésio	0,23 %
Cálcio	1,19 %
Matéria seca	88,9 %

Alojamento – Dez dias após a cirurgia os animais foram transferidos da sala de recobro para um parque exterior com restrição de movimento e monitorização rigorosa durante cerca de 30 dias. Após este período os animais permaneceram no mesmo espaço, mas não submetidos à mesma monitorização rigorosa em termos médicos e de movimento.

3.3.2.2. Administração de corantes vitais fluorescentes para avaliação da cronologia da mineralização

Com o objectivo de marcação da cronologia dos processos biológicos críticos da osteogénese e mineralização, nomeadamente a modelação e remodelação óssea utilizou-se, durante as vinte e seis semanas do período experimental, a coloração intravital fluorescente por injeção subcutânea de dois corantes fluorescentes, a calceína verde e o xilenol laranja. Com a utilização destes diferentes marcadores que emitem diferentes fluorescências, é assim possível calcular a velocidade de aposição de tecido ósseo na área em que ocorre regeneração óssea.

Os protocolos de administração foram: a calceína verde, (Fluka, Buchs, Suíça, N.º21030) foi administrada à 8.^a e à 10.^a semana pós-operatória, na dose de 5 mg/kg de peso vivo por via subcutânea, em injeção muito lenta durante cinco minutos utilizando seringa de 60 ml e agulha de 19 G e 1' ½. O xilenol laranja (Fluka, Buchs, Suíça, N.º95615) foi administrados à 20.^a e à 22.^a semanas pós-operatória na dose de 90mg/kg peso vivo e com a mesma técnica usada para a calceína verde.

As soluções foram preparadas por dissolução de 0,5 g de calceína e de 9,0 g de xilenol laranja, respectivamente, em 80 ml de água desmineralizada, ajustando o pH para 7,2 a 7,4. Devido à labilidade térmica destas substâncias, procedemos à sua esterilização exclusivamente por filtração a frio durante a administração, usando filtros Millipore® com poros de 0,22 µm diâmetro intercalados entre a seringa e a agulha de injeção.

3.3.3. Segunda fase - Eutanásia e colheita dos espécimes

Vinte e seis semanas após as cirurgias e conforme o protocolo experimental, foi realizada a eutanásia do animal com vista à recolha dos espécimes.

A eutanásia foi feita por administração de uma “overdose” de tiopental sódico (Pentotal®). Cinco minutos antes da eutanásia foram administradas 25.000 UI de heparina sódica (B Braun Medical, Portugal) por via endovenosa com o

objectivo de evitar a coagulação sanguínea *post mortem* e assim permitir que os produtos administrados se disseminem por toda a árvore circulatória.

Imediatamente após a morte do animal procedeu-se à administração de “indian ink”, corante que é utilizado para demonstrar a acessibilidade da área circulatória preenchida e para a compreensão tridimensional da árvore vascular, visualizável pela coloração negra nas preparações histológicas.

Preparação e administração do “indian ink”

Preparada a partir de uma solução concentrada de dispersão de “indian ink” de Russ a 20% (DERUSSOL P 130, 20%, Degussa AG, Frankfurt, Alemanha - fornecida tal qual pelo AO/ASIF-ARI) em solução de lactato de Ringer (nº 535 405, Braun Medical AG) até aos 4%. A solução foi filtrada para um frasco de Erlenmeyer através de um filtro de seda ("Nylongrid" com a especificação de Seidengaze PA-1/1C, Scrynel com poros de 1 µm), adaptado a um funil de vidro. Esta filtração foi executada trinta minutos antes da eutanásia para evitar a agregação (floculação). Os filtros eram descartáveis e substituídos após cada utilização. Ao volume total da mistura, 250 ml, adicionaram-se 7.500 UI de heparina sódica (B Braun Medical, Portugal) para evitar a coagulação sanguínea *post-mortem*.

Após a administração do “indian ink” e com o animal em decúbito dorsal (Fig. 3.15) foi feita uma incisão cutânea na região inguinal da parede abdominal e na fáscia muscular. Seguidamente e por dissecação através do anel inguinal externo e do anel inguinal interno, foi localizada a aorta abdominal e a sua bifurcação em ilíaca externa e interna (Fig. 3.18.A). Foi colocada uma fita de nastro 2 USP (Nylon Tape – Polyamide 66; 3 mm X 70 cm, Ethicon™, Johnson&Johnson Int) e laqueada a aorta abdominal num ponto a 5 cm anterior à bifurcação. A artéria ilíaca interna foi também laqueada, na zona imediatamente posterior à sua origem. A aorta abdominal foi então cateterizada com um cateter de 16 1^{1/2}, ou 18 G (diâmetro variável de acordo com a dimensão do vaso) previamente cortado para se obter um comprimento de cerca de 2 cm (Fig. 3.18.B). Este cateter foi fixado por meio de sutura de seda 1/0 (Mersilk®) de forma

a ficar no interior do vaso. As Fig 3.16 e 3.17. apresentam em detalhe, as estruturas vasculares mencionadas. Foram injectados 250 ml de “indian ink”, utilizando um frasco de soro fisiológico de 500 ml acoplado a um sistema de venoclise (Fig 3.19) que foi, por sua vez, ligado ao cateter inserido na artéria aorta abdominal”.

A solução foi administrada na totalidade e, uma vez terminada, o cateter foi obliterado por um mandril de modo a não haver refluxo e perda de corante.

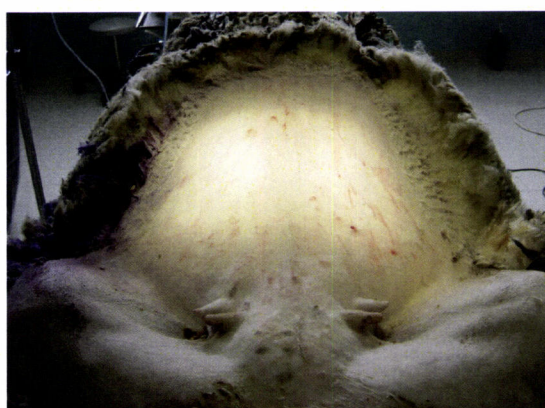


Fig. 3:15. - Acesso à cavidade abdominal.

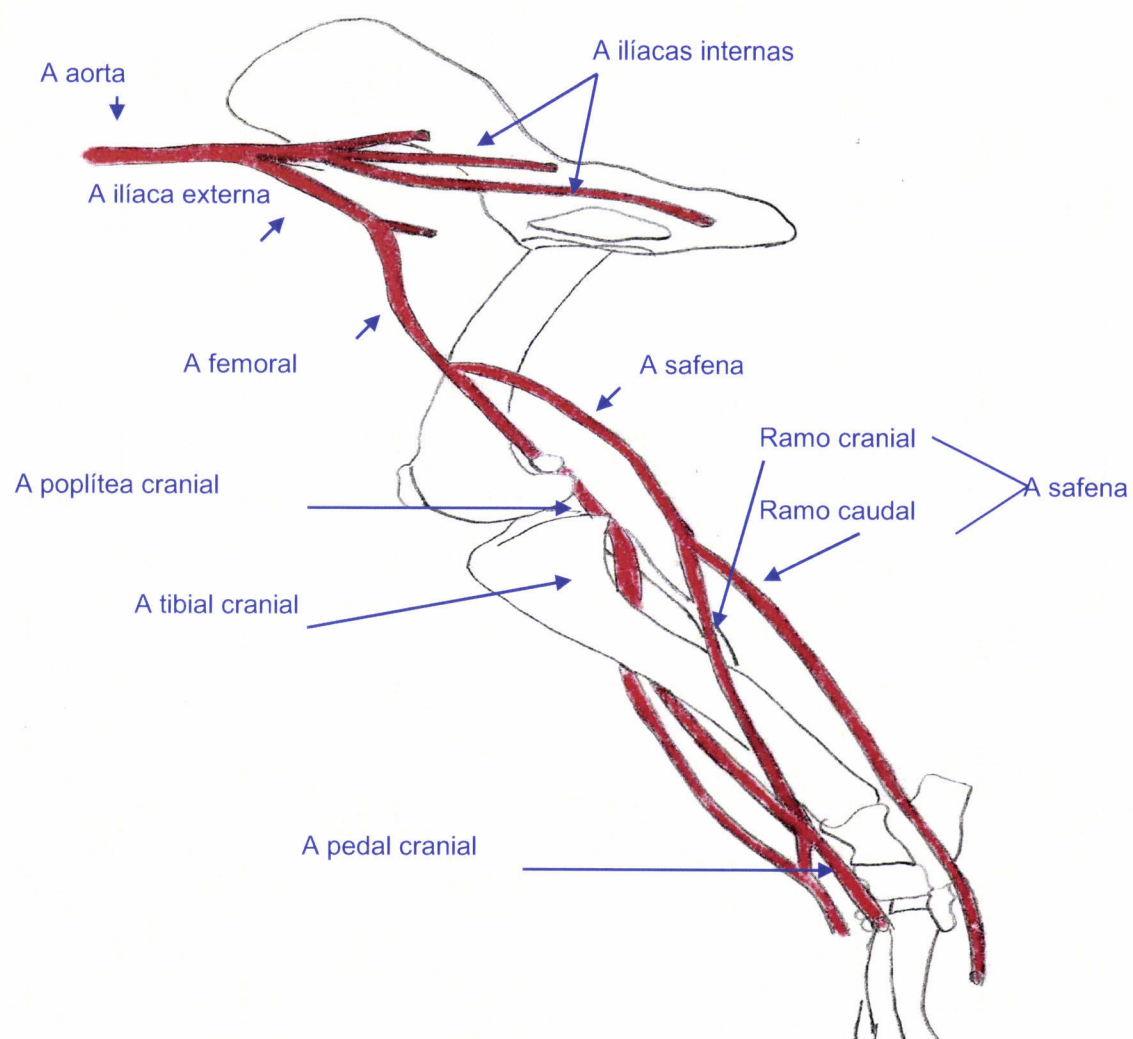


Fig. 3.16. – Esquema da irrigação do membro posterior de ovino adaptado de Barone (2000).

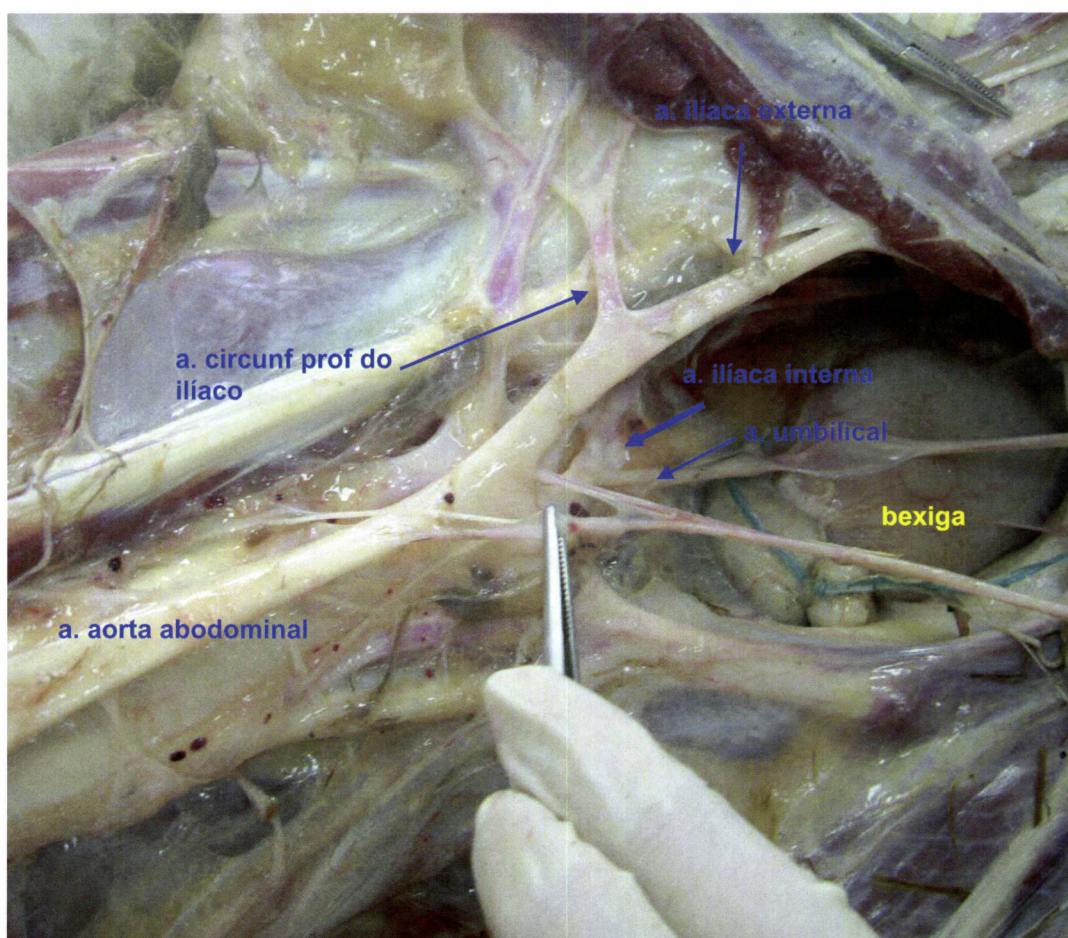


Fig. 3.17. Fotografia da zona inguinal de espécie ovina após dissecção para ilustrar a anatomia e os diferentes vasos interesse. (Cortesia do colega Ricardo Romão).

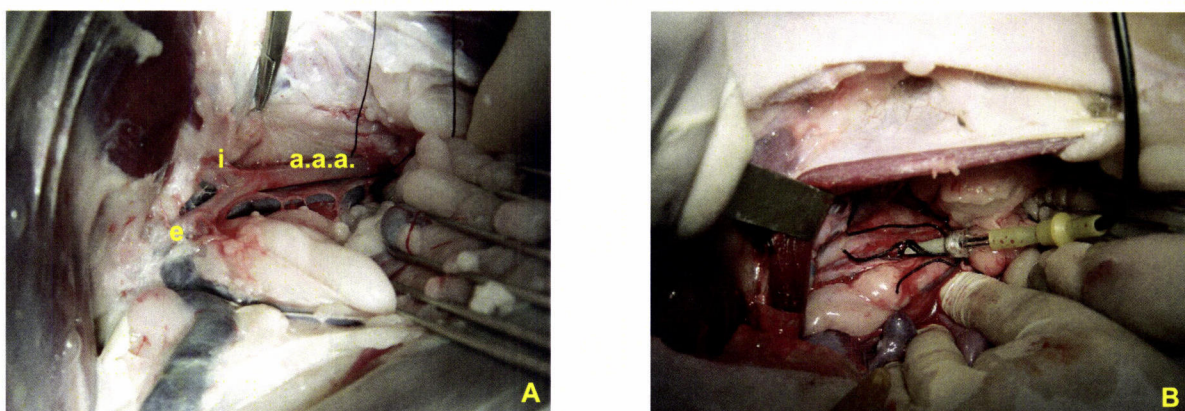


Fig. 3.18. A) a.a.a – Artéria aorta abdominal com bifurcação perfeitamente visível em i - ilíaca e e - interna e ilíaca externa **B)** Sutura colocada em redor da artéria aorta abdominal e sistema de venoclise adaptado à cânula colocada na aorta abdominal.



Fig. 3.19. – Sistema de venóclise para administração de “indian ink”.

Foram colhidos os espécimes com a dimensão o mais reduzida possível mas de forma a abranger todo o implante (Fig. 3.20 A e B). As peças foram limpas de toda a musculatura e tecidos moles envolventes e lavadas com soro fisiológico.

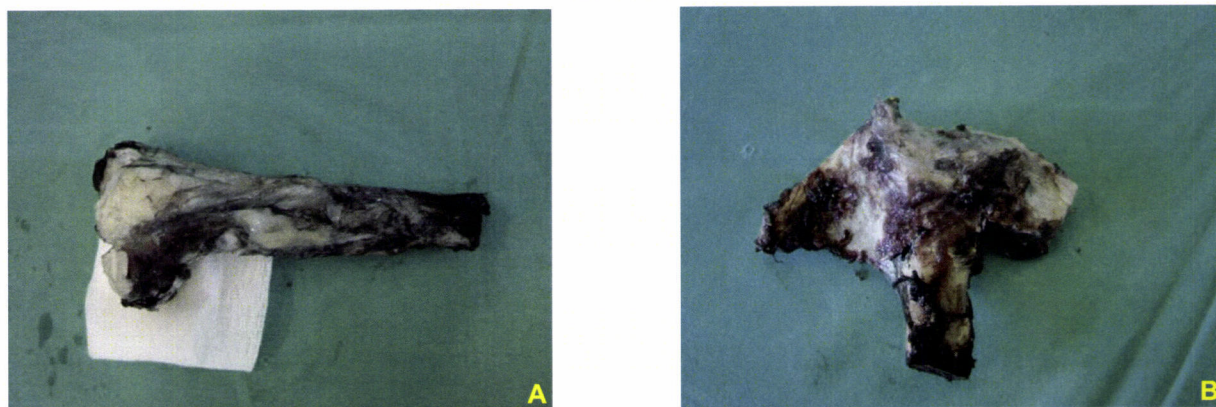


Fig. 3.20. A) Espécime tibial recolhido

B) Espécime ilíaco recolhido

3.3.4. Preservação e transporte dos espécimes

Os espécimes foram envolvidos em compressas esterilizadas e humedecidas com soluto de Lactato de Ringer (B. Braun Medical, Portugal) e colocados numa manga plástica selada a quente, devidamente identificada. Seguidamente os espécimes foram congelados a -18°C para avaliação posterior.

48 espécimes (24 tíbias e 24 ilíacos) foram transportadas congeladas em contentores adequados com gelo seco para os diferentes locais onde foram realizadas as análises:

- Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária - Tomografia axial computadorizada;
- Instituto Português de Oncologia, Centro Regional de Lisboa Francisco Gentil – Macrorradiografias;
- Universidade de Évora, Laboratório de Anatomia Patológica da Universidade de Évora – Fixação e coloração para microscopia óptica dos espécimes;
- Universidade de Coimbra, Laboratório de Histologia de Tecidos Duros da Faculdade de Medicina – Corte dos espécimes e preparação das lâminas histológicas.

3.4. Metodologia aplicada na avaliação da formação óssea

3.4.1. Técnicas radiológicas de avaliação

3.4.1.1. Tomografia axial computadorizada

Foram realizadas Tomografias Axiais Computorizadas para estudos tomodensiométricos das peças ósseas.

A unidade da tomografia computadorizada contém dois componentes principais, a unidade de varrimento e um sistema de controlo e análise computadorizada da imagem. A unidade de varrimento contém uma fonte emissora de Rx, um detector de radiação que pode medir a intensidade da radiação e atenuação produzida pelos tecidos estudados e ainda, um sistema mecânico que permite deslocamentos radiais, transversais e axiais do conjunto fonte-detector, permitindo atingir diferentes posições do osso. A amostra óssea é localizada centralmente entre a fonte e o detector com o auxílio de suportes especiais adaptados que permitem estudos *in vitro* e *in vivo*. O computador controla completamente o processo de varrimento e integra a informação obtida numa imagem tomográfica no monitor, dividida em pixels. Estas são pequenas áreas quadradas, com representação bidimensional da base de cada corte tomográfico tri-dimensional, com uma espessura constante predeterminada, sendo, por isso, mais propriamente chamados voxels. O seu número é fixo e representa uma característica da máquina.

Após ensaios preliminares, os espécimes foram colocados no sistema mecânico e fixos ao suporte, para serem analisados segundo duas projecções, axilar e sagital, em cortes de 2 mm (protocolo V13 – articulação: 120 kV X110 mAs). Para a avaliação dos espécimes, foi utilizada uma unidade de tomografia computadorizada quantitativa periférica num aparelho Tomoscan Av Sr 4000, software V1.OD (Philips, Países Baixos).

Este equipamento pode ser utilizado, quer em espécimes explantados quer *in vivo*.

Esta técnica mede o coeficiente de atenuação relativa dos Raios X pelo corpo estudado, comparativamente à atenuação pela água, sendo esta

proporcional à densidade óssea.

O software utilizado para trabalhar as imagens em termos de cálculo de áreas, densidades e volumes ósseos de interesse (VOI) foi o “EasyVision”, versão 5.2. (Philips, Países Baixos).

Processamento das imagens: de um conjunto de imagens que foi feito a cada espécime, foram seleccionadas as imagens de melhor qualidade (típicas) relativamente à visualização do defeito, e nestas foram calculadas (tendo por base as dimensões originais dos defeitos criados cirurgicamente), as áreas dos defeitos, os volumes e densidades ósseas medidas em pontos fixos. Nos defeitos tibiais foram observados 4 pontos de densidade óssea: 3 pontos de densidade periférica (extra-defeito, as duas corticais contra-laterais e a região do prato tibial) e um ponto localizado na zona central do defeito iatrogénico. Quanto aos defeitos da crista ilíaca foram também observados 3 pontos de densidade óssea periférica (zonas marginais do defeito, de ambos os lados e corticais da asa do ilíaco) e um ponto localizado na zona central do defeito iatrogénico. Essas zonas foram posteriormente estudadas e comparadas com as respectivas lâminas histológicas.

Foram também medidos quer na tibia quer no ilíaco os volumes ocupados pelas zonas correspondentes aos defeitos iatrogénicos.

3.4.1.2. Macrorradiografia:

Realizaram-se radiografias de contacto ou macrorradiografias de todas as peças para avaliação qualitativa morfológica da tibia e crista ilíaca.

Para a morfologia da tibia (Fig. 3.21 A) e do ilíaco (Fig 3.21 B) realizaram-se macrorradiografias com projecções ventro-dorsais, que permitiram uma visualização total dos espécimes para controlo imagiológico e orientação anatómica quanto aos locais a seccionar para os processamentos laboratoriais subsequentes. Nas imagens recolhidas foi medida a área corresponde às dimensões originais do defeito iatrogénico de forma a permitir delimitar a “região de interesse” para o corte das secções histológicas bem como pesquisar, qualitativamente, a existência de neoformação óssea

As macrorradiografias foram realizadas num aparelho para radiografia mamária (mamografia) de alta resolução, Senographe Dmr (GE Medical Systems, E.U.A). Foram realizadas duas projecções de forma a otimizar a imagem e sua posterior interpretação. A fase que envolveu o processamento por macrorradiografia dos espécimes foi realizada no Instituto Português de Oncologia, centro distrital de Lisboa – Gentil Martins.

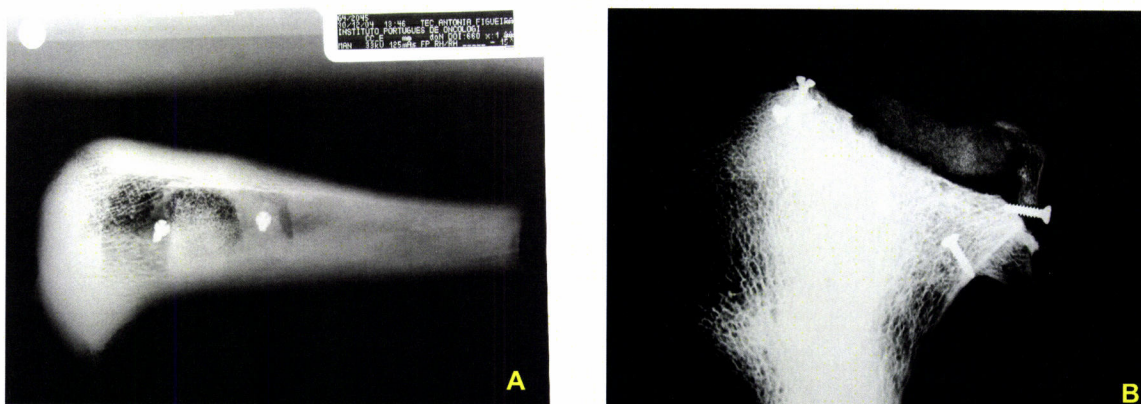


Fig. 3.21. – **A)** Imagem de macrorradiografia típica da tíbia. **B)** – Imagem de macrorradiografia típica do íliaco.

3.4.2. Técnicas histológicas e estudos histomorfométricos

3.4.2.1. Corantes intravitalis fluorescentes

Administração de substâncias para avaliação da cronologia da mineralização, anteriormente mencionado.

3.4.2.2. Histologia

a) Protocolo de preparação das secções histológicas

Para a fixação das peças foi utilizado formaldeído a 4%. O tempo de fixação foi de quinze dias para as tíbias e de trinta dias para os íliacos. Um possível inconveniente decorrente da utilização deste fixador em amostras de osso calcificado pode ser a sua progressiva transformação em ácido fórmico, o que a longo prazo desmineraliza o osso. Para evitar este fenómeno o formaldeído foi tamponado com carbonatos ou fosfatos com monitorização do pH da solução de

modo a manter a neutralidade. Uma alternativa consiste em fixar os espécimes em etanol a 70% de forma a prevenir a descalcificação.

Uma vez atingido o grau de fixação adequado, o processamento histológico das peças fixadas em formol foi realizado no Laboratório de Histologia de Tecidos Duros da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, de acordo com o protocolo usado neste laboratório para amostras de tecidos ósseos não descalcificados (Donath, 1995).

A avaliação histológica da regeneração óssea e da aposição óssea peri-implante requer técnicas de laboratório especializadas que permitam o estudo de tecidos duros sem necessidade da sua descalcificação. Neste trabalho foi utilizado o sistema EXAKT (Exakt Vertriebs, Norderstedt, Alemanha).

O processamento histológico das amostras consistiu essencialmente em 4 fases: fixação, infiltração, corte e coloração.

Após a fixação, os espécimes foram processados numa unidade de desidratação (Jkika Labortechnik HS 501 digital, Alemanha). Nesta unidade os espécimes passaram por soluções de etanol com gradientes crescentes até álcool absoluto (AGA – Portugal), por períodos de duas semanas, sendo a segunda semana sob vácuo. O processo de desidratação iniciou-se com uma solução de etanol a 60%, posteriormente a 80%, a 96% e por último a 100%. Seguidamente, iniciou-se o processo de infiltração com uma gradação entre de metil metacrilato MMA (Technovit 7200 VLC – Heraeus Kulzer, Wehrheim, Alemanha) e etanol das amostras ósseas não descalcificadas, tendo sido colocadas em frascos de vidro fechados, com concentrações decrescentes de etanol e crescentes de MMA, respectivamente: 70/30 %, 50/50 %, 30/70 %, 100%, 100 %, e adição de peróxido de benzoílo, BPO (Dibenzoyperoxid – Technovit 7100 – Kulzer, Alemanha). Na fase seguinte, as amostras foram foto-polimerizadas, numa unidade de foto-polimerização (Exakt 520 – Light-polymerization unit, Norderstedt, Alemanha). O MMA utilizado é o mesmo que para o processo de infiltração.

Seguidamente foram colocadas numa estufa ventilada a uma temperatura de 40°C, por um período de 48 horas (Gallenkamp, Alemanha) após o que foram feitos os cortes para obtenção de paralelismo. Estes cortes foram executados numa unidade de corte por ponto de contacto (Serra Exakt Band System 300

CL/CP, Norderstedt, Alemanha) e acompanhados com irrigação permanente. Os blocos foram reduzidos nos três planos do espaço. Estas secções foram tratadas seguidamente numa unidade de secagem, infiltração e polimerização (Exakt 530 – Block drying, Re-infiltration and polymerization device; Norderstedt, Alemanha). Esta unidade serviu para ocluir todos os poros e bolhas existentes nas amostras, usando o mesmo MMA utilizado para a infiltração e para a inclusão. Esta unidade serviu também para secar as amostras antes da colagem da amostra na lâmina, evitando assim um possível contacto com a água residente nas secções.

Estas secções foram coladas individualmente em lâminas com um produto próprio (Technovit 4000, Kulzer Heraeus, Wehrheim, Alemanha).

Fez-se seguidamente o polimento até à obtenção de uma superfície paralela ao plano pretendido. Este polimento é executado até à superfície sobre a área que se pretendeu observar ao microscópio. Esta fase designa-se por “facing” da secções e a unidade de polimento utilizada foi a Micro Grinding System Exakt 400 CS, com uma polidora de disco rotativo com lixas de papel em silicone carbide de grão crescente (800, 1200 e 4000).

As secções obtidas foram montadas e coladas numa lâmina final, numa unidade de polimerização de Cola (Exakt TYP/nº 42/344, Norderstedt, Alemanha). Estas duas lâminas montadas em “sandwich” foram separadas na unidade de corte, ficando assim uma lâmina com um corte em bruto e uma segunda lâmina ou lâmina final, que foi polida até à obtenção de uma espessura final de 100 µm. Para os estudos de microscopia óptica, com luz polarizada e de fluorescência, procedeu-se ao desgaste das secções de 400 µm até aos 100 µm de espessura, com recurso a uma polidora rotativa constituída por dois pratos de vidro com micro-rugosidades, um grande da própria máquina e outro manual, preparados por compressão de areia de silicone e água, entre ambos os pratos. As secções de 400 µm foram colocadas entre dois discos e comprimidas durante a rotação dos mesmos, sob irrigação constante de uma solução aquosa de etanol a 40% e gotas de nitrato de sódio a 5%. Foram para tal utilizadas lixas de grão 1000, 1200, 2500 e terminando-se com 4000 (Hermes, Silicon Carbide, E.U.A.). Devem ser utilizadas lixas de grão crescente. As secções paralelas dos espécimes com 100 µm de espessura foram obtidas com o Exakt Micro Grinding System (Typ Aw-10 Exakt

Apparatebau, Nordestedt, Germany) com uma lixa de grão de diamante P1200 e Typ AW-110 com papel de grão de silicone.

A espessura das secções foi sistematicamente monitorizada com um micrómetro digital (Mitutoyo 2093, Digimatic Micrometer, Japão).

Neste estudo foram feitas seis secções de cada peça sendo que a área de corte determinada foi a área central do implante. A determinação da área de corte foi feita pela visualização das imagens obtidas por macrorradiografia. A área seleccionada para corte correspondeu à zona de colocação do implante ósseo e, sempre que possível, foi preservada na sua totalidade. Nos espécimes de dimensões superiores, foi dada preferência à zona central do defeito. Nesta fase assumiu-se que se o centro e a zona central do biomaterial originalmente colocado já tinham sido substituídos por osso neoformado, a restante zona do defeito ósseo também já teria sido substituída e estaria sob um processo de remodelação óssea (Nuss *et al.*, 2006).

b) Colorações

Giemsa-Eosina – Cada lâmina foi mergulhada em ácido fórmico a 1%, durante 20 segundos sendo de seguida lavada em abundante água corrente durante 5 a 10 minutos. Posteriormente foi seca em papel de filtro e corada, de forma sequencial, com uma solução de Giemsa e uma solução de eosina. A solução de Giemsa comercial (Merck 109204, Alemanha), preparada a 15% foi aquecida num forno microondas durante 30 segundos, a uma potência de 700 W, e mantida numa estufa a 57° C onde as lâminas são imersas durante 45 minutos (o tempo pode variar entre 10 a 60 minutos). Ao fim deste período as lâminas foram lavadas com água destilada e secas em papel de filtro.

Posteriormente foi preparada a solução de eosina Y a 1% (Merck 115935, Alemanha) adicionando 22 gotas de ácido acético glacial a 100 ml de solução stock segundo instruções do fabricante. As lâminas permaneceram nessa solução 90 segundos (o tempo pode variar entre 60 a 120 segundos). De seguida as lâminas foram mergulhadas numa sequência de solução de etanol a 70%, etanol a 96% e, por fim, etanol absoluto. Finalmente foram secas em papel de filtro e

observadas ao microscópio óptico.

As secções mais representativas de cada espécime (típicas) foram seleccionadas para a microscopia óptica e foram fotografadas com ampliações (X4, X10 e X40). O microscópio utilizado foi um Olympus BX41 (Olympus, Portugal), com uma máquina fotográfica, Olympus PM-20 acoplada (Olympus, Portugal). Aquele microscópio permitiu realizar microscopia óptica e de fluorescência, com os filtros apropriados. O software utilizado para trabalhar as imagens foi o Cell A (Olympus, Portugal).

A avaliação da matriz extracelular foi feita utilizando luz polarizada. Neste caso foram utilizadas lâminas não coradas de forma a visualizar o tipo de padrão das fibras de colagénio, podendo assim identificar o tipo de colagénio na ligação ao implante ósseo. A natureza anisotrópica das fibras de colagénio faz com que apareçam como fibras muito brilhantes em campo escuro (Fig. 3.22.)

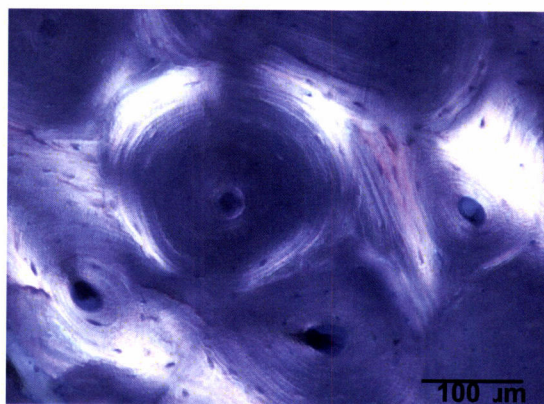


Fig. 3.22 – Imagem típica observada com luz polarizada (Fotografias X100). Microscópio Nikon Eclipse 600, imagens obtidas através de câmara digital Nikon DN100.

3.4.2.3. Avaliação do defeito tibial

Todas as lâminas foram fotografadas com uma máquina fotográfica digital Olympus μ 700 (7,1 Megapixel) em condições standard de luminosidade, fixação e distância focal de 30 cm.

Em todos os grupos e em todas as lâminas foi medida a distância entre os pontos X - Z (Fig. 3.24.) e foi calculado um ponto médio, C, a partir do qual foram

medidos 7,5 mm para ambos os lados, correspondente ao defeito ósseo criado. Nestes 15 mm foi medida a área de neoformação óssea (Fig.3.24. e 3.25.) bem como o número, diâmetro e densidade dos osteónios existentes. As distâncias X - Y e Y - Z foram medidas e nos seus pontos médios, A e B, são medidas as respectivas espessuras corticais (Fig.3.24.) bem como o número e diâmetro dos osteónios existentes (Fig 3.26 e 3.27). A densidade dos osteónios foi calculada através do *ratio* entre o número de osteónios e a área da secção, de acordo com Zedda *et al.*, (2008). A contagem do número e diâmetro dos osteónios foi obtida a partir de uma média destes valores encontrados em dois campos da tíbia, corticais laterais e na zona do defeito iatrogénico, como anteriormente referido. No estudo imagiológico foi feita uma média e comparação de três valores de densidades ósseas periféricas (extra-defeito), um valor de densidade do próprio defeito e uma “region of interest”, ROI, determinada, que correspondeu ao volume do defeito criado. Todos estes valores foram obtidos nos estudos realizados na TAC.

O estudo estatístico para a tíbia baseou-se numa comparação de três valores de densidades ósseas periféricas (extra-defeito) e um valor de densidade do próprio defeito obtidos nos estudos realizados na TAC e uma ROI determinada que correspondeu ao volume do defeito criado. Os valores de densidade colhidos referem-se aos valores da zona do defeito e a três valores periféricos ao defeito. Baseou-se também, como referido anteriormente, na colheita de dados obtida a partir do estudo histomorfométrico efectuado e neste foram obtidas: diferenças na espessura média das corticais laterais da tíbia; TAM; N.º médio de osteónios por campo óptico; diâmetro médio dos osteónios por campo óptico; densidade de osteónios por campo óptico. Este estudo foi feito para todos os espécimes.

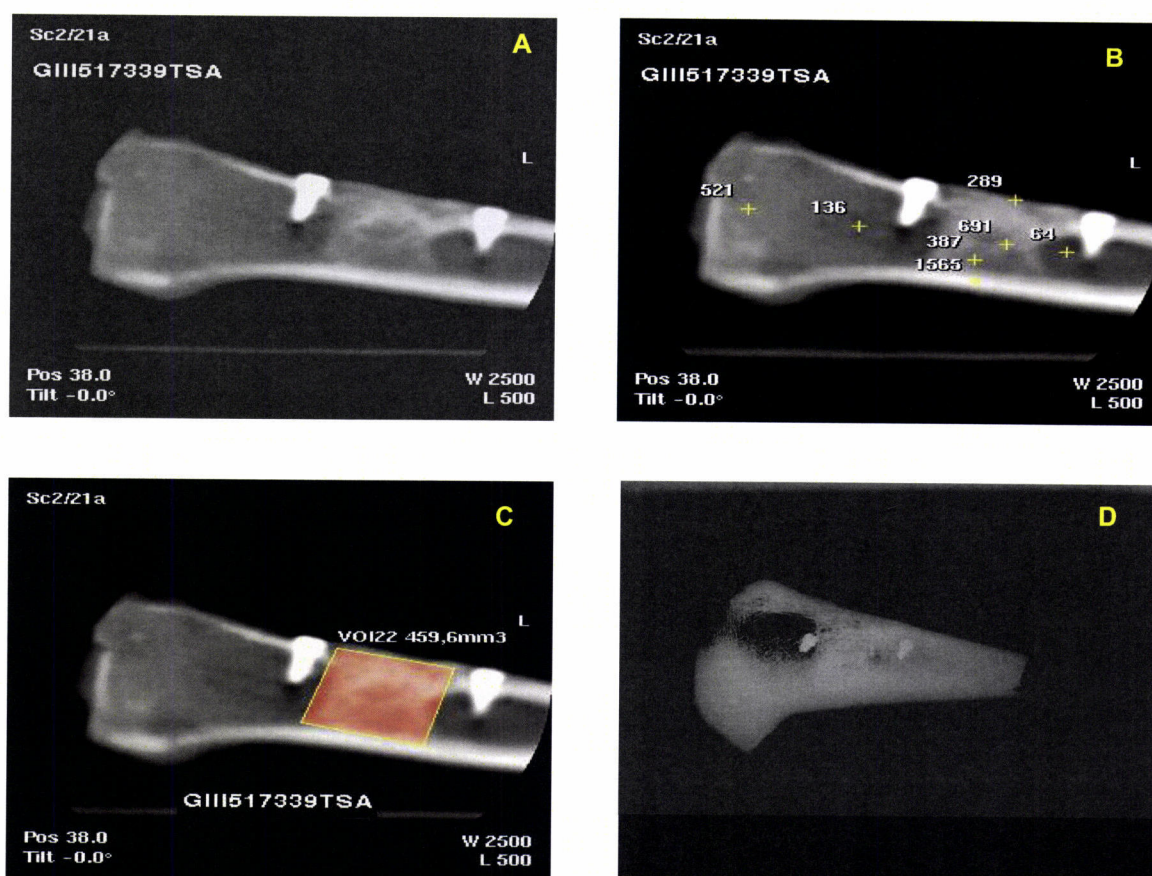


Fig. 3.23 – Exemplo do estudo típico efectuado para cada um dos espécimes tibiais. **A)** Tíbia com implante e membrana; **B)** Medições de densidade óssea; **C)** Medições do volume dos defeitos; **D)** Macrorradiografia. Este estudo foi feito para todos os espécimes.

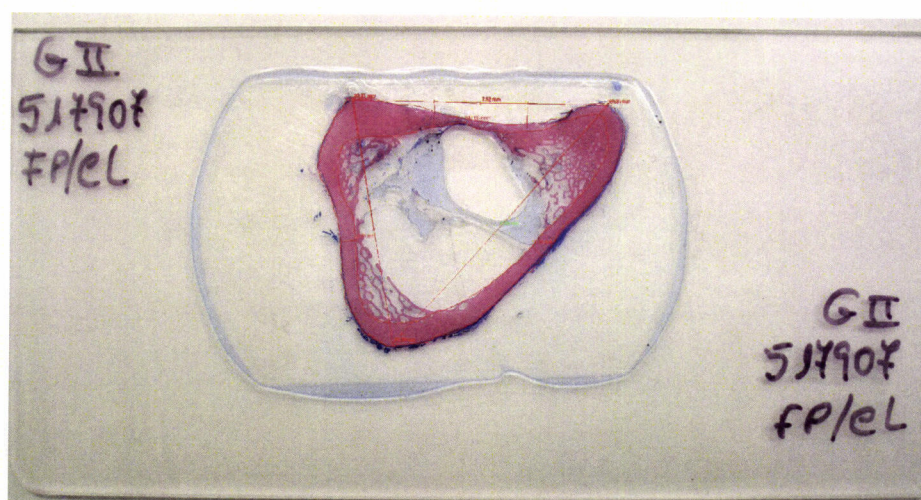


Fig. 3.24. – Lâmina da tíbia típica para a qual o software Cell A permite demarcar a área de estudo. Coloração Giemsa-eosina.

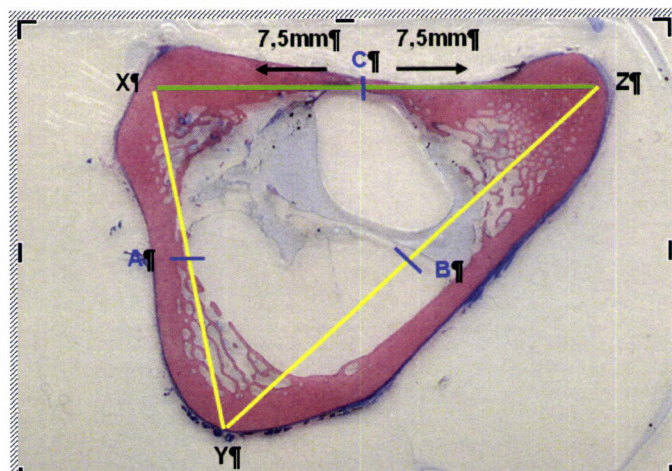


Fig.3.25 – Explicação gráfica do estudo histomorfométrico típico efectuado sobre a imagem da lâmina. Coloração Giemsa-eosina.

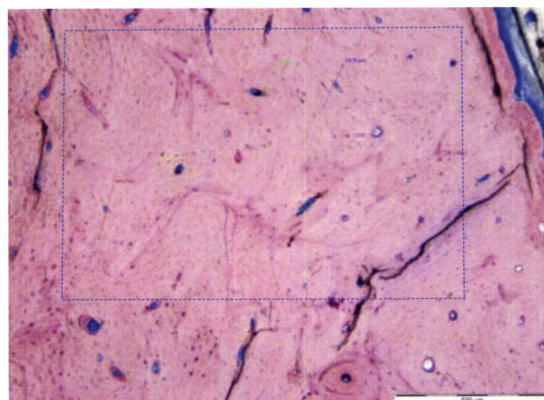


Fig. 3.26 – Exemplo típico de um dos três Campos ópticos seleccionados para as médias das medições histomorfométricas. Coloração Giemsa-eosina.

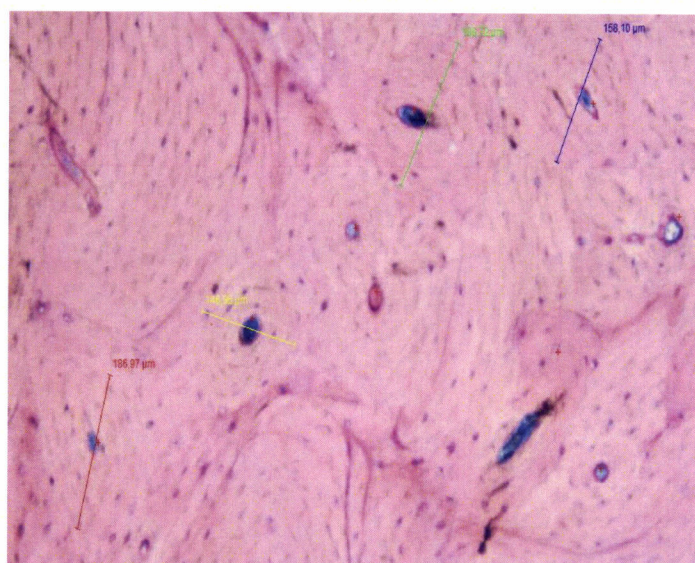


Fig. 3.27. - Pormenor do rectângulo tracejado na **Fig. 3.26**.

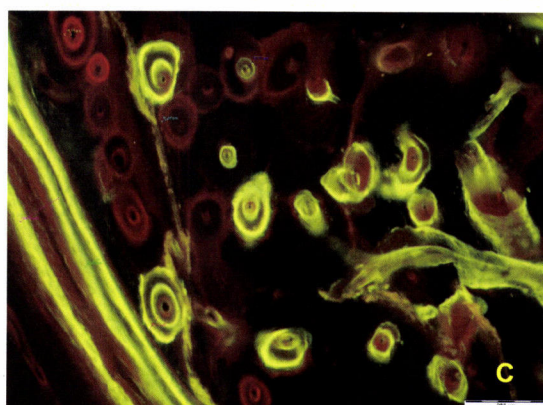
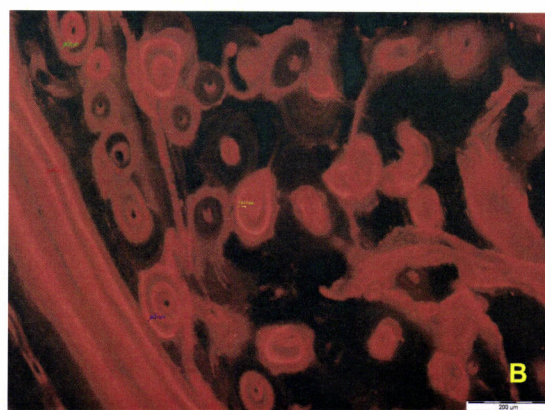
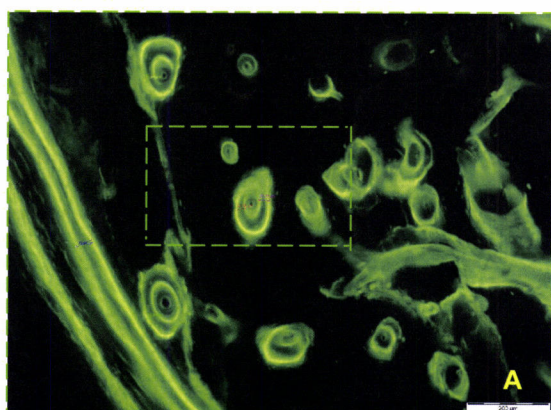


Fig. 3.28. – Sequência típica de visualização dos corantes intravitais fluorescentes na cavidade medular da tíbia: **A)** calceína verde; **B)** laranja de xilenol e **C)** Marcação dupla de fluorescências.

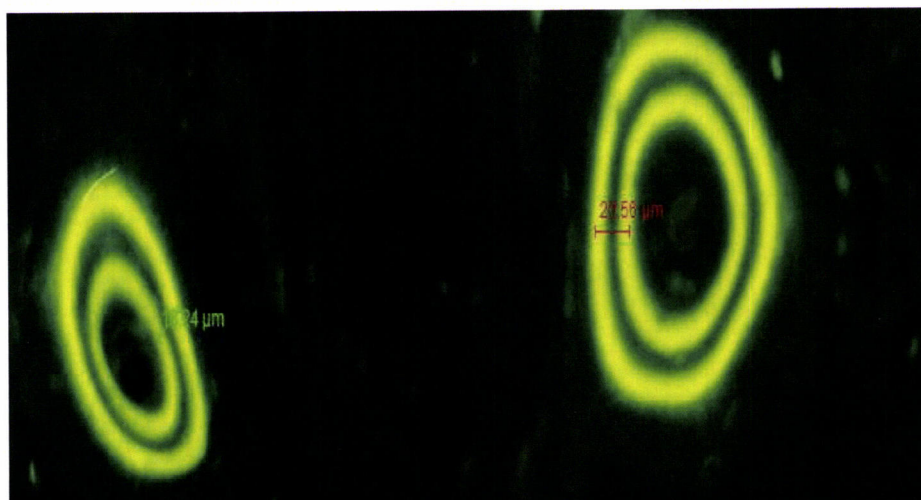


Fig. 3.29. – Pormenor correspondente ao tracejado da figura 3.28.

3.4.2.4. Avaliação do defeito ilíaco

Todas as lâminas foram fotografadas com uma máquina fotográfica digital Olympus μ 700 (7,1 Megapixel) (Olympus, Portugal) em condições standard de luminosidade, fixação e distância, 30 cm. Foi feita uma avaliação macroscópica qualitativa de todas as lâminas, não tendo sido efectuado um estudo estatístico desta avaliação qualitativa ao osso ilíaco.

O estudo estatístico para o osso ilíaco baseou-se numa comparação de três valores de densidades ósseas periféricas (extra-defeito), um valor de densidade do próprio defeito e uma ROI determinada que correspondeu ao volume do defeito criado (Fig 3.30. B e C). Todos estes valores foram obtidos nos estudos realizados na TAC. Este estudo foi feito para todos os espécimes.

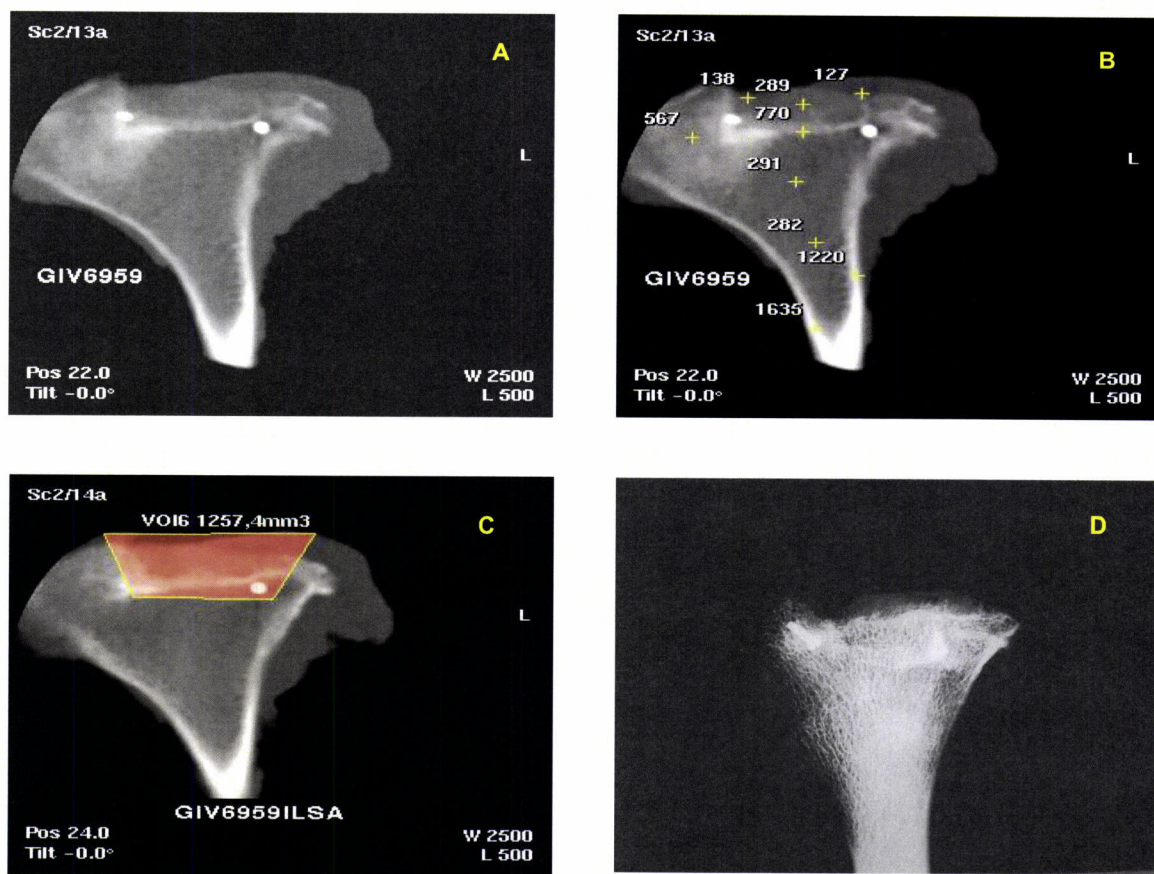


Fig. 3.30. – Imagens típicas da crista ilíaca: **A** – TAC; **B** – Tac com valores de densidade óssea (HU); **C** – Tac com medição de volume do defeito; **D** – Macrorradiografia. Este estudo foi feito para todos os espécimes

3.4.3. Estudo estatístico

A avaliação global das peças foi feita por comparação de dados recolhidos nas imagens de radiografia convencional, macrorradiografia, tomografia axial computadorizada, histologia e avaliação estatística.

Devido à diversidade das variáveis em estudo e à forma como foram obtidas, estas foram analisadas de acordo com modelos específicos. Nestes, foram analisadas as respectivas estatísticas descritivas e as causas ou efeitos sistemáticos que sobre elas actuaram de forma a caracterizar cada variável associada a cada grupo. As variáveis dependentes foram analisadas para avaliação da normalidade segundo o teste Kolmogorov-Smirnov e da homogeneidade da variância segundo o teste Levene.

As variáveis dependentes (espessura média das corticais laterais, n.º médio osteónios/campo óptico, diâmetros médios de osteónios/campo óptico, densidade média dos osteónios/campo óptico e taxa média de aposição mineral) foram estudadas através de análises de variância ortogonal, segundo modelo geral linear, cujo factor fixo corresponde às quatro substâncias estudadas (S), entre as quais o controlo, de acordo com modelo matemático-estatístico (Modelo II):

$$Y_{ij} = \mu + S_j + \varepsilon_{ij}$$

Em que: Y_{ij} – valor observado das variáveis medidas no local j -ésimo, com a Substância i -ésima; μ – Valor médio observado; S_j – Efeito fixo da substância em estudo i -ésima; e ε_{ijk} – Erro aleatório ou valor residual de cada observação.

As variáveis dependentes (volume do defeito, densidade óssea periférica e densidade óssea do defeito) foram estudadas através de análises de variância ortogonal, segundo modelo geral linear, cujos factores fixos foram os dois ossos estudados (tíbia e ilíaco) (O) e às quatro substâncias estudadas (S), de entre as quais o controlo, de acordo com modelo matemático-estatístico (Modelo II):

$$Y_{ijk} = \mu + O_i + S_j + O.S_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Em que: Y_{ijk} – valor observado das variáveis medidas no local k -ésimo, no Osso i -ésimo e com a Substância j -ésima; μ – Valor médio observado; O_i – Efeito fixo do osso i -ésimo; S_j – Efeito fixo da substância em estudo j -ésima; $O.S_{ij}$ – Interação dupla do Osso com a Substância e ε_{ijk} – Erro aleatório ou valor residual de cada

observação.

Em todas as análises de variância foram considerados como valores significativos, aqueles cuja probabilidade de ocorrência foi superior a 95% ($P < 0,05$). Sempre que se verificaram diferenças significativas nas análises de variância relativamente aos factores e às interacções, as respectivas médias foram comparadas pelo método de Tukey-Hsu.

Os resultados foram analisados utilizando os programas de estatística SPSS15.0 e o NCSS 2000. Estes testes compararam os seguintes parâmetros:

- Espessura média das corticais laterais da tíbia;
- N.º médio de osteónios por campo óptico;
- Diâmetro médio dos osteónios por campo óptico;
- Densidade de osteónios por campo óptico;
- TAM (MAR) média;
- Volume ósseo ocupado pelo defeito da tíbia;
- Valor médio de densidade óssea periférica da tíbia (extra-defeito);
- Valor de densidade óssea no próprio defeito da tíbia;
- Volume ósseo ocupado pelo defeito do ilíaco;
- Valor médio de densidade óssea periférica do ilíaco (extra-defeito);
- Valor de densidade óssea no próprio defeito do ilíaco.

Entendendo a que as secções para preparação de histologia são, tanto quanto possível da totalidade da zona do defeito, esta imagem foi comparada com a imagem recolhida na TAC, de forma a comparar a zona de existência de osso neoformado observável macro e microscopicamente. O osso neoformado foi procurado na zona central do defeito, ocupada pelo implante bem como nas zonas de ligação osso nativo-implante bem como as corticais laterais.

Uma vez observada na lâmina a zona correspondente ao osso neoformado, foi, esta mesma zona medida na imagem de TAC, recorrendo ao software do aparelho mencionado anteriormente, de forma a poder calcular áreas, volumes e densidades ósseas nos seguintes pontos “críticos”: zona central, zonas de topos ósseos e zona de ligação osso nativo-implante. Foram também medidas as

densidades ósseas nas zonas de osso cortical à periferia do defeito, como referido anteriormente.

Embora exista no mercado software e equipamento específicos para histomorfometria óssea como o Bioquant (Nashville, E.U.A.) e Osteomeasure (Osteometrics, Decatur, E.U.A.), estes não foram utilizados devido a limitações de ordem financeira. Optámos pela avaliação qualitativa exaustiva da histomorfometria das imagens microscópicas, das macrorradiografias e das TAC recolhidas da tíbia (Fig. 3.23. A, B, C e D) e do íliaco (Fig 3.30 A, B, C e D), e uma avaliação quantitativa dos dados, cuja comparação é significativa para a avaliação da formação de osso neoformado, ou seja, os valores de densidade em três “pontos críticos” para a tíbia e para o íliaco, os volumes ósseos dos defeitos criados e os parâmetros histomorfométricos, já anteriormente mencionados.

Relativamente às medições feitas no osso cortical e esponjoso, utilizámos a nomenclatura aprovada pela American Society of Bone and Mineral Research ASBMR (Parfitt *et al.*, 1987). Os volumes medidos nas lâminas correspondem na realidade a áreas, dado as imagens serem bidimensionais. A razão justifica-se pelo facto de estes valores oferecerem a possibilidade de estimativa inferida da organização espacial da rede de osso trabecular (Parfitt, 1987).

Para ambos os defeitos foi também utilizada a taxa de aposição mineral TAM, recorrendo à microscopia de fluorescência (Fig. 3.28 e 3.29.). A sua avaliação fez-se medido a distância entre as duas marcações e dividindo o tempo que mediou entre elas, $v=s+t$ (Cano-Sánchez *et al.*, 2005; Rauch, 2006). A TAM reflectiu a taxa segundo a qual novo osso é depositado no local do defeito, indicando assim a velocidade de regeneração. Pode medir-se como a distância entre os dois pontos médios em duas marcações sequenciais, dividido pelo tempo entre os dois pontos médios (Parfitt *et al.*, 1987).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Validade do modelo cirúrgico

Nenhum animal operado apresentou quaisquer complicações pós-operatórias (perdas de implantes ou sinais de infecção) e todos recuperaram a total mobilidade por volta da 10^a semana, traduzindo-se pelo apoio normal do membro operado, quer em repouso (estação) quer durante a marcha.

4.2 Avaliação qualitativa dos resultados

Comparação de resultados histomorfométricos e imagiológicos

GRUPO I

Pela análise dos resultados obtidos nas tomografias, macrorradiografias e nas lâminas histológicas e para o grupo I (grupo controlo), foi possível verificar que nos defeitos criados não houve regeneração óssea capaz de preencher o referido defeito, o que consubstancia o facto do defeito ser crítico (Fig 4.1. A, B, C e D e Fig. 4.2. A, B, C e D), verificando-se apenas uma regeneração óssea nas margens do defeito.

Na cortical lateral dos defeitos tibiais foi patente a aproximação das extremidades ósseas sem que no entanto houvesse, nos 5 de 6 animais que constituíam este grupo, uma união que permitisse uma continuidade da cortical externa. Apenas para o espécime GI928 foi observada uma união da cortical externa embora não totalmente visível na TAC. Observou-se de forma significativa a invaginação de tecidos moldes circundantes para o interior da área do defeito (Fig. 4.3.).

Na cavidade medular não foram visíveis para nenhum dos espécimes, “ilhas” de osso cortical (Fig. 4.3.).

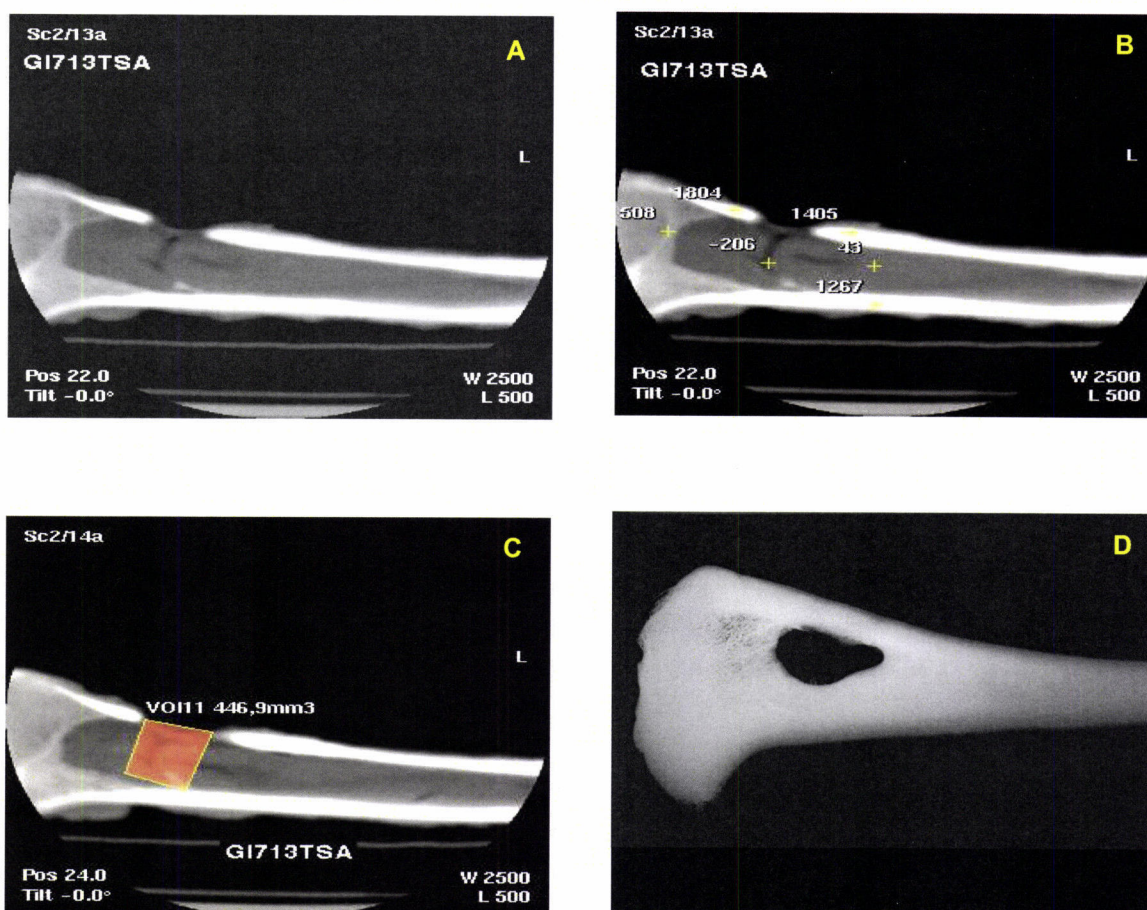


Fig. 4.1. – Imagens tibiais típicas de GI: **A** – TAC; **B** – Tac com valores de densidade óssea (UH); **C** – Tac com medição de volume do defeito; **D** – Macrorradiografia.

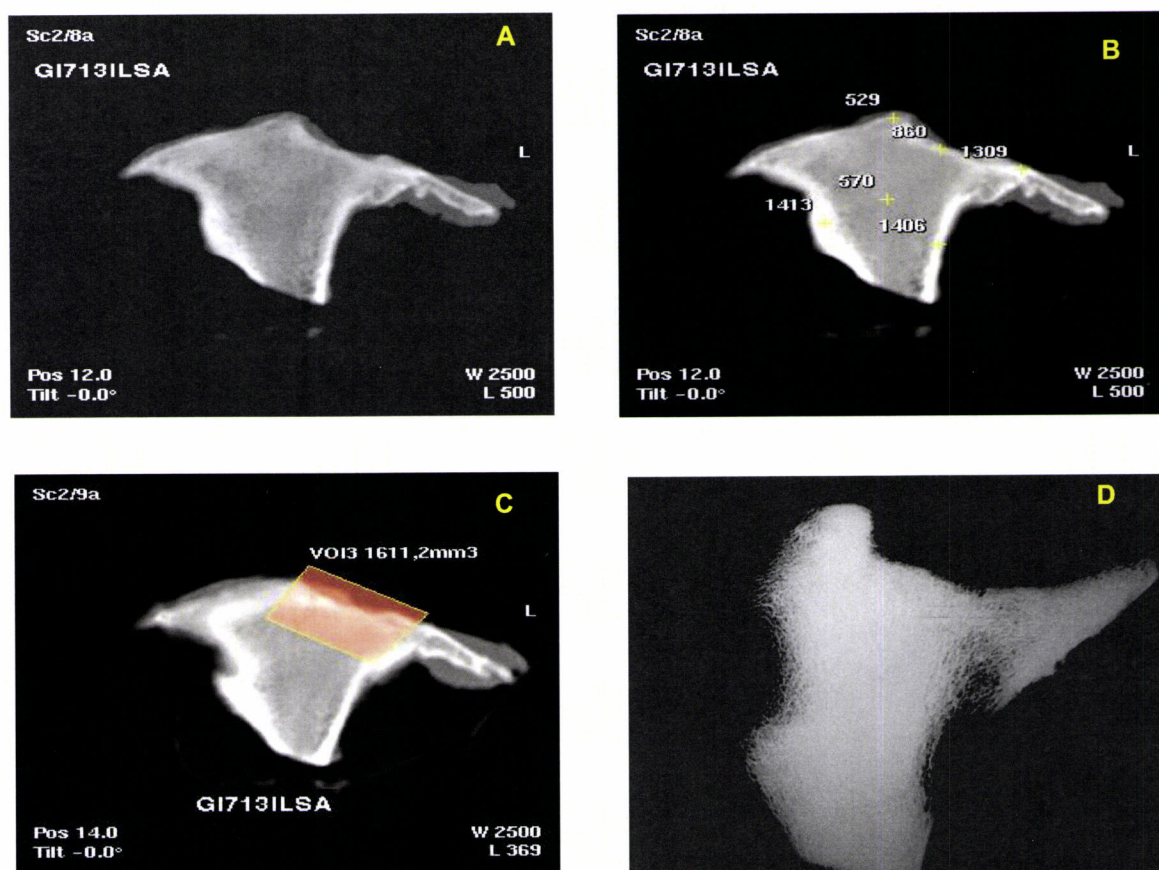


Fig. 4.2. – Imagens típicas da crista ilíaca de GI: **A** – TAC; **B** – Tac com valores de densidade óssea (UH); **C** – Tac com medição de volume do defeito; **D** – Macrorradiografia.

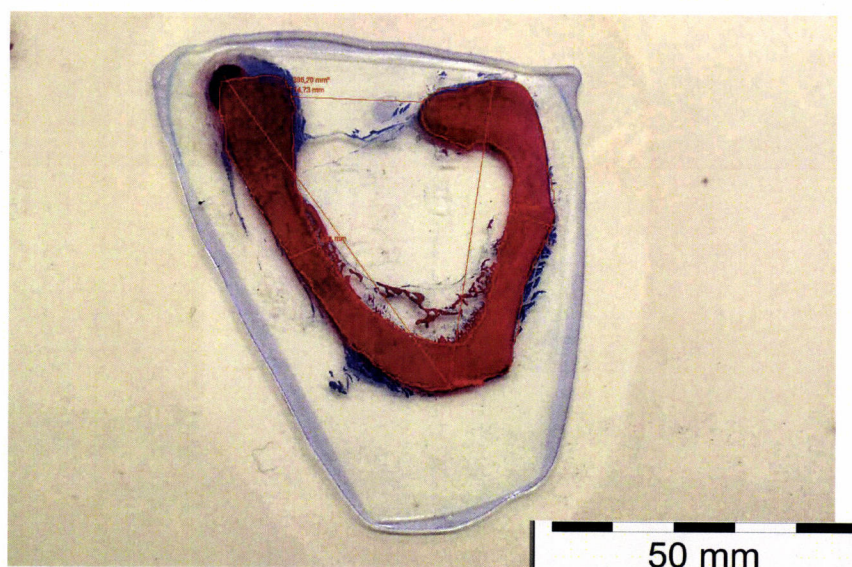


Fig. 4.3. Imagem tibial típica do estudo histomorfométrico realizado.
Coloração Giemsa-eosina.

GRUPO II

Pela análise dos resultados obtidos nas tomografias, macrorradiografias e nas lâminas histológicas e para o grupo II, grupo em que os defeitos foram cobertos apenas com uma membrana de ácido poli(L/DL-láctico) 80/20 foi observável uma presença significativa de osso neoformado nas extremidades dos defeitos tibiais (Fig. 4.4. A, B, C e D e Fig. 4.5. A, B, C e D) e, em todos os espécimes que constituíam este grupo, houve uma continuidade óssea no local da osteotomia realizada para a criação do defeito. O facto do defeito ter estado protegido pela membrana permitiu, como referido anteriormente, uma osteogénese mais eficaz e uma óbvia redução da invaginação dos tecidos moles. A cortical que restabeleceu o contacto entre as extremidades ósseas separadas (Fig. 4.6.), apresentou uma menor espessura de osso compacto relativamente aos grupos tratados com esponjas de poliuretano.

Na cavidade medular não foram observáveis, para nenhum dos espécimes, “ilhas” de osso cortical (Fig. 4.6.) ao contrário do que se observou nos grupos tratados com esponjas de poliuretano. Observou-se crescimento de tecido ósseo guiado para o interior dos poros da membrana e ao longo da superfície da mesma (Fig. 4.7. e Fig 4.8).

Na Fig. 4.9. é visível uma das extremidades da membrana totalmente

envolvida por osso neoformado.

Quanto aos defeitos dos ilíacos foi notória a maior quantidade de osso neoformado presente na zona do defeito e na periferia do mesmo (Fig. 4.5. B e D).

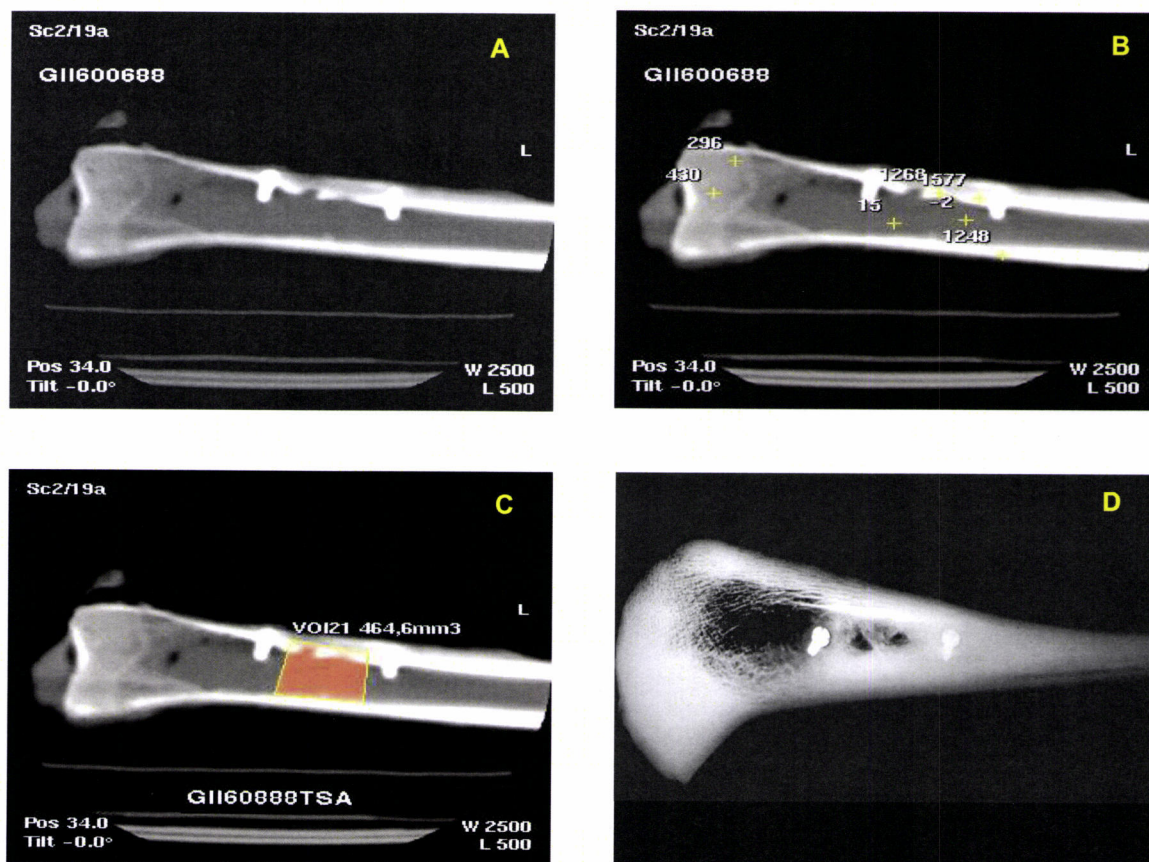


Fig. 4.4. - Imagens tibiais típicas de GII: **A** – TAC; **B** – Tac com valores de densidade óssea (UH); **C** – Tac com medição de volume do defeito; **D** – Macrorradiografia.

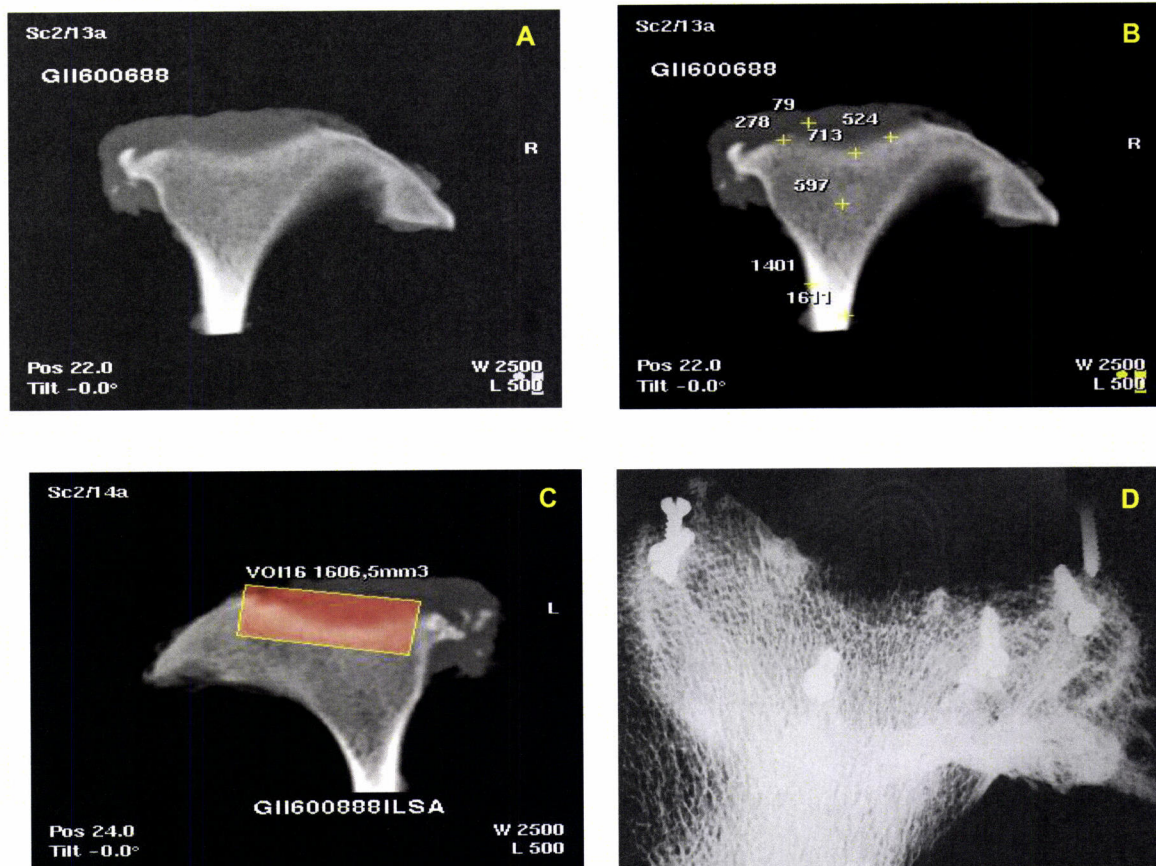


Fig. 4.5. - Imagens típicas da crista ilíaca de GII: **A** – TAC; **B** – Tac com valores de densidade óssea (UH); **C** – Tac com medição de volume do defeito; **D** – Macrorradiografia

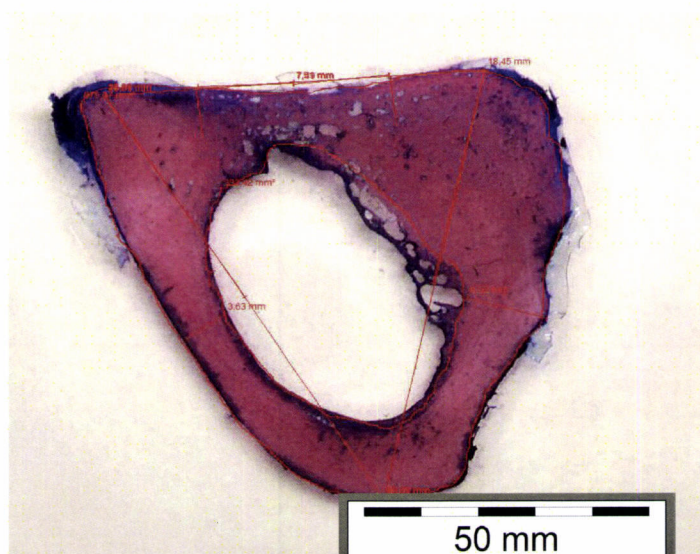


Fig. 4.6. - Imagem tibial típica do estudo histomorfométrico realizado. Coloração Giemsa-eosina

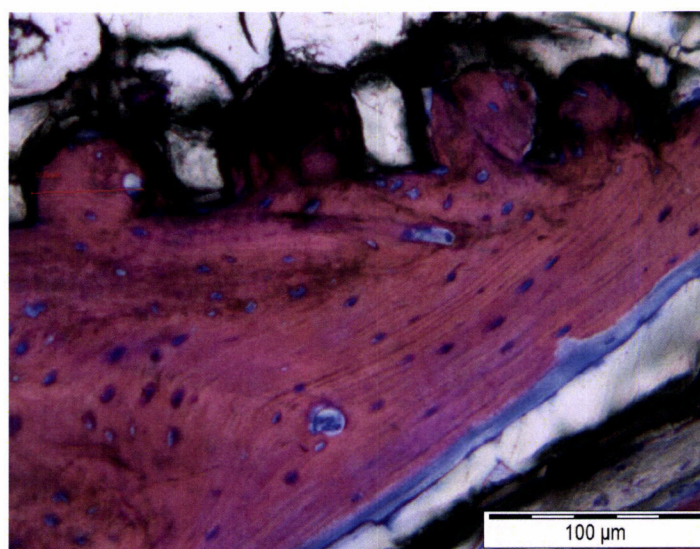


Fig. 4.7. – Imagem microscópica típica em é visível a formação de osso neoformado para o interior dos poros da membrana. Coloração Giemsa-eosina.

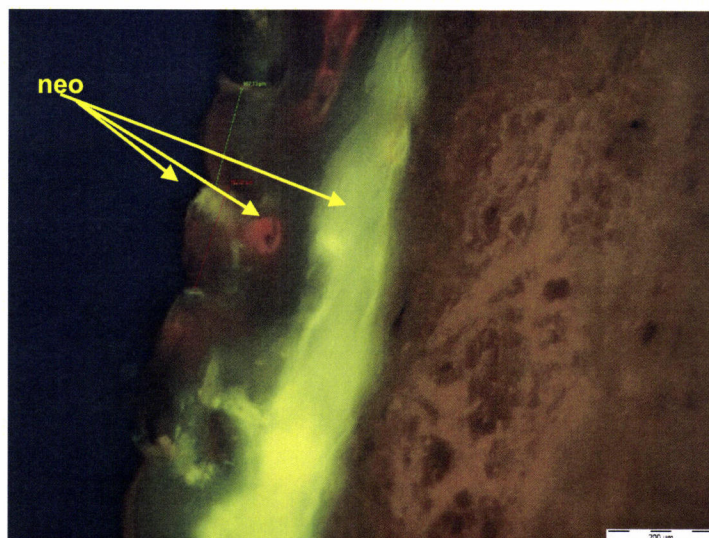


Fig.4.8. – Imagem microscópica típica com coloração fluorescente intravital. É visível a formação de osso neoformado para o interior dos poros da membrana (**neo**) e em directo contacto com esta.

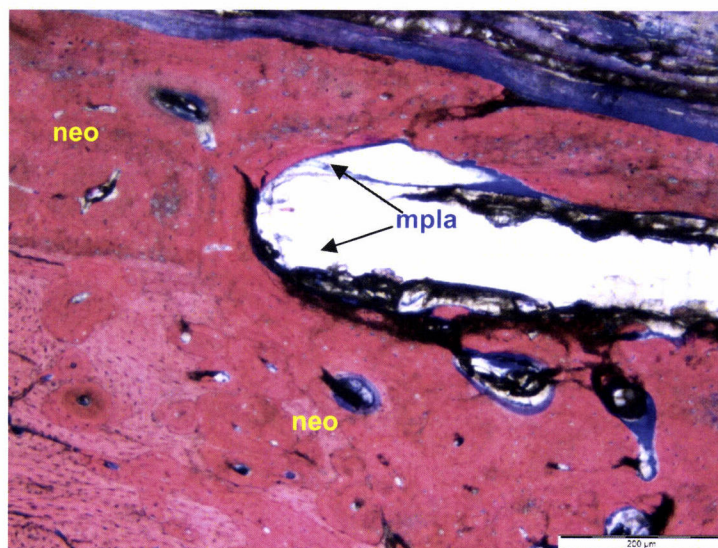


Fig. 4.9. Extremidade da membrana (**mpla**) rodeada de osso neoformado (**neo**). Coloração Giemsa-eosina.

GRUPO III

Pela análise dos resultados obtidos nas tomografias, macrorradiografias e nas lâminas histológicas e para o grupo III, grupo tratado com esponja de poliuretano enriquecida com sistema de creatina e putrescina (composição A), foi evidente a exuberante quantidade de osso neoformado quer nos defeitos tibiais,

quer nos defeitos ilíacos (Fig. 4.10 A, B, C e D Fig 4.11. A, B, C e D e Fig. 4.12.).

Na cavidade medular foram observáveis em todos os espécimes grande abundância de “ilhotas” de osso cortical. Este dado constituiu um indicador extraordinariamente importante da capacidade osteoindutora deste material em teste.

Nos defeitos da crista ilíaca deste grupo III observou-se macro e microscopicamente, preenchimento do defeito ósseo com neoformação óssea (Fig. 4.10. A, B, C e D).

Em todos os espécimes que constituíam este grupo houve uma continuidade óssea completa no local da osteotomia realizada para a criação do defeito. À semelhança do que foi descrito para o grupo II, observou-se crescimento de tecido ósseo guiado para o interior dos poros da membrana (Fig. 4.15.) e ao longo da superfície da mesma, tendo sido observadas inúmeras células osteogénicas no interior dos poros da membrana (Fig. 4.13., Fig. 4.14.), assim como fenómenos de angiogénese (Fig. 4.15.).

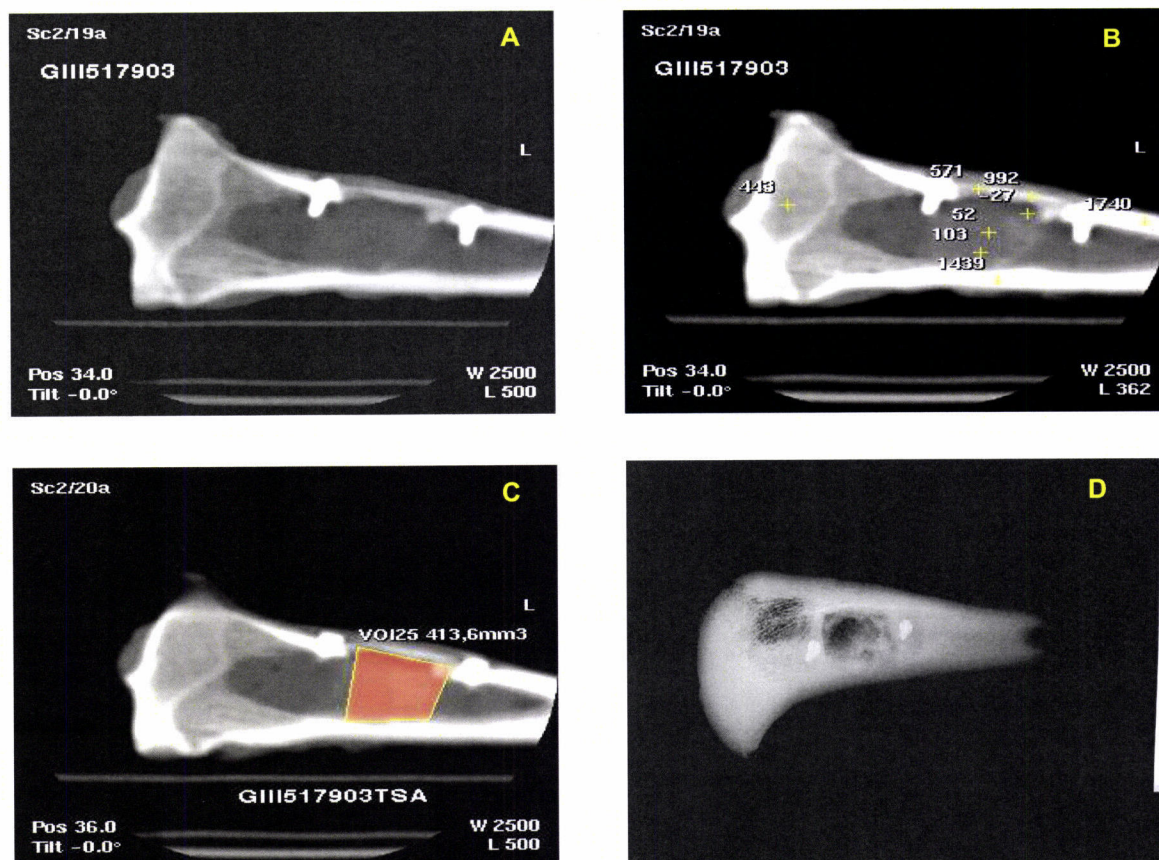


Fig. 4.10- Imagens tibiais típicas de GIII: **A** – TAC; **B** – Tac com valores de densidade óssea (UH); **C** – Tac com medição de volume do defeito; **D** – Macrorradiografia.

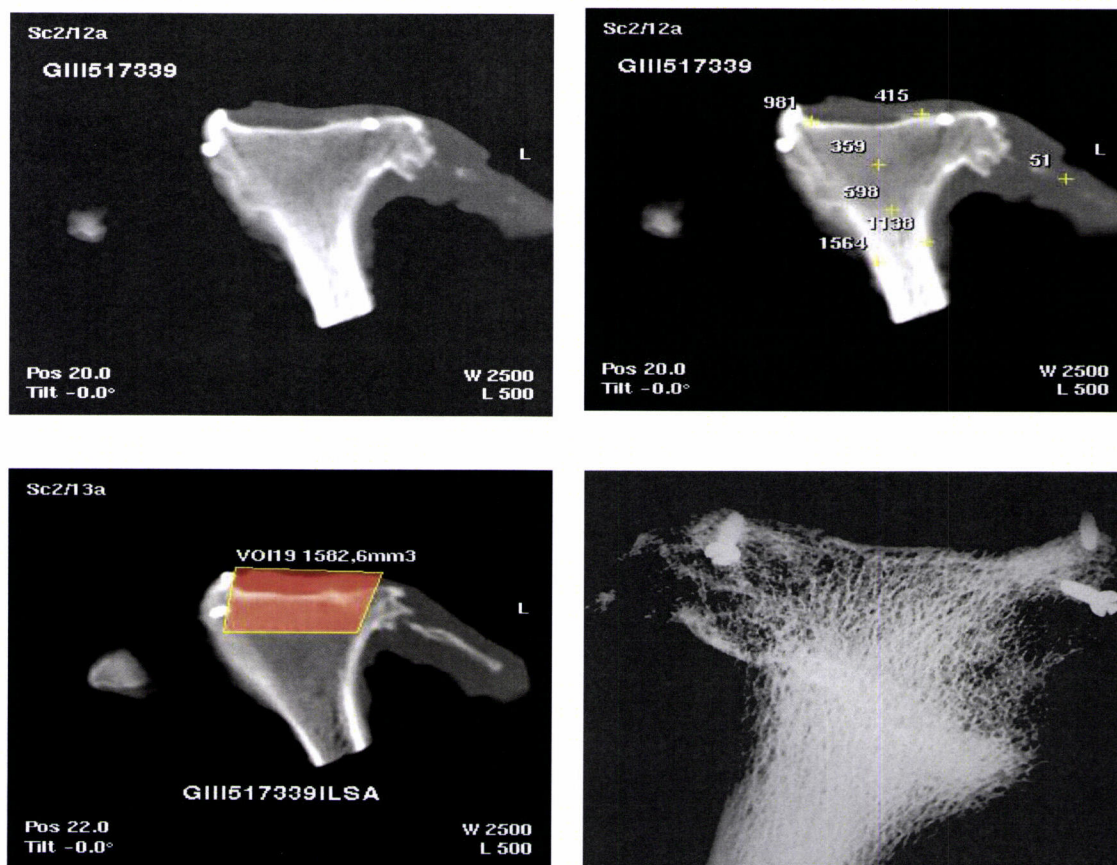


Fig. 4.11- Imagens típicas da crista ilíaca de GIII: **A** – TAC; **B** – Tac com valores de densidade óssea (UH); **C** – Tac com medição de volume do defeito; **D** – Macrorradiografia.

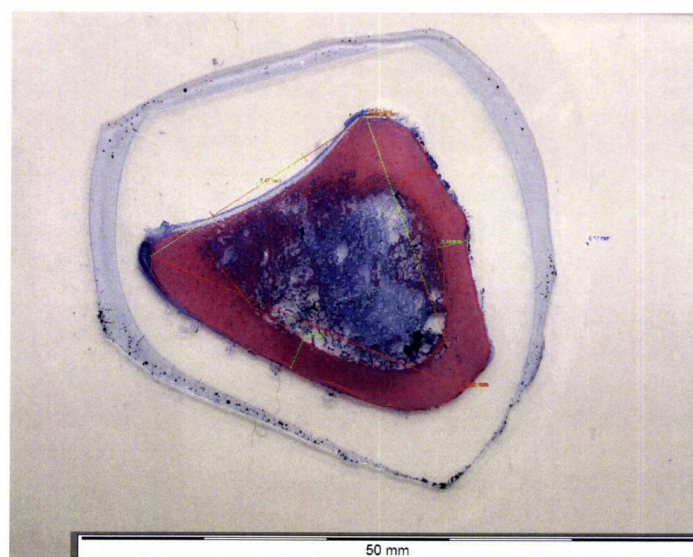


Fig. 4.12- Imagem tibial típica do estudo histomorfométrico realizado. Coloração Giemsa-eosina.

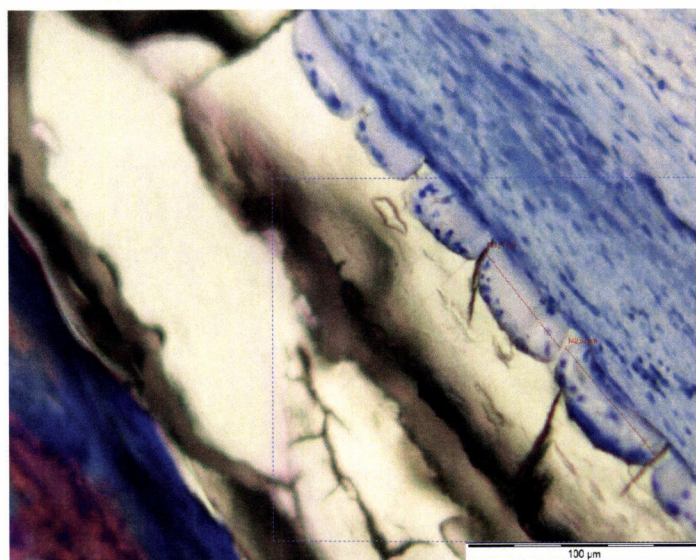


Fig. 4.13 – Imagem microscópica da membrana polimérica típica em que se vê a presença de células osteogénicas no interior dos poros da mesma. Coloração Giemsa-eosina.

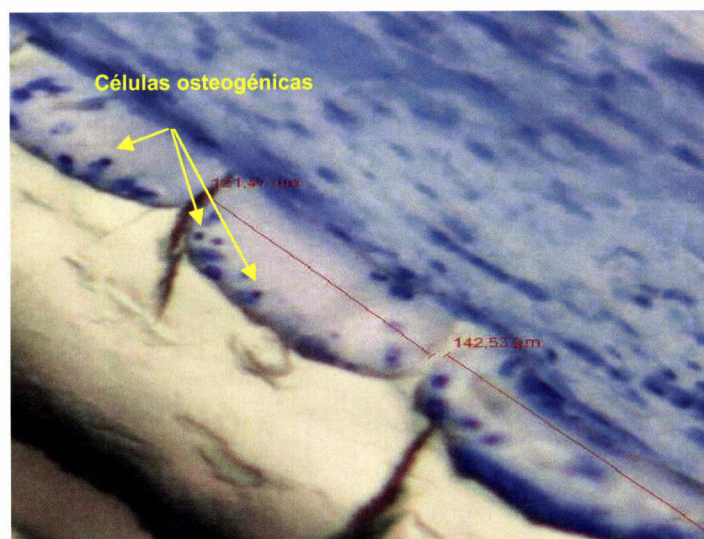


Fig. 4.14 - Pormenor microscópico do rectângulo da imagem 4.13.

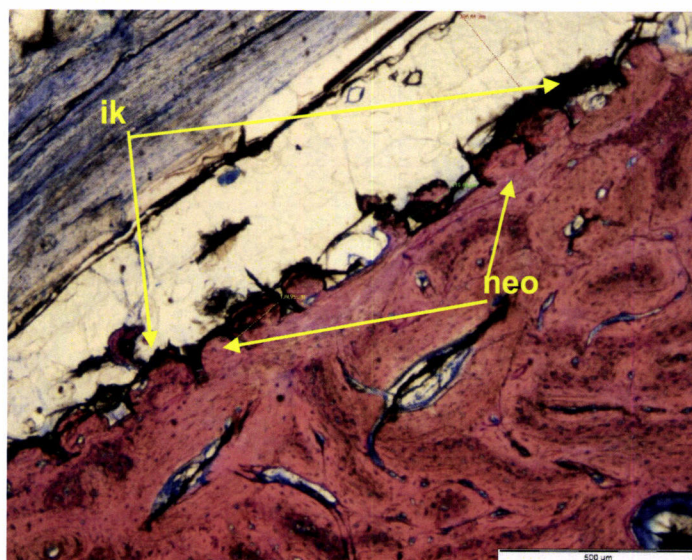


Fig. 4.15 - Imagem microscópica típica da membrana polimérica em que é observável a coloração negra correspondente ao "indian ink", indicativo de intensa angiogénese junto dos poros da membrana (**ik**), neoformação óssea (**neo**) no interior dos poros da membrana assim como na cavidade medular. Coloração Giemsa-eosina.

GRUPO IV

Pela análise dos resultados obtidos nas tomografias, macrorradiografias e nas lâminas histológicas e para o grupo IV, grupo tratado com esponja de poliuretano e enriquecido com lecitina de soja (composição B) foi evidente a exuberante quantidade de osso neoformado quer nos defeitos tibiais quer nos defeitos ilíacos (Fig. 4.16. A, B, C e D, Fig. 4.17. A, B, C e D).

Em todos os espécimes que constituíam este grupo houve uma continuidade óssea completa no local da osteotomia realizada para a criação do defeito (Fig. 4.18.). À semelhança do que foi descrito para o grupo II e III, observou-se crescimento de tecido ósseo guiado para o interior dos poros da membrana, tendo neste caso concreto sido observadas inúmeras células osteogénicas no interior dos poros da membrana (Fig. 4.19.).

Nos defeitos da crista ilíaca deste grupo IV observou-se macro e microscopicamente, preenchimento do defeito ósseo com neoformação óssea (Fig 4.17. A, B, C e D).

Na cavidade medular foram visíveis para todos os espécimes, grande

abundância de “ilhotas” de osso cortical (Fig. 4.18. a Fig. 4.23). É perfeitamente visível nas Fig. 4.20. a Fig. 4.23. núcleos de neoformação óssea no interior das esponjas de PU e mesmo dos seus poros.

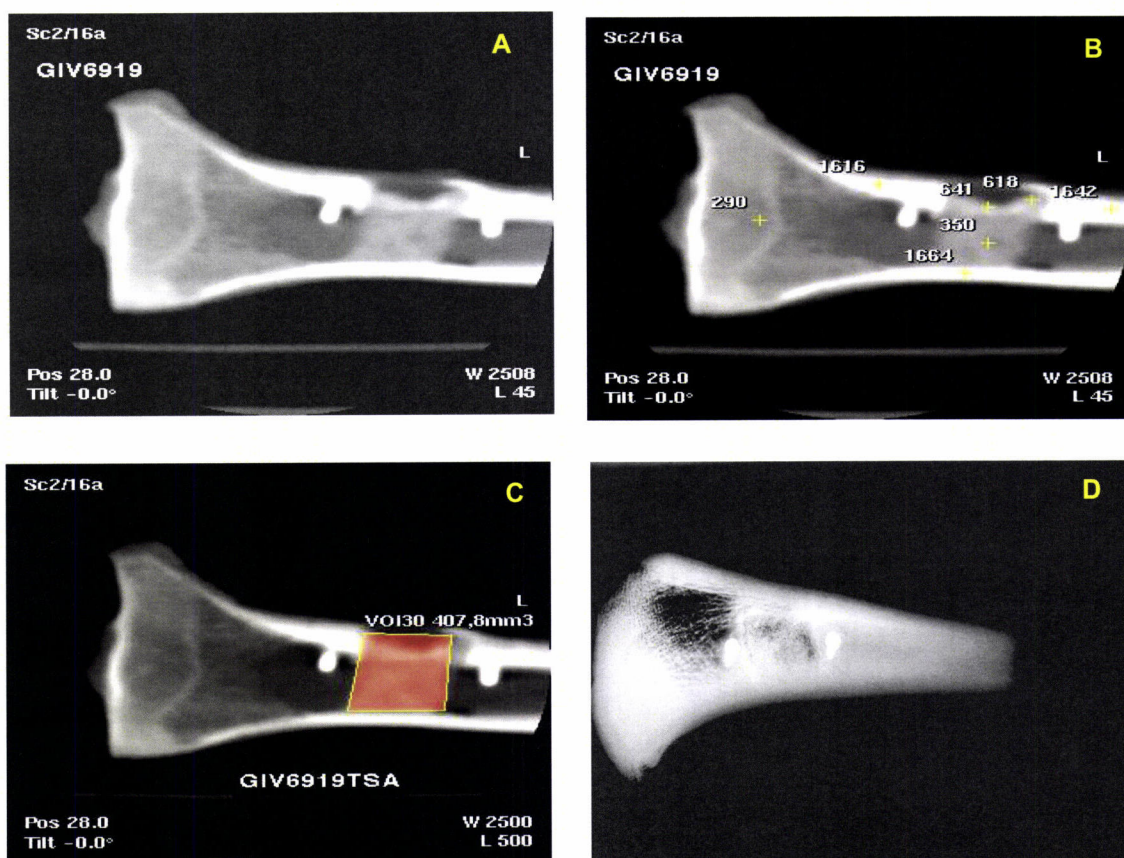


Fig.4.16 – Imagens tibiais típicas de GIV: **A** – TAC; **B** – Tac com valores de densidade óssea (UH); **C** – Tac com medição de volume do defeito; **D** – Macrorradiografia.

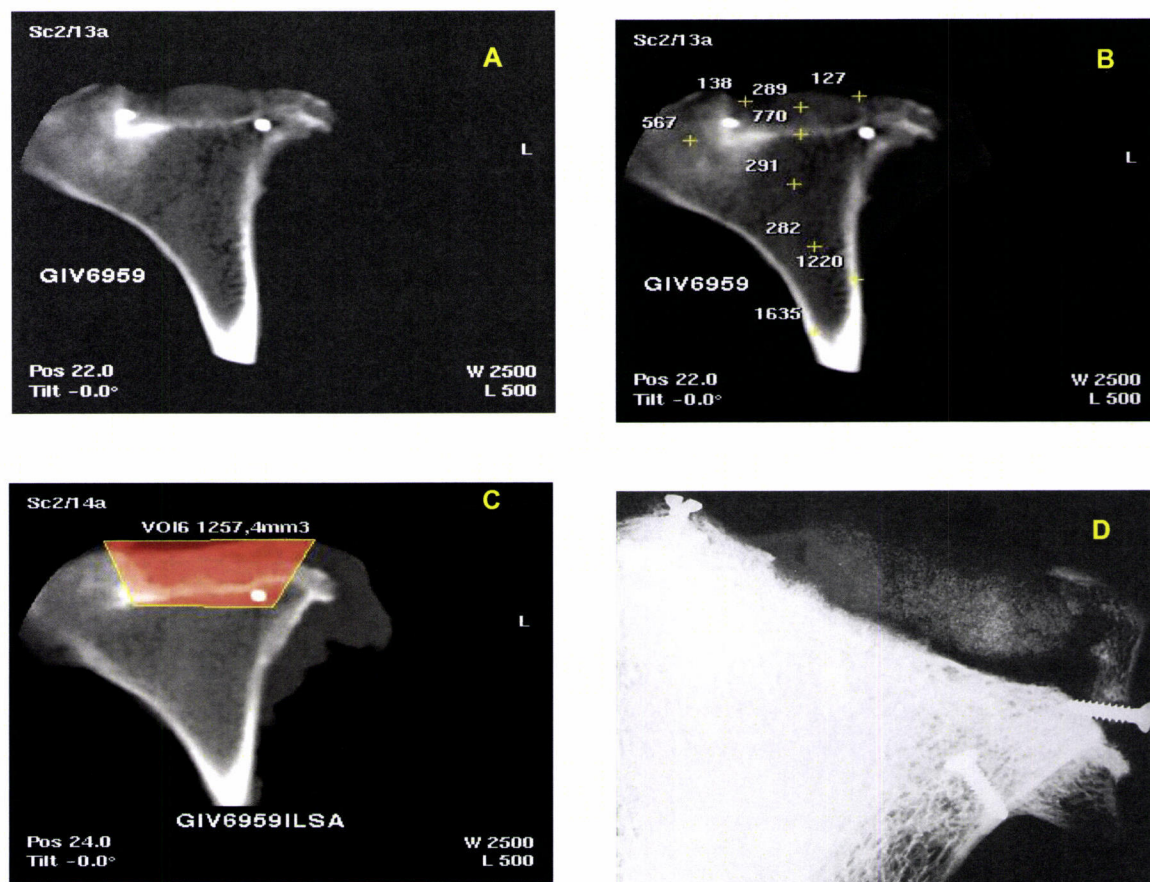


Fig.4.17 – Imagens típicas da crista ilíaca de GIV: **A** – TAC; **B** – Tac com valores de densidade óssea (UH); **C** – Tac com medição de volume do defeito; **D** – Macrorradiografia.

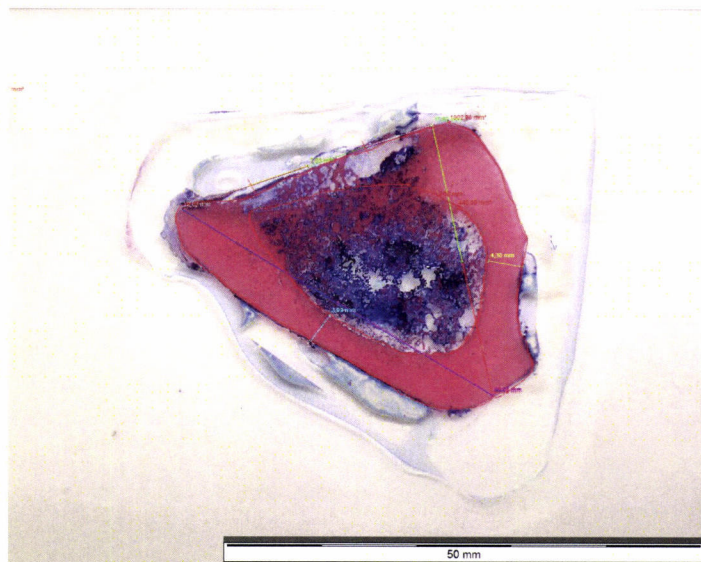


Fig. 4.18 - Imagem tibial típica do GIV do estudo histomorfométrico realizado. Coloração Giemsa-eosina.

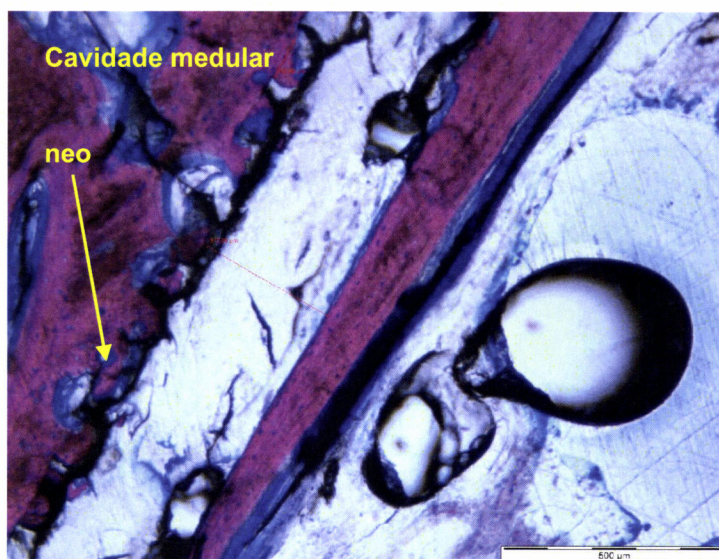


Fig. 4.19 Imagem microscópica típica da membrana polimérica do GIV em que é observável osso neoformado (**neo**) no interior dos poros da membrana assim como na cavidade medular. Coloração Giemsa-eosina.

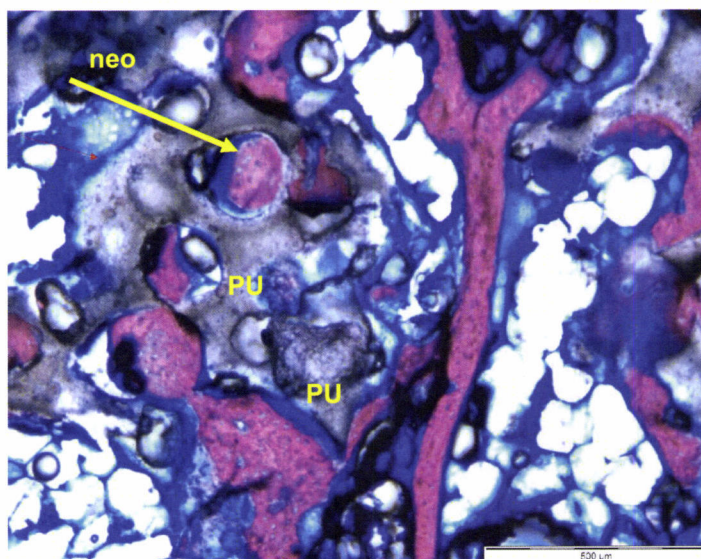


Fig. 4.20–. Imagem microscópica tibial típica do GIV no interior da cavidade medular em que é observável a neoformação de osso (**neo**) no interior da esponja de PU (**PU**). Coloração Giemsa-eosina

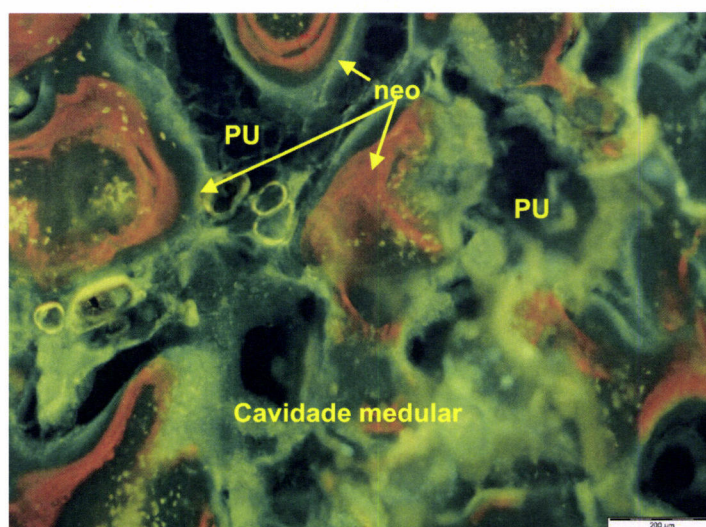


Fig.4.21 – Imagem microscópica típica do GIV com Coloração fluorescente intravital na cavidade medular da tibia onde se pode observar fragmentos de poliuretano (**PU**) e osso neoformado (**neo**).

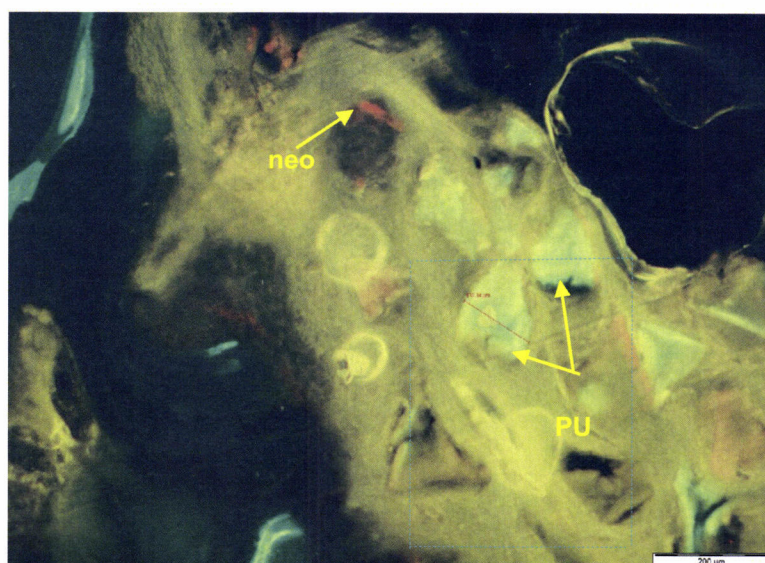


Fig.4.22 – Imagem microscópica típica do GIV com coloração fluorescente intravital na cavidade medular da tibia onde se pode observar neoformação óssea (**neo**) à periferia e no interior dos poros de poliuretano (**PU**).

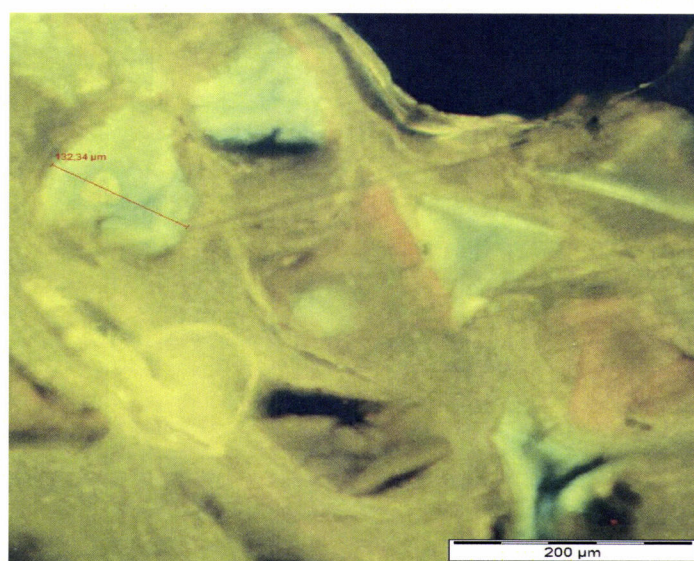


Fig.4.23 – Detalhe da zona rectangular da imagem 4.22.

4.3. Avaliação quantitativa dos resultados

Análise estatística de médias e variâncias entre os diferentes grupos a partir das variáveis estudadas

Foram analisados os resultados obtidos em 24 animais, 6 de cada um dos grupos experimentais que a seguir recordamos:

Quadro 4.1. Grupos experimentais e respectivos tratamentos aplicados

Grupo	Tratamento
I (Controlo)	--
II (mp)	Membrana de ácido poli(L/DL-láctico) 80/20
III (PUA)	Esponja de poliuretano enriquecida com hidroxiapatite nanométrica de composição A conjugada com sistema de creatina/putrescina
IV (PUB)	Esponja de poliuretano enriquecida com hidroxiapatite nanométrica de composição B conjugada com lecitina de soja

Todas as variáveis em estudo apresentaram distribuição normal e variância homogênea.

Foram calculadas médias e os respectivos desvios-padrão para efeitos de análises de variância.

Como referido anteriormente as variáveis estudadas foram:

- Espessura das corticais laterais da tibia;
- N.º de osteónios por campo óptico;
- Diâmetro dos osteónios por campo óptico;
- Densidade de osteónios por campo óptico;
- TAM;
- Volume ósseo ocupado pelo defeito da tibia;
- Três valores de densidade óssea periférica da tibia;
- Valor de densidade óssea aparente no próprio defeito da tibia;
- Volume ósseo ocupado pelo defeito do ilíaco;
- Três valores de densidade óssea periférica do ilíaco;
- Valor de densidade óssea aparente no próprio defeito do ilíaco.

GRUPO I

Os valores das variáveis relativas ao grupo I, obtidos a partir dos estudos histomorfométricos encontram-se no quadro 4.2. e os das variáveis obtidas a partir das tomografias axiais computadorizadas no quadro 4.3.

No quadro 4.2. são apresentados os valores das espessuras das corticais laterais da tíbia (mm), do número de osteónios/campo óptico, do diâmetro dos osteónios (μm), da densidade dos osteónios/campo óptico e da TAM ($\mu\text{m}/\text{dia}$). Todos estes valores apresentaram variações de animal para animal, possivelmente relacionados com a diferenças de tamanho ou de peso, embora na selecção dos animais o peso tenha sido limitado a um intervalo de 40 a 50 kg, como referido anteriormente. Assim, observaram-se variações, entre espécimes, da espessura das corticais da tíbia (1,59 mm a 4,04 mm) do número de osteónios/campo óptico (14 a 38,3), do diâmetro dos osteónios (126,8 a 186,7 μm), da densidade dos osteónios/campo óptico (5,9 a 16,3) e da TAM (1,4 a 2,5 $\mu\text{m}/\text{dia}$).

No quadro 4.3 são apresentados os valores dos volumes dos defeitos criados na tíbia e na crista ilíaca (mm^3), valores médios de densidade óssea periférica da tíbia e da crista ilíaca (UH) e valores de densidade óssea dos defeitos criados na tíbia e na crista ilíaca (UH). Assim, observaram-se variações entre espécimes dos volumes dos defeitos da tíbia sendo o mais baixo de 375 mm^3 e o mais elevado de 875 mm^3 ; dos valores de densidade óssea periférica da tíbia, sendo o valor mais baixo de 1336 mm^3 e o mais elevado de $1641,5 \text{ mm}^3$; densidade óssea do defeito criado na tíbia, sendo o valor mais baixo de -362 UH e o mais elevado de -25 UH; do volume dos defeitos da crista ilíaca, sendo o valor mais baixo de $1526,4 \text{ mm}^3$ e o mais elevado de $1614,3 \text{ mm}^3$; valores de densidade óssea periférica do ilíaco, sendo o valor mais baixo de 395 UH e o valor mais elevado de 1055,5 UH; da densidade óssea do defeito do ilíaco, sendo o valor mais baixo de -63 e o valor mais elevado de 240 UH.

Nos valores das densidades ósseas dos defeitos criados e para este grupo, todos foram baixos, de valor negativo, pelo facto de no defeito, crítico, não ter sido colocado qualquer substituto ósseo e por essa razão não ter havido neoformação

óssea.

Quadro 4.2. – Valores das variáveis relativas ao grupo I obtidas a partir do estudo histomorfométrico.

Grupo controlo (GI)	Média das espessuras da cortical lateral da tibia (mm)	Média do n.º de osteónios/campo óptico	Média do Ø dos osteónios (µm)	Densidade dos osteónios/campo óptico	MAR (µm)/dia
GI049	3,71	14,30	186,70	6,10	0*
GI414	1,59	25,30	126,80	10,70	2,50
GI713	4,04	38,30	168,50	16,30	1,80
GI882	3,94	30,00	139,00	12,70	2,10
GI914	2,30	29,00	162,30	12,30	1,40
GI928	2,05	14,00	162,20	5,90	1,70

* Valor não obtido por problemas técnicos no processamento da lâmina.

Quadro 4.3. – Valores das variáveis relativas ao grupo I obtidas a partir do estudo das tomografias axiais computadorizadas.

Grupo controlo (GI)	Volume do defeito tibia (mm ³)	Média de três valores de densidade óssea periférica da tibia (UH)	Densidade defeito criado na tibia (UH)	Volume do defeito criado na crista ilíaca (mm ³)	Média de três valores de densidade óssea periférica do ilíaco (UH)	Densidade defeito criado na crista ilíaca (UH)
GI049	408,80	1515,00	-25,00	1526,40	395,00	115,00
GI414	432,60	1449,00	-362,00	1614,30	959,00	-63,00
GI713	446,90	1336,00	-206,00	1611,20	694,50	-40,00
GI882	375,60	1641,50	-25,00	1535,00	1055,50	-219,00
GI914	444,90	1458,00	-220,00	1602,90	794,00	72,00
GI928	875,60	1454,50	-63,00	1589,90	795,50	240,00

GRUPO II

Os valores das variáveis relativas ao grupo II, obtidos a partir dos estudos histomorfométricos encontram-se no quadro 4.4. e os das variáveis obtidas a partir das tomografias axiais computadorizadas no quadro 4.5.

No quadro 4.4. são apresentados os valores das espessuras das corticais laterais da tibia (mm), do número de osteónios/campo óptico, do diâmetro dos osteónios (µm), da densidade dos osteónios/campo óptico e da TAM (µm/dia). Todos estes valores apresentaram também variações de animal para animal, como referido anteriormente para o grupo C. Assim, observaram-se variações, entre espécimes, da espessura das corticais da tibia (2,19 a 5,36 mm) do número de osteónios/campo óptico (19 a 46), do diâmetro dos osteónios (135,40 a 190,92 µm), da densidade dos osteónios/campo óptico (5,25 a 19,59) e da TAM (1,38 a 4,3 µm/dia).

No quadro 4.5. são apresentados os valores dos volumes dos defeitos criados na tibia e na crista ilíaca (mm³), os valores de densidade óssea periférica da tibia e da crista ilíaca (UH) e valores de densidade óssea dos defeitos criados na tibia e na crista ilíaca (UH). Assim, observaram-se variações, entre espécimes, dos volumes dos defeitos da tibia sendo o mais baixo de 422 mm³ e o mais elevado de 513,1 mm³; da média de valores de densidade óssea periférica da tibia, sendo o valor mais baixo de 1158 mm³ e o mais elevado de 1544,5 mm³; da densidade óssea do defeito criado na tibia, sendo o valor mais baixo de -32 UH e o mais elevado de 99 UH; do volume dos defeitos da crista ilíaca, sendo o valor mais baixo de 1500 mm³ e o mais elevado de 1606,5 mm³; da média de valores de densidade óssea periférica do ilíaco, sendo o valor mais baixo de 557,5 UH e o valor mais elevado de 1260,5 UH; da densidade óssea do defeito do ilíaco, sendo o valor mais baixo de 28 e o valor mais elevado de 79 UH.

Como pode constatar-se, os valores de densidade óssea dos defeitos críticos criados, são mais elevados e todos positivos que os do grupo controlo uma vez que nestes foi colocada a membrana polimérica a cobrir o defeito o que conduziu à neoformação óssea.

Quadro 4.4. Valores das variáveis relativas ao grupo II obtidas a partir do estudo histomorfométrico.

Grupo membrana (GII)	Espessuras da cortical lateral da tibia (mm)	N.º de osteónios	Ø dos osteónios	Densidade dos osteónios	MAR (µm)/dia
GII 517811	5,36	46,00	141,91	19,59	3,10
GII 517813	2,48	16,00	135,40	6,81	1,82
GII 517814	3,47	19,00	145,86	8,09	0*
GII 517815	3,45	34,33	190,92	14,62	2,01
GII 517907	2,19	12,33	158,67	5,25	1,38
GII 600688	5,07	25,00	151,27	10,64	2,71

* Valor não obtido por problemas técnicos no processamento da lâmina.

Quadro 4.5. Valores das variáveis relativas ao grupo II obtidas a partir do estudo das tomografias axiais computadorizadas.

Grupo membrana (GII)	Volume do defeito da tibia (mm ³)	Valores de densidade óssea periférica da tibia (UH)	Densidade defeito tibia (UH)	Volume do defeito ilíaco (mm ³)	Valores de densidade óssea periférica do ilíaco (UH)	Densidade defeito ilíaco (UH)
GII 517811	482,90	1440,50	-21,00	1589,90	848,00	28,00
GII 517813	439,60	1334,00	21,00	1500,00	852,50	42,00
GII 517814	422,00	1158,00	99,00	1591,20	1260,50	60,00
GII 517815	444,60	1544,50	-32,00	1598,30	668,50	79,00
GII 517907	513,10	1330,50	-17,00	1598,70	557,50	45,00
GII 600688	464,60	1412,50	15,00	1606,50	618,50	79,00

GRUPO III

Os valores das variáveis relativas ao grupo III, obtidos a partir dos estudos histomorfométricos encontram-se no quadro 4.6. e os das variáveis obtidas a partir das tomografias axiais computadorizadas no quadro 4.7.

No quadro 4.6. são apresentados os valores das espessuras das corticais laterais da tibia (mm), do número de osteónios/campo óptico, do diâmetro dos osteónios (µm), da densidade dos osteónios/campo óptico e da TAM (µm/dia). Todos estes valores apresentaram também variações de animal para animal, possivelmente pelas razões sugeridas para os grupos C e II. Assim, observaram-se variações, entre espécimes, da espessura média das corticais da tibia (3,19 a 5,05 mm), do número de osteónios/campo óptico (30 a 49,33), do diâmetro dos osteónios (164,23 a 224,70 µm), da densidade dos osteónios/campo óptico (12,77 a 21,01) e da TAM (2,39 a 3,07 µm/dia).

No quadro 4.7. são apresentados os valores dos volumes dos defeitos criados na tibia e na crista ilíaca (mm³), dos valores de densidade óssea periférica da tibia e da crista ilíaca (UH) e valores de densidade óssea dos defeitos criados na tibia e na crista ilíaca (UH). Assim, observaram-se variações, entre espécimes, do volume dos defeitos da tibia sendo o mais baixo de 398,9 mm³ e o mais elevado de 568,1 mm³; dos valores de densidade óssea periférica da tibia, sendo o valor mais baixo de 1264 mm³ e o mais elevado de 1681,5 mm³; da densidade óssea do defeito criado na tibia, sendo o valor mais baixo de 103 UH e o mais

elevado de 450 UH; do volume dos defeitos da crista ilíaca, sendo o valor mais baixo de 1582 mm³ e o mais elevado de 1670 mm³; valores de densidade óssea periférica do ilíaco, sendo o valor mais baixo de 430,5 UH e o valor mais elevado de 1139,5 UH; da densidade óssea do defeito do ilíaco, sendo o valor mais baixo de 51 e o valor mais elevado de 398 UH.

Como pode constatar-se, para todos os valores do estudo histomorfométrico os valores são mais elevados do que os de GI e GII, assim como os valores de densidade ósseas dos defeitos críticos criados, todos positivos o que se atribui à presença da membrana polimérica a cobrir o defeito e à esponja de poliuretano de composição A.

Quadro 4.6. Valores das variáveis relativas ao grupo III obtidas a partir do estudo histomorfométrico.

Grupo PU A (GIII)	Espessuras da cortical lateral da tibia (mm)	N.º de osteónios/campo óptico	Ø dos osteónios (µm)	Densidade dos osteónios/campo óptico	MAR (µm)/dia
GIII517339	3,87	32,00	188,99	13,62	3,07
GIII517902	3,38	40,66	164,23	17,31	2,49
GIII517903	3,97	49,33	169,30	21,01	2,54
GIII517904	3,19	30,66	224,70	13,06	2,84
GIII517906	5,05	45,66	171,13	19,44	2,39
GIII934837	3,88	30,00	184,21	12,77	2,81

Quadro 4.7. – Valores das variáveis relativas ao grupo III obtidas a partir obtidos a partir do estudo das tomografias axiais computadorizadas.

Grupo PUA (GIII)	Volume do defeito da tibia (mm ³)	Valores de densidade óssea periférica da tibia (UH)	Densidade defeito criado na tibia (UH)	Volume do defeito criado na crista ilíaca (mm ³)	Valores de densidade óssea periférica do ilíaco (UH)	Densidade do defeito criado na crista ilíaca (UH)
GIII517339	459,60	1432,5	387	1582,6	698	270
GIII517902	568,10	1629,00	185,00	1623,90	712,00	51,00
GIII517903	413,60	1589,50	103,00	1601,20	893,00	60,00
GIII517904	468,30	1464,00	117,00	1606,50	430,50	398,00
GIII517906	485,10	1681,50	261,00	1670,00	1139,50	110,00
GIII934837	398,90	1264,00	450,00	1604,40	1090,50	66,00

GRUPO IV

Os valores das variáveis relativas ao grupo IV, obtidos a partir dos estudos histomorfométricos encontram-se no quadro 4.8. e os das variáveis obtidas a partir

das tomografias axiais computadorizadas no quadro 4.9.

No quadro 4.8. são apresentados os valores das espessuras das corticais laterais da tíbia (mm), do número de osteónios/campo óptico, do diâmetro dos osteónios (μm), da densidade dos osteónios/campo óptico e da TAM ($\mu\text{m}/\text{dia}$). Tal como nos grupos anteriormente descritos, todos estes valores apresentaram variações de animal para animal. Assim, observaram-se variações, entre espécimes, da espessura média das corticais da tíbia (2,89 a 4,14 mm), do número de osteónios/campo óptico (33,66 a 51,66), do diâmetro dos osteónios (139,44 a 204,10 μm), da densidade dos osteónios/campo óptico (14,33 a 22) e da TAM (2,25 a 2,58 $\mu\text{m}/\text{dia}$).

No quadro 4.9. são apresentados os valores dos volumes dos defeitos criados na tíbia e na crista ilíaca (mm^3), os valores de densidade óssea periférica da tíbia e da crista ilíaca (UH) e valores de densidade óssea dos defeitos criados na tíbia e na crista ilíaca (UH). Assim, observaram-se variações, entre espécimes, dos volumes dos defeitos da tíbia sendo o mais baixo de 470,2 mm^3 e o mais elevado de 568,1 mm^3 ; dos valores de densidade óssea periférica da tíbia, sendo o valor mais baixo de 1436 mm^3 e o mais elevado de 1784 mm^3 ; da densidade óssea do defeito criado na tíbia, sendo o valor mais baixo de 152 UH e o mais elevado de 350 UH; do volume dos defeitos da crista ilíaca, sendo o valor mais baixo de 1257,4 mm^3 e o mais elevado de 3202,1 mm^3 ; dos valores de densidade óssea periférica do ilíaco, sendo o valor mais baixo de 548,5 UH e o valor mais elevado de 1093,5 UH; da densidade óssea do defeito do ilíaco, sendo o valor mais baixo de 82 e o valor mais elevado de 289 UH.

Como pode constatar-se e para este grupo os valores são, de modo geral, semelhantes aos do GIII e, para todos os valores do estudo histomorfométrico os valores são mais elevados do que os de GI e GII, assim como os valores de densidade óssea dos defeitos críticos criados, todos positivos o que se atribui à presença da membrana polimérica a cobrir o defeito e à esponja de poliuretano de composição B.

Quadro 4.8. – Valores das variáveis relativas ao grupo IV obtidos a partir do estudo histomorfométrico.

Grupo PUB (GIV)	Espessuras da cortical lateral da tibia (mm)	N.º de osteónios	Ø dos osteónios (µm)/	Densidade dos osteónios	MAR (µm)/dia
GIV2045	4,02	38,00	182,92	16,18	2,40
GIV6213	0*	0*	0	0	2,58
GIV6919	4,14	51,66	147,24	22,00	2,57
GIV6959	2,89	33,66	163,81	14,33	2,25
GIV8999	3,41	42,00	204,10	17,88	2,25
GIV9351	4,89	48,33	139,44	20,58	2,40

* Valor não obtido por problemas no processamento histológico.

Quadro 4.9. – Valores das variáveis relativas ao grupo IV obtidas a partir do estudo das tomografias axiais computadorizadas

Grupo PU B (GIV)	Volume defeito do tibia (mm ³)	Valores de densidade óssea periférica da tibia (UH)	Densidade defeito na tibia (UH)	Volume defeito do ilíaco (mm ³)	Valores de densidade óssea periférica do ilíaco (UH)	Densidade defeito ilíaco (UH)
GIV2045	470,20	1561,00	344,00	3202,10	850,00	227,00
GIV6213	0*	0*	0*	1603,50	923,50	167,00
GIV6919	407,80	1653,00	350,00	1700,00	548,50	82,00
GIV6959	840,00	1784,00	171,00	1257,40	735,00	289,00
GIV8999	1012,40	1520,00	152,00	1602,10	1093,50	180,00
GIV9351	564,00	1436,00	206,00	2070,50	727,00	96,00

* Valor não obtido por problemas no processamento histológico

4.3.1. Médias e desvios-padrão

4.3.1.1. Espessura média das corticais laterais (esp_med)

Quadro 4.10. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo osso, tibia, (pelo método de Tukey-Hsu).

Tratamento	esp_med
Grupo I (Controlo – C)	$2,94 \pm 1,08^a$
Grupo II (membrana – mp)	$3,67 \pm 1,30^a$
Grupo III (PU com sistema de putrescina - pua)	$3,89 \pm 0,64^a$
Grupo IV (PU com sistema de lecitina – pub)	$3,87 \pm 0,75^a$

Nesta análise embora não existam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Quadro 4.10.), há uma clara tendência para que nos grupos

tratados os valores das médias observados sejam superiores ao valor do grupo C. Nos grupos III e IV, os valores obtidos são muito semelhantes e apenas ligeiramente superiores aos do grupo II (Gráfico 4.1.).

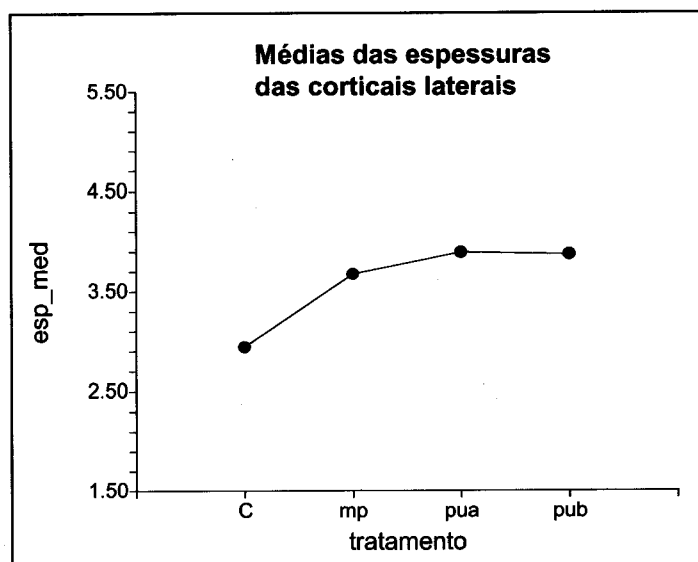


Gráfico 4.1.

Distribuição relativa à variável da espessura das corticais laterais da tíbia (mm).

4.3.1.2. Número médio de osteónios por campo óptico (n_ost_camp)

Quadro 4.11. – Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo osso, tíbia, (pelo método de Tukey-Hsu).

Tratamento	n_ost_camp
Grupo I (Controlo – C)	25,16 ± 9,52 ^a
Grupo II (membrana – mp)	25,44 ± 12,68 ^a
Grupo III (PUA com sistema de putrescina - pua)	38,05 ± 8,34 ^{ab}
Grupo IV (PUB com sistema de lecitina – pub)	42,73 ± 7,35 ^b

Nesta análise existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre o grupo IV e os grupos I e II. No grupo tratado PUA (GIII), os valores apresentados são superiores aos do GI mas não estatisticamente significativos (Gráfico 4.2.).

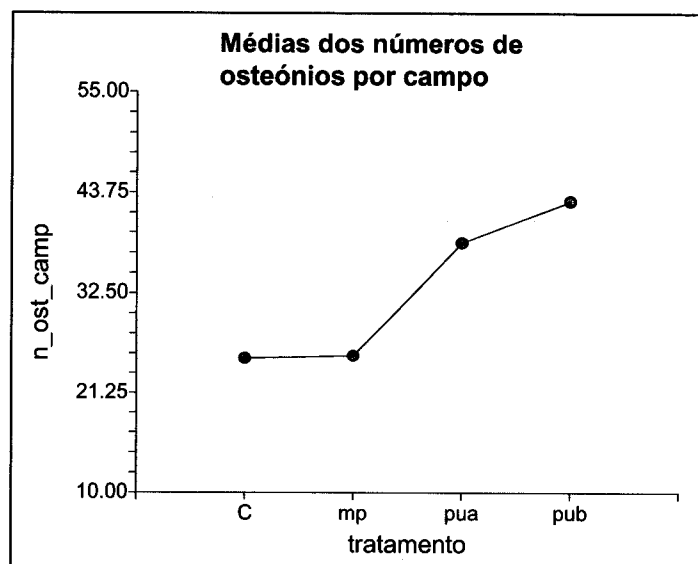


Gráfico 4.2. – Distribuição relativa à variável número médio de osteónios por campo óptico.

4.3.1.3. Diâmetro médio dos osteónios (diâmetro)

Quadro 4.12. – Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo osso, tibia (pelo método de Tukey-Hsu).

Tratamento	Diâmetro (μm)
Grupo I (Controlo – C)	157,63 $\pm$ 21,46 ^a
Grupo II (membrana – mp)	154,00 $\pm$ 19,75 ^a
Grupo III (PUA com sistema de putrescina - pua)	183,76 $\pm$ 22,15 ^a
Grupo IV (PUB com sistema de lecitina – pub)	167,50 $\pm$ 26,40 ^a

Nesta análise embora não existam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Quadro 4.12.) há uma clara tendência para que nos grupos tratados os valores sejam superiores aos do GI e com tendência crescente até GIII (Gráfico 4.3.).

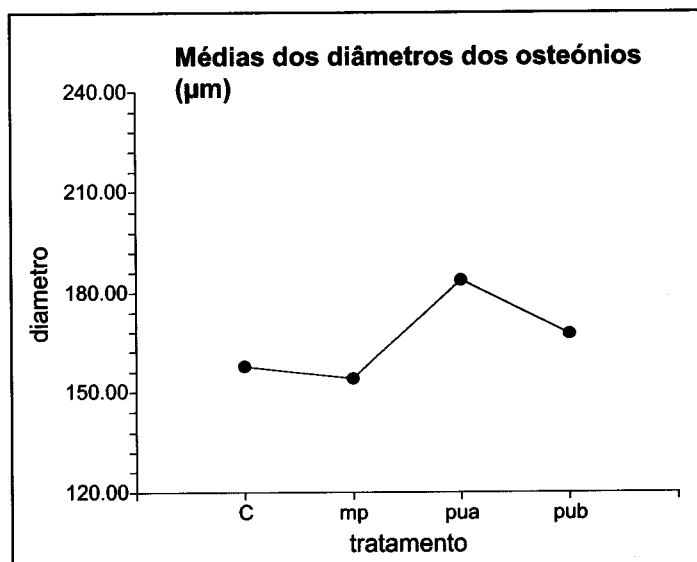


Gráfico 4.3. – Distribuição relativa ao diâmetro médios dos osteónios no campo óptico.

4.3.1.4. Densidades dos osteónios por campo óptico (densest)

Quadro 4.13. – Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo osso, tibia (pelo método de Tukey-Hsu).

Tratamento	Densest
Grupo I (Controlo – C)	$10,71 \pm 4,05^a$
Grupo II (membrana – mp)	$10,83 \pm 5,40^a$
Grupo III (PUA com sistema de putrescina - pua)	$16,20 \pm 3,55^{ab}$
Grupo IV (PUB com sistema de lecitina – pub)	$18,19 \pm 3,13^b$

Nesta análise existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos C e mp com pub ($p < 0,05$) (Quadro 4.13.) à semelhança do que foi observado para o n.º de osteónios por campo óptico (Quadro 4.11) uma vez que este valor de densidade de osteónios resulta do *ratio* entre o n.º de osteónios por campo óptico/área do mesmo campo óptico. Os valores do GI são semelhantes aos valores do GII mas diferem, com relevância estatística, do grupo IV. Embora as diferenças entre o GI e GII com GIII não sejam estatisticamente significativas, há obviamente uma tendência crescente em termos de valores, ainda que inferior a GIV (Gráfico 4.4).

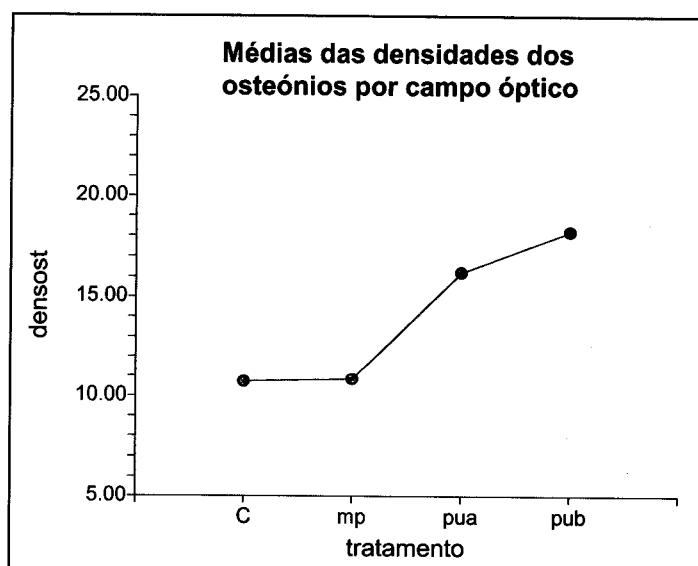


Gráfico 4.4. – Distribuição relativa à densidade dos osteónios por campo óptico.

4.3.1.5. Taxa média de aposição mineral (TAM)

Quadro 4.14. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo osso, tibia (pelo método de Tukey-Hsu).

Tratamento	TAM
Grupo I (Controlo – C)	$1,92 \pm 0,42^a$
Grupo II (membrana – mp)	$2,20 \pm 0,69^{ab}$
Grupo III (PUA com sistema de putrescina - pua)	$2,69 \pm 0,25^b$
Grupo IV (PUB com sistema de lecitina – pub)	$2,41 \pm 0,14^{ab}$

Nesta análise existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos I e III (PUA) ($p < 0,05$) (Quadro 4.14.) e, embora entre o GI e GII com o grupo IV (PUB), as diferenças não sejam estatisticamente significativas, há uma tendência para que, nesta variável, as médias dos valores dos grupos tratados sejam mais elevadas que os dos GI e GII (Gráfico 4.5).

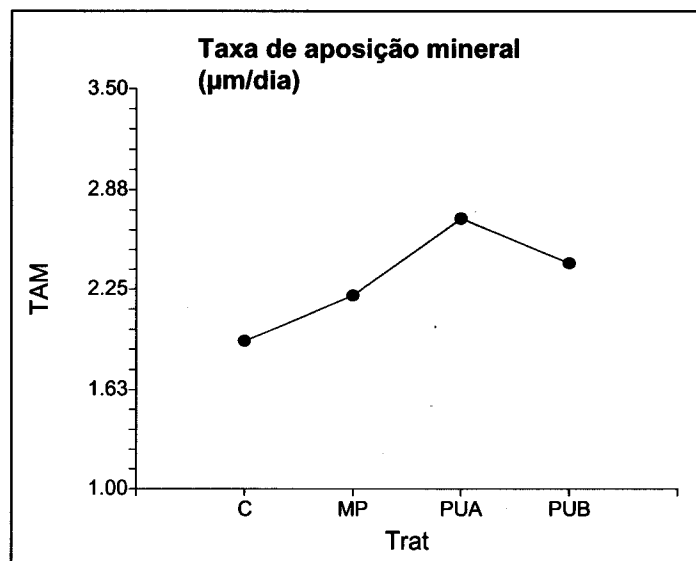


Gráfico 4.5. – Distribuição relativa à variável taxa de aposição mineral (µm/dia).

4.3.1.6. Volume dos defeitos criados (vol_defeito)

Quadro 4.15. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo osso, tibia ou ilíaco (pelo método de Tukey-Hsu); letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre pares de ossos (tibia e ilíaco) dentro dos mesmos tratamentos (pelo método de Tukey-Hsu).

Tratamento	vol_defeito tibia	vol_defeito ilíaco
Grupo I (Controlo – C)	497,40 ± 110,13 ^{aA}	1579,95 ± 110,13 ^{Aa}
Grupo II (membrana – mp)	461,13 ± 110,13 ^{aA}	1580,76 ± 10,13 ^{Aa}
Grupo III (PU com sistema de putrescina - pua)	465,6 ± 110,13 ^{aA}	1614,76 ± 110,13 ^{Aa}
Grupo IV (PU com sistema de lecitina – pub)	658,88 ± 120,64 ^{aA}	1905,93 ± 110,13 ^{Aa}

Nesta análise não existem diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos diferentes grupos mas apenas na comparação entre os dois ossos em estudo, tibia e ilíaco, embora se continue a manifestar a tendência para que, dentro do mesmo osso e nos grupos tratados com as esponjas de PU, se tenham obtido valores mais elevados do que o GI e GII (Quadro 4.15. e gráfico 4.6.).

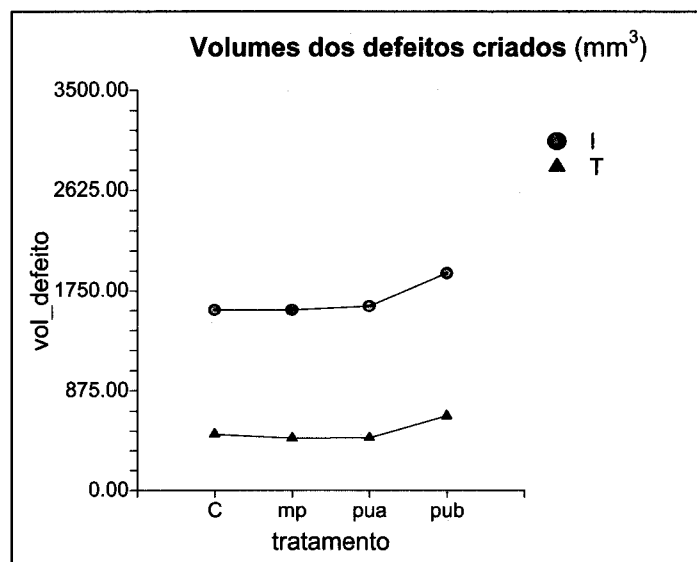


Gráfico 4.6. – Distribuição relativa à variável volumes dos defeitos ósseos criados (tíbia e íliaco)

4.3.1.7. Densidade óssea (densid_osso) periférica (extra-defeito) (UH)

Quadro 4.16. – Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo osso, tíbia ou íliaco (pelo método de Tukey-Hsu); Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre pares de ossos (tíbia e íliaco) dentro dos mesmos tratamentos (pelo método de Tukey-Hsu).

Tratamento	densid_osso tíbia	densid_osso íliaco
Grupo I (Controlo – C)	1475,66 ± 78,68 ^{aA}	782,25 ± 78,68 ^{Aa}
Grupo II (membrana – mp)	1370,00 ± 78,68 ^{aA}	800,91 ± 78,68 ^{Aa}
Grupo III (PU com sistema de putrescina - pua)	1510,08 ± 78,68 ^{aA}	827,25 ± 78,68 ^{Aa}
Grupo IV (PU com sistema de lecitina – pub)	1590,80 ± 86,19 ^{aA}	812,91 ± 78,68 ^{Aa}

Nesta análise não existem diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos diferentes grupos para o mesmo osso estudado mas apenas na comparação entre os dois ossos em estudo, tíbia e íliaco. Na crista ilíaca e para esta variável, continua a manifestar-se a tendência para que nos grupos tratados com as esponjas de PU, se tenham obtido valores mais elevados do que o GI e GII (Quadro 4.16. e gráfico 4.8.). Na tíbia o comportamento é distinto uma vez que face a GI os grupos tratados apresentam valores superiores, o mesmo não se

observando em relação a GII que apresenta, para esta variável e para esta localização, valores inferiores a GI (Quadro 4.16. e gráfico 4.8.).

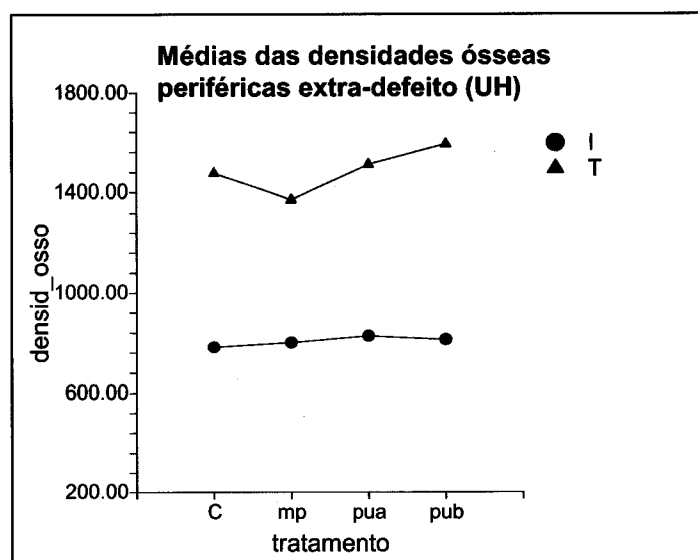


Gráfico 4.7. – Distribuição relativa às densidades ósseas periféricas (extra-defeito) da tíbia e do íliaco

4.3.1.8. Densidade óssea do defeito (dens_defeito) criado (UH)

Quadro 4.17. – Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos dentro do mesmo osso, tíbia ou íliaco (pelo método de Tukey-Hsu); letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre pares de ossos (tíbia e íliaco) dentro dos mesmos tratamentos (pelo método de Tukey-Hsu).

Tratamento	dens_defeito tíbia	dens_defeito íliaco
Grupo I (Controlo – C)	-150,16 $\pm$ 46,44 ^{aA}	17,50 $\pm$ 46,44 ^{aA}
Grupo II (membrana – mp)	10,83 $\pm$ 46,44 ^{abA}	55,50 $\pm$ 46,44 ^{aA}
Grupo III (PU com sistema de putrescina - pua)	250,50 $\pm$ 46,44 ^{bA}	159,16 $\pm$ 46,44 ^{aA}
Grupo IV (PU com sistema de lecitina – pub)	244,60 $\pm$ 50,87 ^{bA}	173,50 $\pm$ 46,44 ^{aA}

Nesta análise e para a tíbia existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre o GI e GII com GIII e GIV (Quadro 4.17.). Em relação à crista ilíaca, apesar de não existirem diferenças estatisticamente significativas, mantém-se a tendência para que as médias dos grupos tratados sejam mais elevadas do que as do GI (Gráfico 4.10.).

À semelhança do que foi observado mantêm-se as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os dois ossos em estudo, tibia e ilíaco (Quadro 4.17.).

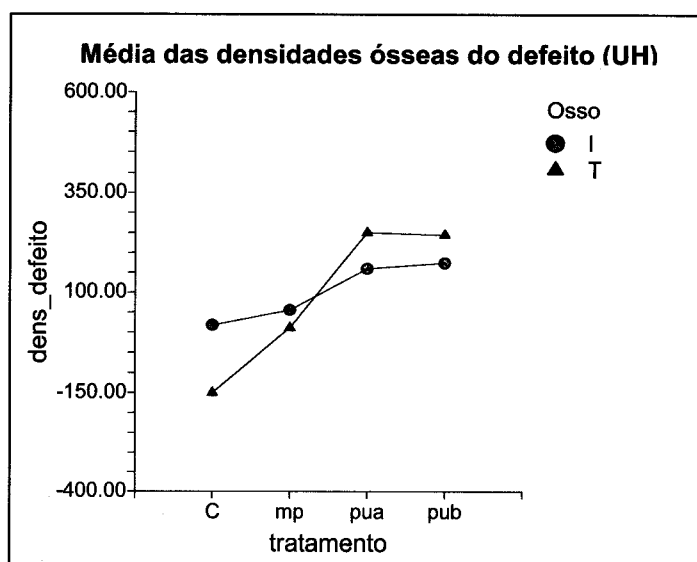


Gráfico 4.8. – Distribuição relativa às médias das densidades ósseas dos defeitos criados (tibia e ilíaco)

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Relativamente ao modelo animal, a sua utilização é essencial em todas as situações de teste para implantes ósseos, na medida em que permitem estudos de longa duração sobre a evolução dos materiais em situações de carga e sem carga. Permitem também o estudo das relações estabelecidas entre o implante e diferentes tipos de tecidos em simultâneo (Pearce *et al.*, 2007).

De acordo com os padrões internacionais, para ensaios de implantação de materiais no osso, os modelos animais mais adequados são os cães, as ovelhas, as cabras, os porcos e os coelhos (Internacional Standard ISO 10993-6, 1994).

A escolha do modelo animal dependerá, porém, do custo de aquisição e manutenção dos animais, da sua disponibilidade, da sua tolerância à captura e da facilidade de manutenção e alojamento (Schimandle e Boden, 1994). Outros factores que poderão condicionar a escolha do modelo animal são a resistência à infecção, uniformidade da espécie, características biológicas análogas ao Homem, tolerância à cirurgia, infra-estruturas e pessoal adequado e a existência de uma base de dados com informação biológica extensa sobre a espécie em questão e a esperança de vida da espécie que deve ser adequada à duração do ensaio (Pearce *et al.*, 2007).

Ovelhas e cabras adultas têm peso vivo comparável ao homem e a dimensão dos ossos longos permite o estudo de implantes semelhantes aos do ser humano (Newman *et al.*, 1995). A ovelha pelo facto de não existirem diferenças significativas na composição mineral e nas taxas metabólicas e a actividade de remodelação ser semelhante à do Homem (Anderson 1999), é considerada um modelo válido para estudo da regeneração óssea e da actividade de remodelação (den Boer 1999).

Por outro lado e face a outras espécies como o porco, a ovelha tem a vantagem do tamanho e da facilidade na sua manipulação pois geralmente são animais dóceis. Neste sentido a ovelha e o cão são as espécies que melhor se adequam a modelos experimentais para testar materiais para implantes ósseos (Pearce *et al.*, 2007).

Na investigação ortopédica o osso da ovelha, como modelo animal, é aceite

incondicionalmente em estudos *in vivo* e está já devidamente documentada (Potes *et al.*, 2008). É utilizada para estudar os processos biomecânicos, bioquímicos e histológicos da biologia do osso (Newman *et al.*, 1995; Nunamaker, 1998).

Do ponto de vista microscópico, há contudo algumas diferenças pois na ovelha o osso é basicamente composto por osteónios primários, estrutura óssea primária com osteónios com menos de 100 μm de diâmetro, contendo pelo menos dois vasos sanguíneos centrais e ausência de uma linha de cimento (de Kleer 2006; Reichert *et al.*, 2009) em comparação com a significativa presença no Homem de osteónios secundários de grande dimensão (Eitel 1981, citado por Reichert *et al.*, 2009). A ossificação secundária na ovelha com sistemas de Havers apenas se processa por volta dos 7 a 9 anos de idade (Liebschner, 2004; Newman *et al.*, 1995).

Embora o osso trabecular da ovelha madura tenha valores de densidade e resistência mais elevados do que o Homem, em ovelhas imaturas a relação inverte-se. O osso nas ovelhas imaturas é mais flexível pois o conteúdo em colagénio é mais elevado (Nafei 2000) mas demonstra valores de remodelação óssea e suprimento sanguíneo comparáveis (Dai 2005).

Nafei *et al.*, (2000) relata a densidade aparente (massa/volume, reproduzindo o grau de porosidade do osso) de osso trabecular de ovelha removida da tíbia proximal de uma ovelha adulta como tendo 0,61 g/cm^3 com densidade aparente e 0,41 g/cm^3 como densidade aparente das cinzas (massa das cinzas/volume, reflectindo o grau de mineralização). Estes valores são mais elevados no Homem, com densidade aparente e densidade aparente das cinzas de 0,43 g/cm^3 e 0,26 g/cm^3 , respectivamente, ou seja o fémur da ovelha tem uma densidade de osso esponjoso 1,5 a 2 vezes superior ao Homem (Liebschner, 2004).

No período de 1990 a 2001 as ovelhas foram o modelo animal escolhido em 9 a 12% da investigação realizada em estudos de fracturas, osteoporose, alongamento de osso e osteoartrite, ao passo que no período de 1980 a 89, esta percentagem era de apenas 5% (Martini *et al.*, 2001). Nos últimos dez anos o número de estudos em que são utilizadas ovelhas ou cabras sofreu um aumento de 11 a 15% (O'Loughlin *et al.*, 2008). Por outro lado, a ovelha e o Homem

apresentam um padrão semelhante de crescimento ósseo para o interior de implantes ósseos (Pearce *et al.*, 2007).

Os animais escolhidos como modelo deverão ser maduros do ponto de vista esquelético, ou seja, deverão ter as placas epifisárias fechadas (radiologicamente) na medida em que existem vários estudos em que, tendo por base modelos imaturos, em que as respostas foram muito variáveis e por vezes com regenerações surpreendentes, que não poderão ser utilizadas ou extrapoladas para o adulto, pois a resposta poderá não ser igual (Bays, 1983, citado por Hollinger e Kleinschmidt, 1990; Prolo *et al.*, 1984).

Outro aspecto crítico a ter em conta é obviamente a velocidade a que se processa a regeneração óssea nos diferentes modelos animais. Sabe-se que à medida que subimos na escala filogenética, vai diminuindo a capacidade para a regeneração óssea espontânea e este factor deverá ser tomado em conta na selecção do modelo animal (Enneking *et al.*, 1975). Nos ratos o *ratio* das dimensões dos defeitos ósseos para o volume de osso craniano regenerável espontaneamente, é de 1,96 ao passo que no ser humano é de 0,12 o que significa que se os *ratia* fossem semelhantes, poderíamos regenerar um defeito craniano no homem até com 23 cm de diâmetro (Hollinger e Kleinschmidt, 1990). Nos ratos, dado serem de crescimento ósseo constante ao longo de toda a vida, as dimensões dos defeitos críticos mantêm-se constantes, enquanto que nas outras espécies habitualmente utilizadas em experimentação, essas dimensões diminuem com o avanço da idade (Hollinger e Kleinschmidt 1990). Uma alternativa ao modelo ovelha na investigação ortopédica, como mencionado anteriormente é o cão (Martini *et al.*, 2001). Algumas características ósseas, como a densidade de alguns dos constituintes do osso, o conteúdo em hidroxiprolina, proteínas extraíveis, IGF-1, fracção orgânica, fracção inorgânica e conteúdo aquoso, fazem do cão o modelo mais próximo do Homem, embora haja diferenças na micro-estrutura óssea e na remodelação (Aerssens *et al.*, 1998). Porém, recentemente, os estudos em cães têm vindo a decrescer por razões éticas.

O porco tem sido também considerado como modelo animal de escolha, apesar da sua rede de osso trabecular ser mais densa do que no Homem

(Mosekilde *et al.*, 1993 citado por Reichert *et al.*, 2009). O porco é descrito por Aerssens *et al.*, (1998) como um modelo representativo do processo de regeneração óssea humana no que diz respeito a características morfológicas e anatómicas, capacidade de cicatrização e remodelação e densidade mineral óssea. Contudo, os porcos são preteridos face às ovelhas ou cabras dada a dificuldade do seu maneio. Além disso, no porco, o comprimento da tíbia é curto, o que implica o uso de implantes especiais diferentes dos de uso humano (Reichert *et al.*, 2009).

Por todas as razões apontadas, a ovelha foi o modelo animal escolhido e cremos que este cumpriu, para a realização deste trabalho as expectativas criadas e desempenhou um papel adequado.

Serão estas as únicas alternativas ao estudo do osso? Há outras alternativas que são de execução mais fácil, menos dispendiosas de tempo e dinheiro. Existe a possibilidade de estudar a regeneração óssea utilizando ossos de animais adultos em cultura, como demonstra Torricelli *et al.*, (2008) num estudo com fémures de rato aos quais são aplicados arginina e lisina. A limitação destes estudos é o facto de não permitir estudar o osso sob carga mecânica.

A técnica cirúrgica que foi adoptada permitiu atingir os objectivos relativamente ao modelo cirúrgico, que ficou estatisticamente validado pois de um total de 24 ovelhas operadas todas recuperaram rapidamente a locomoção normal e foram validadas para efeitos de avaliação de resultados.

Reichert *et al.*, (2009) fez uma revisão da literatura corrente sobre modelos pré-clínicos e conclui que a maioria não está bem descrita, bem definida nem sequer estandardizada. Este mesmo autor considera que a informação contida na revisão feita por O'Loughlin (2008) é rudimentar no que concerne à forma como estabelecer, de forma relevante, defeitos segmentares em modelos de grandes animais.

Cremos que em termos de sistematização e estruturação, este trabalho e as condições no qual foi executado, são facilmente reprodutíveis o que é uma mais valia num trabalho científico.

Estes factos permitem, em nosso entender, concluir que, quer a técnica,

quer os acessos cirúrgicos foram ambas escolhas adequadas.

No que concerne aos locais escolhidos para a criação dos defeitos, a metáfise proximal da tíbia, rica numa rede de osso esponjoso tem sido utilizada como local dador para enxertos ósseos (O'Keeffe *et al.*, 1991), o mesmo acontecendo com a tuberosidade da tíbia (Gogolewski e Gorna, 2007), como foi por nós utilizada.

Sivarajasingam *et al.*, (2001) comparou os dois locais dadores utilizados, tíbia proximal e crista ilíaca e concluiu que a regeneração na tíbia se processa a um ritmo mais rápido, embora segundo Thomsen *et al.*, (2005) este local dador possa estar na origem de inúmeras e possíveis complicações técnicas.

DeCoster TA, (2004) defende que a haste da tíbia representa a localização anatómica mais utilizada para defeitos segmentares dado ser quase isenta de cobertura muscular na sua superfície antero-medial.

A escolha da crista ilíaca como local dador está amplamente descrita e recomendada na bibliografia, podendo a colheita ser mono, bi (Gogolewski e Gorna, 2007) ou tricortical como no presente estudo.

As análises estatísticas que comparam os volumes dos defeitos criados nas duas localizações anatómicas foram escolhidas de acordo com protocolo estabelecido, uma vez que o defeito da crista ilíaca é de dimensão superior ao da tuberosidade da tíbia.

As análises estatísticas que compararam as densidades ósseas globais e as dos defeitos nos dois locais seleccionados foram também escolhidas de acordo com os resultados esperados do ponto de vista biológico.

Em nosso entender e face ao estado da arte, as localizações anatómicas escolhidas são adequadas e provaram a sua eficácia.

A criação de um defeito ósseo crítico é um ponto fulcral de um estudo de regeneração óssea dada ser esta a condição para avaliar, de forma exaustiva, a capacidade de determinado material promover eficazmente a regeneração óssea. Quando criamos um defeito verdadeiramente crítico, pura e simplesmente impedimos a regeneração óssea espontânea ao ser ultrapassada a capacidade fisiológica, do osso em questão, para restabelecer a continuidade óssea. Um pré-requisito indispensável para qualquer modelo animal utilizado para testar

substitutos ósseos, é que o defeito no grupo controlo não regenere ou regenere mais lentamente que o defeito tratado, o que foi observado, como referido anteriormente.

Schmitz e Hollinger (1986) definiram o defeito crítico como sendo o defeito intra-ósseo mais pequeno que não regenera através de formação óssea, durante a vida do modelo animal em questão.

Relativamente à dimensão, os defeitos a estudar deverão ser sempre maiores do que o que é definido como defeito crítico, uma vez que este é um valor pontual e limite relativamente à possibilidade da reparação espontânea, para além do facto do grau de incerteza biológica tornar a sua definição difícil (Coelho, 2003). Este conceito foi detalhadamente redefinido por Hollinger e Kleinschmidt (1990) sendo assim um defeito crítico aquele em se observa menos de 10% de regeneração óssea, nesse mesmo defeito, durante a vida do modelo animal. Na prática, se isto não acontecer ao fim de um ano, é pouco provável que venha a acontecer e teremos então, como consequência uma não-união. A não-união é uma combinação de cicatrização óssea e fibrosa mas que não assegura a continuidade óssea nem a funcionalidade desse mesmo defeito.

Os defeitos críticos cicatrizam por tecido conjuntivo e não por crescimento ósseo (Hollinger e Kleinschmidt, 1990). Segundo estes autores, há essencialmente dois métodos de provocar uma não-união: um que passa por prevenir a regeneração óssea e outro passa por preparar um defeito ósseo que seja de tamanho suficientemente crítico que impossibilite para o modelo animal em questão e por processos naturais, a sua regeneração ou seja um verdadeiro defeito crítico. O primeiro método é obviamente ineficaz na medida em que é totalmente falível, havendo inúmeras variáveis não controláveis. O segundo método é o método mais eficaz e o que foi por nós utilizado.

Gugala e Gogolewski (1999) num estudo de defeitos segmentares da diáfise da tíbia de ovino com quatro centímetros de comprimento, referidos como “maiores do que os defeitos de dimensões críticas”, abordaram os limites do conceito alargando-o, defendendo que o defeito de dimensões críticas é o menor defeito que, quando coberto com uma membrana apropriada, não cura espontaneamente, necessitando da associação com enxerto ósseo autólogo ou

outro substituto ósseo desejável. Parece assim razoável que quanto ao estabelecimento de uma medida específica para determinar um defeito de dimensões críticas, se torne mais real determinar se o defeito é ou não crítico quanto às suas condições “móveis” (dinâmicas) e não apenas às condições “fixas” (dimensões), dado o carácter falível da determinação de uma medida crítica exacta. Ou seja, estes autores introduzem uma noção dinâmica de defeito crítico. Este é em nosso entender a perspectiva mais correcta e menos falível.

Lemperle *et al.*, (1998) refere no seu estudo a notável regeneração óssea espontânea observada num defeito com membrana macroporosa e vai mesmo ao ponto de afirmar que dentro dos defeitos de dimensões críticas, estes devem ser diferenciados ainda em função da preservação ou não do perióstio e em função da protecção do defeito com uma membrana. O perióstio assegura a vascularização e o fornecimento de células osteogénicas e a existência de uma membrana protectora que impede a invasão do defeito por tecidos moles circundantes.

Defeito crítico num osso segmentado definido por Gugala *et al.*, (2007) é aquele cujo tamanho correspondente a duas a duas vezes e meia o diâmetro desse mesmo osso, embora na ovelha possa mesmo superar três vezes o diâmetro da diáfise correspondente. De acordo com esta definição, o defeito da tibia que estudamos não seria crítico. O que o torna crítico é o facto de, no grupo controlo, este defeito não ter regenerado ao fim das 26 semanas de período experimental. No presente estudo não só os defeitos pelas suas dimensões cumprem o requisito de defeitos críticos, como o facto do defeito no osso ilíaco ser tricortical e sem reposição de perióstio, torna a sua regeneração ainda mais do domínio da utopia, como foi anteriormente referido (Gogolewski *et al.*, 2006; Gogolewski e Gorna, 2007).

A decisão de realizar as eutanásias à 26.^a semana, baseia-se no facto de que em numerosos estudos, a partir do quinto mês pós-cirurgia as alterações de mineralização observada não são significativas pois Toriumi *et al.*, (1999) demonstrou que em mandíbulas de cães de raça Beagle reconstituídas após recessão segmentar da mesma, o osso induzido por rhBMP-2 a partir dos 5 meses

apresentava estabilidade do conteúdo mineral, sem evidência radiológica de reabsorção.

Reichert *et al.*, (2009) na sua revisão considera que a maioria dos estudos existentes, pelo facto de os períodos de seguimento não excederem seis meses, não são adequados para a avaliação a longo prazo dos efeitos dos substitutos ósseos e das estruturas temporárias na regeneração e na remodelação ósseas, nem para determinações *in vivo* de cinéticas de reabsorção do respectivo biomaterial.

Em relação aos métodos de avaliação seleccionados, a coloração fluorescente intravital permite obter informação do estado funcional dos tecidos, registar a sua história biológica diminuindo assim a necessidade da captura e da análise de séries consecutivas de momentos isolados, bem como limitar, de forma considerável, o número de animais experimentais e reduzir a quantidade de trabalho requerido (Rahn, 1999).

A largura da banda marcada no tecido ósseo depende do período de tempo em que o corante circula no sangue (período de semi-vida, curto para a calceína verde e médio para o xilenol laranja) e da via de administração, como foi anteriormente mencionado.

Com a utilização destes diferentes marcadores que emitem diferentes fluorescências, foi-nos possível obter dados dinâmicos ao longo do período experimental, calculando a velocidade de aposição de tecido ósseo na área tratada (Quadro 4.14.). Para as tíbias a determinação da TAM foi de fácil execução, o que não aconteceu para as cristas ilíacas embora Frost *et al.*, (1961), citado por Bloebaum *et al.*, (2007) afirme ser possível determinar a TAM medindo a distância entre duas marcações fluorescentes paralelas.

A primeira avaliação que foi realizada foi a tomografia axial computadorizada aos implantes incluídos, para ambos os ossos, na sua totalidade. Os cortes só foram realizados após as macrorradiografias uma vez que estas nos permitiram delimitar, com precisão, a zona onde o implante foi colocado. A utilização deste exame complementar permitiu a determinação dos valores de densidade óssea (aparente), a medição dos volumes ósseos correspondentes aos

locais dos defeitos ósseos e a visualização, em excelentes condições, das zonas dos defeitos ósseos bem como as zonas adjacentes.

Existem factores de variabilidade individual, como a carga mecânica ou a magnitude do peso aplicado a determinado osso que podem afectar o volume relativo desse mesmo osso, através da modulação da espessura das trabéculas (Mullender *et al.*, 1996).

Relativamente ao conceito de densidade Parfitt *et al.*, (1987) propõe que esta deva ser restrita ao mesmo conceito em física, ou seja massa/volume. A densidade do osso foi medida em unidades Hounsfield (UH), que mede a densidade do tecido duro incluindo todos os seus constituintes não-ósseos e cujos valores para água e ar são respectivamente 1 UH e -1000 UH. Isto significa que estes valores são assim de densidade aparente pois na actualidade nenhum aparelho de absorciometria mede apenas a densidade da componente mineral do osso.

As peças após este estudo foram radiografadas em aparelhos de mamografia onde se obtiveram as ampliações por macrorradiografia. Este estudo permitiu-nos delimitar com maior precisão as áreas de corte para preparação das lâminas histológicas. A macrorradiografia fornece uma imagem do crescimento ósseo em radiografias de alta resolução. Este exame permite detectar os limites do osso com detalhe, permite visualizar todo o defeito e permite, inclusivamente, medir áreas de crescimento do osso. A macrorradiografia tem limitações pois por um lado não consegue acompanhar o crescimento ósseo a nível celular, ao contrário da histologia e, por outro, só permite detectar tecido calcificado. A macrorradiografia permite fazer um estudo qualitativo respeitante à presença de osso neoformado mas não quantitativo, por não permitir quantificar, de forma rigorosa, o volume deste.

Como avaliação qualitativa e quantitativa e em virtude de termos seleccionado o estudo de osso não descalcificado, o estudo final foi o estudo histomorfométrico. A histologia permite aliar uma resolução excepcional apenas num plano com uma capacidade de detalhe, sem paralelo, noutro qualquer método de avaliação. A análise histomorfométrica pode ser utilizada para estimar o número de células e crescimento de tecido para o interior do material de suporte. A

análise histológica permite, por exemplo, identificar com facilidade o recrutamento de macrófagos ou outras células associadas a uma resposta inflamatória face a um biomaterial implantado. As secções histológicas podem ser coradas com corantes policromáticos apropriados de forma a identificar múltiplos tipos de tecidos (ex: Giemsa-eosina como foi utilizado neste projecto) ou apenas vistas sob luz polarizada de forma a avaliar a organização da matriz extracelular (Guldborg *et al.*, 2008).

A utilização de amostras não descalcificadas permite a diferenciação de osso maturo e imaturo e a quantificação de variáveis como a existência de osso na interface do implante, a densidade da área de crescimento ósseo e a velocidade da aposição óssea (Cano-Sánchez *et al.*, 2005).

O protocolo seguido foi o de Donath (1995) através do sistema EXAKT. Este sistema requer equipamento e produtos específicos para levar a cabo as diferentes fases do processo. Estas técnicas de laboratório, dado requererem longos períodos de tempo nas diferentes fases, não são normalmente utilizadas no diagnóstico, sendo utilizadas sobretudo em estudos experimentais e para o ensino. Há no entanto, outras aplicações entre as quais a avaliação clínica da origem (endodérmica ou ectodérmica) de tumores com invasão óssea. É ainda uma das técnicas utilizadas no estudo histológico de patologias ósseas como a osteopetrose e a osteomielite (Semba *et al.*, 2000).

Apesar destas excepcionais características da avaliação histológica *per se*, esta pode também complicar a capacidade de avaliação das interfaces entre o tecido e o biomaterial implantado por discrepâncias físicas e químicas, que podem resultar em artefactos por distorção ou mesmo separação de tecidos durante a secção das peças. Por outro lado, o processamento histológico é moroso e não permite, com rigor, uma representação tridimensional da formação de novo tecido nos materiais de suporte porosos. De acordo com Guldborg *et al.*, (2008) este método pode não ser suficiente para quantificar a formação tridimensional de novo tecido em múltiplos materiais e não ser assim ideal para comparações estatísticas entre diferentes grupos experimentais. Por outro lado, em tecidos altamente vascularizados a capacidade de avaliação tridimensional é muito valiosa,

sobretudo em estudos que explorem a capacidade de estimular a regeneração, via estratégias terapêuticas angiogénicas (Silva e Mooney, 2007 citados por Guldberg *et al.*, 2008). A histologia como método de avaliação tem contudo limitações na medida em que as secções reflectem apenas uma área específica não reflectindo necessariamente todo o defeito.

A avaliação bidimensional que a histomorfometria permite é aceitável para as medições que fizemos como medições de espessuras, distâncias entre pontos ou linhas, contagens de determinado elemento, pois permite avaliar perfis de estruturas tridimensionais como o osso. Para além disso o significado diagnóstico das medições ou o significado estatístico de uma experimentação não são afectados pelo facto do estudo ser bidimensional. Contudo o estudo do osso apenas ficará completo se for feito um estudo tridimensional, o que é possível através da utilização de dados de histomorfometria com dados imagiológicos acessórios como TAC ou macrorradiografia.

A histologia continua a ser o método de eleição para a avaliação da reacção do tecido hospedeiro aos biomateriais aplicados e à formação de matriz extracelular formada dentro dos poros de inter-conectividade dos diferentes tipos de materiais de suporte utilizados.

A análise histológica é assim considerada o “gold standard” para a avaliação do crescimento ósseo em defeitos ósseos (Jones *et al.*, 2007; Thorwarth *et al.*, 2007). Efectivamente, a histomorfometria óssea é o único método disponível para estudar a função da célula óssea dentro de um contexto *in vivo* estrutural (Rauch *et al.*, 2000).

A histologia permite avaliar entre outros aspectos: a degradação sofrida pela estrutura temporária; a vascularização do implante e da zona circundante; a regeneração tecidular e a actividade fagocitária. Relativamente à tíbia e para os parâmetros estudados, as medições foram de fácil execução o que não aconteceu para a crista ilíaca, daí que a opção, para esta localização, tenha sido a avaliação histológica qualitativa e a avaliação quantitativa apenas com base nos resultados obtidos nas tomografias realizadas.

Na crista ilíaca e uma vez que a avaliação microscópica quantitativa é

complexa, poderá de futuro ser adoptado o método de avaliação de Mullender *et al.*, (1996) que propõe a escolha de quatro campos de dezasseis mm² com localização fixa com localizações específicas. O número de núcleos dos osteócitos por área de osso deve ser medido num total de 32 campos escolhidos aleatoriamente com áreas de 0,16 mm² em 16 secções consecutivas. Este método poderá ser utilizado com vista a uma análise histomorfométrica mais exaustiva da crista ilíaca.

Por todas estas razões apontadas, a análise histológica e respectivo estudo histomorfométrico foi o método adoptado. Como a opção neste trabalho foi um estudo o mais exaustivo possível, utilizámos quer a coloração Giemsa-eosina (Bradbeer *et al.*, 1994) para a diferenciação do osso de tecidos circundantes quer a utilização de corantes intravitais fluorescentes.

De futuro uma abordagem possível cremos que possa ser não só um processo de avaliação radiológica em vida do animal, bem como a colheita de amostras de medula óssea, colhida deste mesmo local, em intervalos de tempo determinados e para avaliação da TAM.

Relativamente aos materiais testados, em nossa opinião o trabalho que sustenta este projecto é pertinente e actualizado dado que nenhum substituto ósseo até hoje conhecido substitui em pleno (*ad integrum*) o osso perdido. Após mais de 100 anos de substitutos ósseos e quase 20 anos de engenharia tecidual, não há ainda uma alternativa terapêutica totalmente satisfatória para os enxertos autólogos nos defeitos ósseos críticos (Schieker *et al.*, 2006).

Como foi anteriormente referido, a panóplia de possibilidades para a substituição óssea é extensa mas em todos eles há funções em falta, ainda que recorrendo à utilização de uma combinação de substitutos ou estratégias.

Sendo o osso um órgão complexo e composto não apenas por células mas também pela matriz calcificada e por todas as outras células não ósseas, pelos vasos sanguíneos, pelas fibras nervosas e medula óssea, só fará sentido falar em *restitutio ad integrum* se com esta for obtida a reconstituição de todos os componentes ósseos e respectiva vascularização. É também imperioso que a função original seja readquirida.

A avaliação qualitativa da existência de osso neoformado na zona central do defeito é óbvia uma vez que macroscopicamente este é observável na zona do defeito dos grupos tratados, quer na crista ilíaca quer na tibia.

Estes resultados são também confirmados pela existência, na zona dos defeitos dos grupos “tratados”, de inúmeras células ósseas organizadas em osteónios como resultado de uma ossificação em consequência da utilização de uma substância osteopromotora. Nas cavidades medulares das tíbias dos grupos tratados com esponjas de poliuretano, de ambas as composições, ocupada em condições normais por medula óssea, foi visível, macro e microscopicamente, uma quantidade exuberante de osso neoformado sobre o poliuretano implantado.

A inserção de implantes no osso esponjoso, seja de que natureza for, conduz a uma inflamação com libertação de citocinas e factores de crescimento o que eventualmente estimula a diferenciação de células formadoras de osso (Wermelin *et al.*, 2008). Este facto *per se* é osteoindutor, independentemente do material testado.

Os parâmetros estudados foram, como referidos anteriormente, a espessura das corticais laterais da tibia, o número de osteónios por campo óptico, o diâmetro dos osteónios por campo óptico, a densidade de osteónios por campo óptico, a taxa média de aposição mineral (TAM), o volume ósseo médio ocupado pelo defeito (tibia e ilíaco), o valor médio de densidade óssea periférica da tibia e do ilíaco e o valor de densidade óssea no próprio defeito.

De uma forma geral a membrana polimérica de ácido poli(L/DL-láctico) 80/20 exibiu características macroscopicamente distintas, embora não estatisticamente significativas, face ao grupo controlo, GI. Entre o grupo II (com membrana polimérica de ácido poli(L/DL-láctico) 80/20) (Quadro 4.4 e 4.5.) e os grupos tratados com esponjas de poliuretano, observaram-se diferenças estatisticamente significativas quer com a composição A (Quadro 4.6. e 4.7.) quer com a composição B (Quadro 4.8. e 4.9.).

No grupo I, sem qualquer aplicação de membrana ou esponja de poliuretano foi macroscopicamente evidente uma acentuada invaginação dos tecidos circundantes para o interior do defeito (Fig 4.3.) sem restabelecimento da continuidade óssea entre os dois topos do defeito, o que não ocorreu no grupo II.

No grupo II foi observado em todos os animais o restabelecimento da continuidade óssea (Fig. 4.6.) e apenas num deles há uma ligeira invaginação de tecidos moles para o interior do defeito, sem contudo impedir o restabelecimento dessa mesma continuidade óssea. Em nenhum deles se observou a presença de “ilhotas” de tecido ósseo na cavidade medular, ao contrário do que foi observado nos grupos tratados com esponjas de poliuretano das duas composições distintas. O facto da membrana ser porosa permitiu a angiogénese na zona do defeito assim como a invasão desta zona por células osteogénicas (Fig 4.7. e 4.8.) que permitiram a neoformação óssea junto da membrana e mesmo no interior dos poros desta. Nas Fig 4.7. 4.8. e 4.15. é perfeitamente visível a invasão por osso neoformado nos próprios poros da membrana, bem como a coloração negra a rodear os mesmos, resultante da infiltração por “indian ink” (4.15.) o que indica a neoformação de vasos junto desta zona. As zonas de fluorescência observadas no interior dos poros (Fig. 4.8.) revelam a forte presença de osso neoformado neste local. A presença da neoformação óssea directamente sobre a membrana polimérica é um claro indicador da sua biocompatibilidade (Gogolewski *et al.*, 2000), assim como o facto de uma das extremidades da membrana estar totalmente envolvida por osso neoformado (Fig. 4.9.).

Em estudos anteriores em modelo coelho, a utilização de uma membrana polimérica de ácido poliláctico a cobrir um defeito ósseo diafisário, revelou resultados semelhantes ao que foi por nós observado pois nesse referido estudo a membrana aplicada teve os seguintes efeitos: restringiu a invasão do defeito com tecidos moles, o que poderia ter inibido a regeneração óssea; manteve na cavidade medular formada pela membrana, as células osteogénicas libertadas pelos topos ósseos e medula óssea, caso a dimensão dos poros o tenha permitido (Pineda *et al.*, 1996) e permitiu um substrato adequado para o crescimento de células osteogénicas a partir dos topos ósseos (Gogolewski *et al.*, 2000). Estes resultados não são surpreendentes pois noutros estudos anteriores ficou demonstrada também a capacidade deste polímero para suportar a adesão, o crescimento, a migração e a diferenciação de células formadoras de osso (Gugala e Gogolewski, 2000; Gogolewski *et al.*, 2001; Gugala e Gogolewski, 2004a; Gugala

e Gogolewski, 2004b; Gugala e Gogolewski, 2005; Ip e Gogolewski, 2004). Estes mesmos materiais impregnados com medula óssea autóloga promoveram a regeneração em defeitos de ossos longos em pacientes humanos (Ip e Gogolewski 2004).

Também Meinig *et al.*, (1996) refere neoformação e regeneração óssea completa em defeitos segmentares diafisários do rádio de coelhos, tratados com membranas microporosas de ácido poliláctico em forma de cilindro, com afastamento do periósteo. Em contrapartida, no grupo controlo, não houve regeneração óssea após um período de 16 semanas, tendo como resultado uma não-união atrófica com posterior invasão da musculatura circundante. O grupo tratado com a membrana desta mesma composição e com diâmetro de poros entre 0,5 a 1 μm apresentou uma regeneração óssea mais consistente do defeito. Posteriormente num modelo experimental ovino (Gugala e Gogolewski 1999 e 2002) testaram a eficácia de uma membrana microporosa (50 a 70 μm) em defeitos tibiais de 4 cm do tipo osteo-periósticos. Estes defeitos foram tratados também com fixação externa bilateral. As membranas microporosas foram utilizadas aplicadas nos grupos controlos ou simples ou dupla (anatomicamente implantada formando um tubo duplo) e nos grupos tratados simples com combinação de enxerto esponjoso autólogo ou dupla com a mesma combinação. No grupo tratado com membrana simples com enxerto autólogo e na face postero-lateral, a regeneração óssea observada foi mais eficiente, com formação de uma ponte óssea de osso neoformado altamente mineralizado. Na face antero-medial observou-se uma reabsorção óssea significativa do enxerto ósseo, tendo como resultado a formação de osso neoformado de estrutura entrançada ou imatura, disperso pelo defeito. Nos grupos tratados com membrana dupla enriquecida com enxerto ósseo, foi observada uma regeneração óssea mais evidente devida a uma reconstituição do enxerto mais uniforme. Foi também observado osso neoformado no espaço entre as duas membranas aplicadas juntas. À semelhança do que foi observado nos grupos de membrana simples, a reconstituição observada foi mais eficiente na face postero-lateral. A reabsorção óssea na face antero-medial foi também observada mas de forma menos pronunciada. O enxerto ósseo comunicou com os tecidos adjacentes através das perfurações na membrana e

este contacto mostrou-se determinante na sobrevivência do mesmo e na sua funcionalidade. O enxerto não só se nutriu a partir dos tecidos circundantes, como o facto da neoformação óssea observada na membrana dupla ser mais consistente, indica que este se nutriu também a partir da cavidade medular (Gugala *et al.*, 2007). O facto de ter sido observada neoformação óssea mais pronunciada na face postero-lateral comparada com a face antero-medial, sugere de forma inequívoca a contribuição dos tecidos moles circundantes para a nutrição do enxerto contido no interior das membranas.

Este estudo referido, à semelhança do que foi por nós observado, reforça a importância da membrana enquanto barreira para impedir e invasão do defeito ósseo pelos tecidos moles circundantes o que, claramente, prejudica ou mesmo impede a regeneração óssea. Neste mesmo estudo e para os grupos controlos, após um seguimento de 16 semanas não foi observada qualquer neoformação óssea nos grupos tratados com membranas sem enriquecimento com enxerto ósseo. A actividade óssea observada foi marginal e a maioria da zona do defeito demonstrava um tecido fibroso não mineralizado.

Pineda *et al.*, (1996), Gugala e Gogolewski (1999) e Gogolewski *et al.*, (2000) propõem a utilização deste polímero como barreira para impedir a interposição de tecidos moles no defeito ósseo o que se traduz num factor de atenuação de condições desfavoráveis, promovendo a regeneração óssea guiada ROG e angiocondução através dos seus poros.

É assim tentador assumir que o factor principal que determina a sobrevivência e a funcionalidade de um implante ósseo em contacto com os tecidos que o circundam, é a qualidade da interface entre eles e assim, estas membranas poliméricas perfuradas microporosas poderão providenciar esta interface.

O presente trabalho, comparativamente a estudos anteriores, utilizou o modelo animal ovelha num estudo de 26 semanas e a aplicação de uma membrana polimérica microporosa com poros de diâmetro 100 a 150 µm, isoladamente no grupo II, e a recobrir as esponjas de poliuretano nos grupos III e IV. Os locais de aplicação foram, como referido anteriormente, um defeito monortical na tuberosidade da tíbia e um defeito tricortical na crista do ilíaco.

Inúmeros estudos anteriores referidos apontavam já para a importância vital desta membrana como interface com o substituto ósseo implantado. Este estudo veio reforçar esta assumpção ao confirmar as vantagens da utilização do poliuretano elastomérico biodegradável como substituto ósseo em condições menos críticas do ponto de vista dinâmico com a aplicação da membrana.

A utilização do polímero de ácido poli(L/DL-láctico) 80/20 como biomaterial para substituição óssea nas referidas condições experimentais, permitiu obter resultados que, embora não sendo estatisticamente significativos demonstraram uma evidente capacidade de significativa para a osteopromoção.

A existência de neoformação óssea no interior dos poros da membrana e na superfície desta, estabelecendo uma evidente continuidade óssea a unir os topos ósseos do defeito sugere fortemente que a própria membrana, poderá funcionar como substrato ósseo em determinadas condições, desde que seja nutrida pelos tecidos circundantes.

Sob o ponto de vista quantitativo, os parâmetros estudados tais como: as espessuras das corticais laterais da tibia (Quadro 4.10. e Gráfico 4.1.); TAM (Quadro 4.14. e Gráfico 4.5.); volume ósseo do defeito do ilíaco (Quadro 4.15. e Gráfico 4.6.); valor de densidade óssea periférica do ilíaco (Quadro 4.16. e Gráfico 4.7.) e densidade óssea do ilíaco (Quadro 4.17. e Gráfico 4.8.), os valores foram sempre mais elevados nos grupos tratados (GII; GIII; GIV) do que no grupo controlo (GI), embora nem sempre as diferenças tenham sido estatisticamente significativas. Quanto ao número de osteónios por campo (Quadro 4.11. e Gráfico 4.2.); as densidades de osteónios por campo óptico (Quadro 4.13. e Gráfico 4.4.) e à densidade óssea no defeito da tibia (Quadro 4.17. e Gráfico 4.8), os resultados obtidos com este material em estudo apresentam também diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Estes factos são reveladores da importância da presença desta membrana em termos de osteopromoção de defeitos críticos.

No que respeita às esponjas de PU, de uma forma geral e para ambas as composições A e B, os resultados são distintos quer do grupo controlo (GI) quer do grupo tratado apenas com membrana polimérica de ácido poli(L/DL-láctico) 80/20 (GII), uma vez que ao nível da tibia não só se observou total continuidade óssea



em todos os espécimes, como se observou presença de osso neoformado na cavidade medular (Fig 4.12. a Fig 4.15 e Fig 4.18. a Fig. 4.23.). Nos grupo controlo não se observou continuidade da cortical ao nível da osteotomia realizada, apenas se observou que os defeitos ósseos estavam parcialmente preenchidos com tecido fibroso.

Nos defeitos da crista ilíaca dos grupos tratados com esponjas de poliuretano de ambas as composições A e B, observou-se macro e microscopicamente o preenchimento do defeito ósseo com neoformação óssea (Fig. 4.11. A, B, C e D e Fig. 4.17. A, B, C e D) .

Nestes dois grupos tratados (GIII e GIV) a ponte de tecido ósseo que une os topos inicialmente separados pela osteotomia quando observada macroscopicamente, apresentou uma espessura superior à do grupo II, o que, cremos, se deve à presença do poliuretano enriquecido e o facto deste poder ser osteoindutor. O facto do poliuretano poder ser osteoindutor é afirmado por diversos autores baseados em estudos *in vitro* (Grad *et al.*, 2003; Grad *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005; Chia *et al.*, 2006; Gorna e Gogolewski, 2006) que demonstraram que esponjas tridimensionais porosas e membranas microporosas de poliuretano permitiram a adesão, crescimento e proliferação de condrócitos de bovino. Estes estudos aplicados *in vivo* em modelo animal sugeriram também que as estruturas de poliuretanos à base de “isosorbides” biodegradáveis podem ser promissoras candidatas a substitutos de osso esponjoso e como substitutos para reparação das cartilagens articulares (Gorna e Gogolewski, 2006).

O poliuretano alifático por nós utilizado foi produzido utilizando 1,4:3,6-dianhidro-D-sorbitol (“isosorbide”) como extensor da cadeia para a produção de poliuretano biodegradável uma vez que, como mencionado anteriormente, este composto foi considerado particularmente promissor para este tipo de aplicações biomédicas (Gorna e Gogolewski, 2003). O “isosorbide” e os seus derivados são farmacologicamente activos como vasodilatadores (Capper *et al.*, 2003) e como agentes promotores da formação de osso (Jamal *et al.*, 2004). Especula-se que a incorporação desta molécula na estrutura posterior da cadeia de poliuretano possa original um material com actividade biológica acrescida, sobretudo por ter

permeabilidade aumentada da membrana celular (Jamal *et al.*, 2004).

É também certo que este tipo de estrutura de poliuretano poroso elastomérico tem um efeito promotor de adesão e proliferação de determinado tipo específico de células, estimulando assim o seu potencial reparativo e regenerativo.

Assim utilizados como substituto do osso esponjoso, estes materiais de suporte baseados em “isosorbide”, poderão promover a regeneração óssea (Gorna e Gogolewski, 2006).

As “ilhas” de tecido ósseo na cavidade medular (Fig. 4.12. e Fig. 4.18.), observadas nos GIII e GIV, correspondem à presença de numerosos osteócitos e osteónios junto do implante e dos próprios poros do implante o que demonstra, segundo Guedes *et al.*, (2007), a elevada qualidade do osso neoformado (Fig. 4.20. a Fig 4.23). Este osso neoformado observado é do tipo entrançado ou imaturo, não organizado em osteónios o que indica intensa actividade osteogénica.

De acordo com Gogolewski *et al.*, (2000), o crescimento de osso neoformado na zona de interface ou mesmo em contacto directo com os substitutos ósseos, é uma indicação da sua biocompatibilidade.

Gogolewski e Gorna (2007) utilizando implantes porosos de poliuretano de hidrofilicidades diferentes em defeitos ilíacos monocorticais sem reposição de córtex, verificaram que do ponto de vista histológico o osso esponjoso do grupo em que os implantes tinham uma componente hidrofílica superior, apresentava uma componente mineral mais elevada e era radiologicamente mais denso que o osso nativo e com uma quantidade de fosfato de cálcio mais elevada. Nos grupos implantados apesar da neoformação óssea observada, o córtex não se formou, tendo-se formado sim uma camada de tecido mole que cobriu o osso esponjoso neoformado. Nos grupos controlo não houve osso neoformado ao longo do período em que decorreu o estudo. A estrutura do osso esponjoso neoformado nos animais operados era inclusivamente mais densa que a do osso nativo (Gogolewski *et al.*, 2006). Os mesmos autores verificaram também que o poliuretano elastomérico utilizado como substituto ósseo em defeitos bicorticais no ilíaco em ovelhas com défice de estrogénio induzia a regeneração óssea. Nestes dois estudos referidos, ambos em defeitos críticos e para os grupos controlo, não

foi observada regeneração óssea dos defeitos e não houve restabelecimento da continuidade óssea, criada pela osteotomia, à semelhança do que foi por nós observado. O presente trabalho é, ao nível da crista ilíaca, uma agudização da situação de criticidade uma vez que nos trabalhos anteriormente referidos foram testadas as esponjas de poliuretano sem enriquecimentos e em defeitos monocorticais (Gogolewski e Gorna 2007) e bicorticais da crista ilíaca Gogolewski *et al.*, 2006), sendo que no presente trabalho o defeito é tricortical e com enriquecimentos mencionados anteriormente. Estes resultados observados por nós vêm assim confirmar o que foi observado em trabalhos anteriores.

De acordo com Gogolewski e Gorna (2007) implantes com uma componente hidrofílica superior apresentam uma componente mineral mais elevada e, radiologicamente, o osso neoformado é mais denso que o osso nativo, com uma quantidade de fosfato de cálcio mais elevada. Estes implantes podem apresentar no entanto, uma biodegradação mais rápida o que pode ser uma desvantagem pois uma biodegradação “aleatória” pode originar uma deterioração dramática da resistência do material (Hutmacher, 2007).

No presente estudo e tendo as esponjas de PU um *ratio* 50/50 hidrofílico e hidrofóbico, a biodegradação poderá ser retardada até que haja regeneração óssea suficiente, o que é obviamente desejável pois pretende-se que a taxa de degradação do substituto seja apropriada à taxa de crescimento ósseo local para que no momento da total regeneração haja também total biodegradação (Langer e Vacanti, 1993).

O facto de apresentar enriquecimento em hidroxiapatite obviamente que lhe confere capacidades osteocondutoras mais elevadas (Hing 2004; Gorna e Gogolewski, 2006) que o PU estudado em trabalhos anteriores. O enriquecimento com sistema de creatina/putrescina e lecitina de soja certamente contribuiu para a eficaz e exuberante regeneração óssea observada uma vez que estes componentes apresentam comprovada capacidade de adesão celular (Todd *et al.*, 2006; Wang Y *et al.*, 2008) e um acréscimo de hidrofilicidade (Wang Y *et al.*, 2008).

A utilização de um polímero tridimensional de poliuretano sob a forma de

esponjas de composição A – GIII (PUA) como substituto ósseo permitiu obter uma neoformação óssea mais eficaz e mais exuberante, traduzido numa taxa de aposição mineral mais elevada (Quadros 4.14. e Gráfico 4.5.) e uma densidade óssea do defeito tibia (Quadro 4.17 e Gráfico 4.8), ambos resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Por outro lado, a utilização de um polímero tridimensional de poliuretano sob a forma de esponjas de composição B – GIV (PUB), em idênticas condições experimentais, permitiu também a obtenção de neoformação óssea mais eficaz, traduzida num aumento do número de osteónios por campo óptico (Quadro 4.11. e Gráfico 4.2.), da densidade dos osteónios por campo óptico (Quadro 4.13. e Gráfico 4.4) e da e uma densidade óssea do defeito tibia (Quadro 4.17 e Gráfico 4.8), ambos resultados estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Relativamente às outras variáveis estudadas, nomeadamente a espessura das corticais laterais (Quadro 4.10. e Gráfico 4.1.); o diâmetro dos osteónios por campo óptico (Quadro 4.12. e Gráfico 4.3) foram observados valores mais elevados nos grupos III e IV, o que, ainda que estatisticamente não significativos, justificam plenamente uma regeneração óssea mais eficaz.

Relativamente à comparação entre os volumes dos defeitos criados nos dois ossos em estudo, tibia e ilíaco, estes resultados eram expectáveis uma vez que o defeito criado na tibia a dimensão era de 15 mm X 15 mm e de profundidade até à cortical contra-lateral e o da crista ilíaca de 40 mm X 20 mm e tricortical (Quadro 4.15. e Gráfico 4.6).

Quanto à comparação entre as densidades ósseas periféricas dos dois ossos em estudo, tibia e ilíaco, estes resultados eram expectáveis do ponto de vista biológico visto a tibia ser um osso longo, rico em osso cortical e o ilíaco ser um osso curto, rico em osso esponjoso (Quadro 4.16.).

No gráfico 4.8. é visível um cruzamento de resultados eventualmente resultante de um viés na obtenção dos valores dos grupos I e II. Relativamente aos grupos III e IV o facto de existir osso neoformado em consequência do efeito osteoindutor das esponjas de PU, os valores de densidade foram superiores aos da crista ilíaca pois trata-se de osso cortical, logo mais denso pois, segundo Parfitt *et al.*, (1987), o osso cortical tem uma densidade superior a 1,000 UH e o osso

esponjoso tem valores entre -25 a 700 UH.

Da análise global dos resultados, poder-se-á sugerir que o poliuretano elastomérico utilizado com hidroxapatite nanométrica e enriquecido com ambas as composições, aplicado como implante ósseo em defeitos críticos da tuberosidade da tibia e da crista ilíaca, cobertos com membrana polimérica microporosa de ácido ácido poli(L/DL-láctico) 80/20, lança boas perspectivas enquanto substituto ósseo com características osteocondutoras e osteoindutoras.

Neste trabalho, não foi possível determinar em que medida os diferentes enriquecimentos das esponjas de poliuretano tiveram intervenções distintas na neoformação óssea uma vez que as diferenças entre estes dois grupos tratados não foram estatisticamente significativas. Pensamos que um caminho futuro de investigação possa passar pela clara distinção entre as duas composições, o que neste trabalho não foi totalmente conclusivo.

Embora a utilização de enxertos ósseos autólogos permaneça a forma mais frequente para colmatar as “perdas de osso”, acreditamos que o presente e o futuro, passarão certamente pela utilização crescente de substâncias produzidas por engenharia tecidual quer de origem natural, quer de origem sintética ou combinações de ambos. Os materiais sintéticos poderão constituir uma matriz osteocondutora simples, um veículo de bio-disponibilização de substâncias osteoindutoras, ou ainda, veículos de suporte de células ou de material genético, eles próprios com características osteogénicas ou osteoindutoras.

O facto de não existirem até à data substitutos ósseos capazes de um verdadeiro *restitution ad integrum* e o facto dos resultados obtidos neste estudo sugerirem fortemente a capacidade osteopromotora das substâncias testadas, permite equacionar a possibilidade da futura utilização destas mesmas substâncias osteopromotoras como substitutos ósseos com claras capacidades osteocondutoras e, quando submetidas a enriquecimentos específicos, óbvias capacidades osteoindutoras em defeitos críticos.

Creemos que para a maioria dos biomateriais o troço mais importante deste caminho, ou seja a comprovação científica *in vivo* e *ex vivo* da eficácia de múltiplos substitutos ósseos, já foi percorrido o mesmo se verificando na presente investigação em que ambas as componentes se completaram.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. Os resultados do grupo em que foi aplicada uma membrana polimérica de ácido poli(L/DL-láctico) 80/20 (Grupo II), nas condições experimentais, não sendo estatisticamente significativos são diferentes dos obtidos no grupo controlo em que apenas se estudou o defeito vazio sem cobertura (Grupo I), evidenciando tendência para a promoção da regeneração óssea guiada. A formação de uma barreira para impedir a interposição de tecidos moles no defeito ósseo parece ser um factor de atenuação das condições desfavoráveis à osteorregeneração.

2. A utilização de um polímero tridimensional de poliuretano sob a forma de esponjas, conjugada com hidroxiapatite nanométrica e modificada com sistema de creatina / putrescina (Grupo III) como biomaterial para substituição óssea nas referidas condições experimentais, produziu resultados diferentes dos obtidos no grupo controlo em que se estudou o defeito vazio coberto pela membrana polimérica (Grupo II), sendo estatisticamente significativos ($p < 0,05$) na tuberosidade da tíbia, em parâmetros fundamentais de neoformação óssea, nomeadamente a taxa de aposição mineral e a densidade óssea do defeito iatrogénico. Nos outros parâmetros avaliados, encontrámos valores com tendência favorável para a osteorregeneração, nomeadamente: espessura das corticais laterais, diâmetro dos osteónios/campo óptico, volume do defeito ósseo do íliaco e densidade óssea periférica (tíbia e íliaco). O volume ósseo do defeito da tíbia não permitiu identificar qualquer diferença face ao grupo controlo.

3. A utilização de um polímero tridimensional de poliuretano sob a forma de esponjas, conjugada com hidroxiapatite nanométrica e modificada com lecitina de soja (Grupo IV) como biomaterial para substituição óssea nas referidas condições experimentais, produziu resultados diferentes dos obtidos no grupo controlo em que se estudou o defeito vazio coberto pela membrana polimérica (Grupo II), sendo estatisticamente significativos ($p < 0,05$) na tuberosidade da tíbia em parâmetros fundamentais de neoformação óssea, nomeadamente no número de osteónios por campo óptico, na densidade dos osteónios por campo óptico e na

densidade óssea do defeito iatrogénico. Nos outros parâmetros avaliados, encontrámos valores com tendência favorável para a osteorregeneração, nomeadamente: espessura das corticais laterais, diâmetro dos osteónios/campo óptico, volume dos defeitos ósseos (tíbia e íliaco) e densidade óssea periférica da (tíbia e íliaco).

4. A comparação de duas formulações (Grupos III e IV) de uma esponja de poliuretano conjugada com hidroxiapatite nanométrica como biomaterial para substituição óssea nas referidas condições experimentais, não produziu resultados diferentes entre a formulação modificada com um sistema de creatina/putrescina (composição A) e a modificada com um sistema de lecitina de soja (composição B).

O GIII e em parâmetros como a espessura das corticais laterais, a taxa de aposição mineral, a densidade óssea do defeito iatrogénico da tíbia e a densidade óssea periférica do íliaco, apresentou valores superiores ao GIV. Nos restantes parâmetros estudados como o número de osteónios por campo, a densidade dos osteónios por campo óptico, a densidade óssea periférica da tíbia, o volume do defeito criado (tíbia e íliaco) e a densidade do defeito iatrogénico do íliaco, o GIV apresentou valores mais elevados do que GIII. Assim, os resultados destas duas esponjas foram bastante semelhantes, não se tendo identificado qualquer tendência para que um enriquecimento fosse, do ponto de vista da osteopromoção, superior o outro.

5. O facto de não existirem até à data substitutos ósseos capazes de uma verdadeira *restitution ad integrum* e o facto dos resultados obtidos neste estudo sugerirem consistentemente a capacidade osteopromotora das substâncias testadas, permitem equacionar a possibilidade da futura utilização destas mesmas substâncias osteopromotoras como substitutos ósseos com claras capacidades osteocondutoras e, quando submetidas a enriquecimentos específicos, óbvias capacidades osteoindutoras em defeitos críticos. Perspectivamos assim, com as alternativas cirúrgicas propostas, em modelo ovino, a obtenção de uma redução da morbilidade nos locais dadores de enxerto ósseo.

BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

Aerssens J; Boonen S; Lowet G; Dequeker J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* 1998; 139(2):663-70.

Agnusdei D; Crepaldi G; Isaia G; Mazzuoli G; Ortolani S; Passeri M; Bufalino L; Gennari C. A double blind, placebo-controlled trial of ipriflavone for prevention of postmenopausal spinal bone loss. *Calcif Tissue Int* 1997; 61(2):142-7.

Akeda K; An HS; Okuma M; Attawia M; Miyamoto K; Thonar EJ; Lenz ME; Sah RL; Masuda K. Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; 14(12): 1272–80.

Amling M; Schilling AF; Pogoda P; Priemel M; Rueger JM. Biomaterials and bone remodelling: the physiologic process required for biologization of bone substitutes. *Eur J Trauma* 2006; 32(2):102-106.

Anderson ML; Dhert WJ; de Bruijn JD; Dalmeijer RA; Leenders H; van Blitterswijk CA; Verbout AJ. Critical size defect in the goat's os ilium. A model to evaluate bone grafts and substitutes. *Clin Orthop Relat Res* 1999 ;(364):231-9.

Anitua E; Andía I; Sanchez M; Azofra J; del Mar Zaldueño M; de la Fuente M; Nurden P; Nurden AT. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res* 2005; 23(2): 281–6.

An YH; Bell TD. Experimental design, evaluation methods, data analysis and research ethics. *In* Animal models in Orthopaedic research. Ed. An YH e Friedman RJ. 1999. CRC Press: 15-37.

Anker CJ; Holdridge SP; Baird B; Cohen H; Damron TA. Ultraporous beta-tricalcium phosphate is well incorporated in small cavitary defects. *Clin Orthop Relat Res.* 2005; (434):251-7.

Antikainen T; Pernu H; Törmälä P; Kallioinen M; Waris T; Serlo W. Development of the neurocranium after transsutural fixing by new, resorbable poly-L-lactide miniplates. A comparison to fixing with the common titanium miniplates. *Acta Neurochir (Wien)* 1994;128(1-4):26-31.

Asselmeier MA; Caspari RB; Bottenfield S. A review of allograft processing and sterilization techniques and their role in transmission of the human immunodeficiency virus. *Am J Sports Med* 1993; 21(2):170-5.

Barone R. Anatomie comparée des mammifères domestiques. Vol. 2: Arthrologie et Myologie. 2000. 4ème edition. Editions Vigot Frères, Paris. 1024pp.

Barriga A; Diaz-de-Rada P; Barroso JL; Alfonso M; Lamata M; Hernaez S; Beguiristain JL; San-Julina M; Villas C. Frozen cancellous bone allografts: positive cultures of implanted grafts in posterior fusions of the spine. *Eur Spine J* 2004; 13 (2): 152-156.

Bauer TW; Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res* 2000; 371:10-27.

Bauer TW; Smith ST. Bioactive materials in orthopaedic surgery: overview and regulatory considerations. *Clin Orthop Rel Res* 2002; 395:11-12.

Bax BE; Wozney JM; Ashhurst DE. Bone morphogenetic protein-2 increases the rate of callus formation after fracture of the rabbit tibia. *Calcif Tissue Int* 1999; 65(1):83-9.

Baylink DJ; Finkelman RD; Mohan S. Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone Miner Res* 1993; 8 Suppl 2:S565-72.

Beaman FD; Bancroft LW; Peterson JF; Kransdorf MF; Menke DM; DeOrio JK. Imaging characteristics of bone graft materials. *RadioGraphics* 2006a; 26:373-388.

Beaman FD; Bancroft LW; Peterson JF; Kransdorf MF. Bone graft materials and synthetic substitutes. *Radiol Clin N Am* 2006b; 44:451-461.

Behraves E; Yasko AW; Engel PS; Mikos AG. Synthetic biodegradable polymers for orthopaedic applications. *Clin Orthop Relat Res* 1999 ;(367 Suppl):S118-29.

Bensaïd W; Oudina K; Viateau V; Potier E; Bousson V; Blanchat C; Sedel L; Guillemin G; Petite H. *De Novo* Reconstruction of Functional Bone by Tissue Engineering in the Metatarsal Sheep Model. *Tissue Engineering* 2005; 11(5-6): 814-824.

Benvenuti S; Tanini A; Frediani U; Bianchi S; Masi L; Casano R; Bufalino L; Serio M; Brandi ML. Effects of ipriflavone and its metabolites on a clonal osteoblastic cell line. *J Bone Miner Res* 1991; 6(9):987-96.

Betz RR. Limitations of autograft and allograft: new synthetic solutions. *Orthopaedics* 2002; 25 (5 Suppl): s561-70.

Bhattacharai SR; Bhattacharai N; Yi HK; Hwang PH; Cha DI; Kim HY. Novel biodegradable electrospun membrane: scaffold for tissue engineering. *Biomaterials* 2004; 25(13):2595-602.

Bielby RC; Boccaccini AR; Polak JM; Buttery LD. In vitro differentiation and in vivo mineralization of osteogenic cells derived from human embryonic stem cells. *Tissue Eng* 2004; 10 (9-10): 1518-25.

Bloebaum RD; Willie BM; Mitchell BS; Hofmann AA. Relationship between bone ingrowth, mineral apposition rate, and osteoblast activity. *J Biomed Mater Res A* 2007; 81 (2): 505-14.

Bloemers FW; Blokhuis TJ; Patka P; Bakker FC; Wippermann BW; Haarman HJTM. Autologous bone versus calcium-phosphate ceramics in treatment of experimental bone defects. *J Biomed Mater Res Part B: Applied Biomaterials* 2003; 66 (2):526-531.

Bloom W; Fawcett DW. Bone. In: *A Textbook of Histology*. 1994. 12^a Ed., Ed. Fawcett DW, Chapman & Hall, Londres, pp. 194-233.

Bodde EWH; Wolke JGC; Kowalski RSZ; Jansen JA. Bone regeneration of porous β -tricalcium phosphate (ConduitTM TCP) and of biphasic calcium phosphate ceramic (Biosel ®) in trabecular defects in sheep. *J Biomed Mater Res A* 2007; 82A (3):711-22.

Boden SD. Biology of lumbar spine fusion and use of bone graft substitutes: present, future, and next generation. *Tissue Eng* 2000; 6 (4): 383-99.

Boden SD; Kang J; Sandhu H; Heller JG. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to achieve posterolateral lumbar spine fusion in humans: a prospective, randomized clinical pilot trial: 2002 Volvo Award in clinical studies. *Spine* 2002; 27(23):2662-73.

Boel LW; J.L. Boldsen JL; Melsen F. Double lamellae in trabecular osteons: Towards a new method for age estimation by bone microscopy. *HOMO* 2007; 58(4): 269-277.

Bonadio J. Tissue engineering via local gene delivery: update and future prospects for enhancing the technology. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 44(2-3):185-94.

Bonucci E. "Basic Composition and Structure of Bone" in Mechanical testing of bone and the bone-implant interface. Edited by An YH, Draughn RA. CRC Press 2000: 3-21.

Bouxsein ML; Turek TJ; Blake CA; D'Augusta D; Li X; Stevens M; Seeherman HJ; Wozney JM. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83-A (8):1219-30.

Boyan BD; Schwartz Z; Swain LD; Khare AG; Heckman JD; Ramirez V; Peters P; Carnes DL Jr. Initial effects of partially purified bone morphogenetic protein on the expression of glycosaminoglycan, collagen, and alkaline phosphatase in nonunion cell cultures. *Clin Orthop Relat Res* 1992; (278):286-304.

Boyan BD; Caplan AI; Heckman JD; Lennon DP; Ehler W; Schwartz Z. Osteochondral progenitor cells in acute and chronic canine nonunions. *J Orthop Res* 1999; 17(2):246-55.

Boyan BD; Lossdörfer S; Wang L; Zao G; Lohmann L; Cochran DL; Schwartz Z. Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies. *European cells and materials* 2003; 6:22-27.

Boyce T; Edwards J; Scarborough N. Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am.* 1999; 30(4):571-81.

Bradbeer JN; Riminucci M; Bianco p. Giemsa as a fluorescent stain for mineralized bone. *J Histochem Cytochem* 1994; 42(5): 677-80

Brekke JH; Toth JM. Principles of tissue engineering applied to programmable osteogenesis. *J Biomed Mater Res* 1998; 43(4):380-98.

Major industrial polymers. Encyclopædia Britannicaonline 2008. Acedido a 10/11/2008 a partir: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/1426103/industrial-polymers>.

Brunette DM. Spreading and orientation of epithelial cells on grooved substrata. *Exp Cell Res* 1986; 167(1):203-17.

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

Burg KJ; Porter S; Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2000; 21(23):2347-59.

Burgess TL; Qian YX; Kaufman S; Ring BD; Van Charles G; Capparelli C; Kelley,M; Hsu H; Boyle WJ; Dunstan CR; Hu S; Lacey DL. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol.* 1999; 145(3):527-538.

Burguera B; Hofbauer LC; Thomas T; Gori F; Evans GL; Khosla S; Riggs BL; Turner RT. Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. *Endocrinology* 2001; 142(8): 3546-3553.

Burstein AH; Reilly DT; Martens M. Aging of bone tissue: mechanical properties *J. Bone Joint Surg Am* 1976; 58 (1): 82 - 86.

Burt DW; Law AS. Evolution of the transforming growth factor-beta superfamily. *Prog Growth Factor Res* 1994; 5(1):99-118.

Byrne DP; Lacroix D; Plannel JA; Kelly DJ; Prendergast PJ. Simulation of tissue differentiation in a scaffold as a function of porosity, Young's modulus and dissolution rate: Application of mechanobiological models in tissue engineering. *Biomaterials* 2007; 28(36): 5544-54.

Cabrita AMS. Tecido ósseo. Alguns aspectos morfológicos e funcionais. *Rev Port Ortop Traum* 1993; 1: 102-108.

Canalis E; McCarthy TL; Centrella M. The role of growth factors in skeletal remodeling. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1989; 18(4):903-18.

Cancedda R; Giannoni P; Mastrogiacomo M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials* 2007; 28(29):4240-50.

Cano-Sánchez J; Campo-Trapero J; Gonzalo-Lafuente JC; Moreno-López LA; Bascones-Martínez A. Undecalcified bone samples: a description of the technique and its utility based on the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005; 10:74-E87.

Capper R; Guo L; Pearson JP; Birchall JP. Effect of nitric oxide donation on mucin production in vitro. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2003; 28(1):51-4.

Carola R; Harley J; Noback C 1992. Bones and bone tissue in Human Anatomy&Physiology. 2th Edition. McGraw-Hill College.

Carrington JL; Chen P; Yanagishita M; Reddi AH. Osteogenin (bone morphogenetic protein-3) stimulates cartilage formation by chick limb bud cells in vitro. *Dev Biol* 1991; 146(2):406-15.

Carson JS; Bostrom MPG. Synthetic bone scaffolds and fracture repair. *Injury* 2007; 38S1: s33-37.

Cenni E; Ciapetti G; Pagani S; Perut F; Giunti A; Baldini N. Effects of activated platelet concentrates on human primary cultures of fibroblasts and osteoblasts. *J Periodontol* 2005; 76(3): 323–28.

Chambers TJ; Darby JA; Fuller K. Mammalian collagenase predisposes bone surfaces to osteoclastic resorption. *Cell Tissue Res* 1985; 241 (3): 671-5.

Chapman MW; Bucholz R; Cornell C. Treatment of acute fractures with a collagen-calcium phosphate graft material. A randomized clinical trial. *J Bone Joint Surg Am* 1997; 79(4):495-502.

Chang BS; Lee CK; Hong KS; Youn HJ; Ryu HS; Chung SS. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials*. 2000; 21(12):1291-8.

Cheng SL; Zhang SF; Nelson TL; Warlow PM; Civitelli R. Stimulation of human osteoblast differentiation and function by ipriflavone and its metabolites. *Calcif Tissue Int* 1994; 55(5):356-62.

Chen P; Carrington JL; Hammonds RG; Reddi AH. Stimulation of chondrogenesis in limb bud mesoderm cells by recombinant human bone morphogenetic protein 2B (BMP-2B) and modulation by transforming growth factor beta 1 and beta 2. *Exp Cell Res* 1991; 195(2): 509-15.

Chia SL; Gorna K; Gogolewski S; Alini M. Biodegradable elastomeric polyurethane membranes as chondrocyte carriers for cartilage repair. *Tissue Eng* 2006; 12(7):1945-53.

Choukroun J; Diss A; Simonpieri A; Girard MO; Schoeffler C; Dohan SL; Dohan AJ; Mouhyi J; Dohan DM. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006a; 101(3): e56 – e60.

Choukroun J; Diss A; Simonpieri A; Girard MO; Schoeffler C; Dohan SL; Dohan AJ; Mouhyi J; Dohan DM. Platelet-rich fibrin (PRF): a second generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006b; 101(3): 299–303.

Clausen C; Hermund NU; Donatsky O; Nielsen H; Osther K. Homologous activated platelets stimulate differentiation and proliferation of primary human bone cells. *Cells Tissues Organs* 2006; 184 (2), 68–75.

Coelho PJV. Contribuição para o estudo da regeneração óssea mandibular consecutiva a perdas de substância – Tese de Doutoramento em Biomateriais. 2003. Faculdade de Medicina Dentária – Universidade de Lisboa. Lisboa. 268 pp.

Compston JE. Sex steroids and bone. *Physiol Rev* 2001; 81(1):419-447.

Costantino PD; Hiltzik D; Govindaraj S; Moche J. Bone healing and bone substitutes. *Facial Plast Surg* 2002; 18 (1):13-26.

CPI. Center for the Polyurethane Industry. Acedido a 03/07/2009. http://www.polyurethane.org/s_api/sec.asp?CID=853&DID=3487.

Cui L; Liu B; Liu G; Zhang W; Cen L; Sun J; Yin S; Liu W; Cao Y. Repair of cranial defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model. *Biomaterials* 2007; 28 (36):5477-5486.

Dahlin C; Linde A; Gottlow J; Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 1988; 81(5):672-6.

Dai KR; Xu XL; Tang TT; Zhu ZA; Yu CF; Lou JR; Zhang XL. Repairing of goat tibial bone defects with BMP-2 gene-modified tissue-engineered bone. *Calcif Tissue Int* 2005; 77(1):55-61.

Dallari D; Fini M; Stagni C; Torricelli P; Aldini NN; Giavaresi G; Cenni E; Baldini N; Cenacchi A; Bassi A; Giardino R; Fornasari PM; Giunti A. In vivo study on the healing of

bone defects treated with bone marrow stromal cells, platelet-rich plasma, and freeze-dried bone allografts, alone and in combination. *J Orthop Res* 2006; 24 (5):877-88.

deKleer V. Development of bone. *In: Bone in clinical orthopaedics*. Sumner-Smith G. 2006. 2ed. W.B.Saunders Co, Philadelphia, PA, pp 1-80.

den Boer FC; Patka P; Bakker FC; Wippermann BW; van Lingen A; Vink GQ; Boshuizen K; Haarman HJ. New segmental long bone defect model in sheep: quantitative analysis of healing with dual energy x-ray absorptiometry. *J Orthop Res* 1999; 17(5):654-60.

den Boer FC; Bramer JA; Blokhuis TJ; Van Soest EJ; Jenner JM; Patka P; Bakker FC; Burger EH; Haarman HJ. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on the healing of a freshly closed diaphyseal fracture. *Bone* 2002; 31(1):158-64.

den Boer FC; Wippermann BW; Blokhuis TJ; Patka P; Bakker FC; Haarman HJ. Healing of segmental bone defects with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenic protein-1 or autologous bone marrow. *J Orthop Res* 2003; 21(3):521-8.

DeCoster TA; Gehlert RJ; Mikola EA; Pirela-Cruz MA. Management of posttraumatic segmental bone defects. *J Am Acad Orthop Surg* 2004; 12(1): 28-38.

DeOrio JK; Farber DC. Morbidity associated with anterior iliac crest bone grafting in foot and ankle surgery. *Foot Ankle Int* 2005; 26(2): 147-51.

Deville S; Sainz E; Tomsia AP. Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006; 27:5480-89.

Deville S; Sainz E; Nalla RK; Tomsia AP. Freezing as a path to build complex composites. *Science* 2006; 311:515-518.

Dias MIR. Regeneração óssea: efeito do volume ou da associação ao plasma enriquecido em plaquetas nas propriedades osteogênicas do enxerto de osso esponjoso autólogo: estudo dos marcadores bioquímicos de formação óssea durante o processo de

cicatrização das fracturas ósseas. Tese de Doutoramento em Ciências Veterinárias. 2004. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro – Vila Real. 197 pp.

Dickson G; Buchanan F; Marsh D; Harkin-Jone E; Little U; McCaigue M. Orthopaedic tissue engineering and bone regeneration. *Technology and Health Care*. 2007, 15: 57-67.

D'Ippolito G; Schiller PC; Ricordi C; Roos BA; Howard GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res* 1999; 14(7):1115-22.

Dohan DM; Choukroun J; Diss A; Dohan SL; Dohan AJ; Mouhyi J; Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 101(3):e45–e50.

Doi K; Tominaga S; Shibata T. Bone grafts with microvascular anastomoses of vascular pedicles: an experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg Am* 1977; 59(6):809-15.

Donath K; Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissue: The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 1982; 11 (4): 318-326.

Donath K. Preparation of histologic sections by cutting-grinding technique for hard tissue and other material not suitable to be sectioned by routine methods. 1995. 2th ed., EXAKT-Kulzer Publication, Norderstedt, pp. 1-6.

Doll B; Charles S; Winn S; Huard J; Hollinger J. Critical aspects of tissue-engineered therapy for bone regeneration. *Crit Rev Eukar Gen Exp* 2001; 11(1-3): 173-198.

Dong Y; Canalis E. Insulin-like growth factor (IGF) I and retinoic acid induce the synthesis of IGF-binding protein 5 in rat osteoblastic cells. *Endocrinology* 1995; 136(5):2000-6.

Doucet C; Ernou I; Zhang Y; Llense JR; Begot L; Holy X; Lataillade JJ. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J. Cell. Physiol* 2005; 205(2), 228–36.

Dragoo JL; Lieberman JR; Lee RS; Deugarte DA; Lee Y; Zuk PA; Hedrick MH; Benhaim P. Tissue-engineered bone from BMP-2-transduced stem cells derived from human fat. *Plast Reconstr Surg* 2005; 115(6):1665-73.

Ducy P; Zhang R; Geoffroy V; Ridall AL; Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997; 30; 89(5):747-54.

Duncan RL; Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strains. *Calcif Tissue Int* 1995; 57:344-358.

Durand JL; Renier D; Marchac D. The history of cranioplasty. *Ann Chir Plast Esthet* 1997; 42(1): 75-83.

Duvall CL; Taylor WR; Weiss D; Guldberg RE. Quantitative micro computed tomography analysis of collateral vessel development after ischemic injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287(1):H302-10.

Ebraheim NA; Savolaine ER; Stitgen SH; Jackson WT. Magnetic resonance imaging after pedicular screw fixation of the spine. *Clin Orthop Relat Res* 1992; (279):133-7.

Ehrenfest DMD; Rasmusson L; Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol* 2009; 27(3):158-67.

Einhorn TA; Majeska RJ; Mohaideen A; Kagel EM; Bouxsein ML; Turek TJ; Wozney JM. A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A (8):1425-35.

Elshahat A; Inoue N; Marti G; Safe I; Manson P; Vanderkolk C. Guided bone regeneration at the donor site of iliac bone grafts for future use as autogenous grafts. *Plast Reconstr Surg* 2005; 116(4):1068-75.

Enneking WF; Burchardt H; Puhl JJ; Piotrowski G. Physical and biological aspects of repair in dog cortical-bone transplants. *J Bone Joint Surg Am* 1975; 57(2):237-52.

Enneking WF; Mindell ER. Observations on massive retrieved human allografts. *J Bone Joint Surg Am* 1991; 73(8):1123-42.

Eyre-Brook AL. The periosteum. Its functions reassessed. *Clin. Orthop* 1984; 189: 300-07.

Fakhry A; Ratisoontorn C; Vedhachalam C; Salhab I; Koyama E; Leboy P; Pacifici M; Kirschner RE, Nah HD. Effects of FGF-2/-9 in calvarial bone cell cultures: differentiation stage-dependent mitogenic effect, inverse regulation of BMP-2 and noggin, and enhancement of osteogenic potential. *Bone* 2005; 36(2):254-66.

Fearon JA; Munro IR; Bruce DA. Observations on the use of rigid fixation for craniofacial deformities in infants and young children. *Plast Reconstr Surg.* 1995; 95(4):634-7.

Fernández-Tresguerres IH-G; Alobera MAG; del Canto MP; Blanco LJ. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006a; 11:47-51.

Fernández-Tresguerres IH-G; Alobera MAG; del Canto MP; Blanco LJ. Physiological bases of bone regeneration II. The remodelling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006b; 11:151-7.

Ferrari SL; Traianedes K; Thorne M; Lafage-Proust MH; Genever P; Cecchini MG; Behar V; Bisello A; Chorev M; Rosenblatt M; Suva LJ. A role for N-cadherin in the development of the differentiated osteoblastic phenotype. *J Bone Miner Res* 2000; 15(2):198-208.

Fisher LW; Fedarko NS. Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connect Tissue Res* 2003; 44 Suppl 1:33-40.

Flautre B; Descamps M; Delecourt C; Blary MC; Hardouin P. Porous HA ceramic for bone replacement: role of the pores and interconnections - experimental study in the rabbit. *J Mater Sci Mater Med* 2001; 12(8):679-82.

Fleming JE; Cornell CN; Muschler GF. Bone cells and matrices in orthopaedic tissue engineering. *Orthop. Clin. North Am* 2000; 31 (3):357-374.

Franch J; Díaz-Bertrana, C; Lafuente, P; Fotecha, P; Durall, I. Beta-tricalcium phosphate as a synthetic cancellous bone graft in veterinary orthopaedics..*Vet Comp Orthop Traumatol* 2006; 19; 1-9.

Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol* 1976; 47:327-59.

Frost HM. Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calcif Tissue Res* 1969; 3 (3): 211-37.

Fukasawa T; Deng Z-Y; Ando M; Ohji T; Goto Y. Pore structure of porous ceramics synthesized from water-based slurry by freeze-dry process. *Journal of Materials Science* 2001; 36(10):2523-7.

Gandhi A; Doumasb C; O'Connorb JP; , Parsons JR; , Lin SS. The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing. *Bone* 2006; 38, (4): 540-46.

Gazdag AR; Lane JM; Glaser D; Forster RA. Alternatives to autogenous bone graft: efficacy and indications. *J Am Acad Orthop Surg* 1995; 3(1):1-8.

Gazzerro E; Pereira RC; Jorgetti V; Olson S; Economides AN; Canalis E. Skeletal overexpression of gremlin impairs bone formation and causes osteopenia. *Endocrinology* 2005; 146(2):655-65.

Geiger F; Bertram H; Berger I; Lorenz H; Wall O; Eckhardt C; Simank HG; Richter W. Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects. *J Bone Miner Res* 2005;20 (11): 2028-35

Gerber HP; Vu TH; Ryan AM; Kowalski J; Werb Z; Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999; 5(6):623-8.

Giannoudis PV; Dinopoulos H; Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury* 2005; 36 (S1):s20-7.

Giannoudis PV; Pountos I. Tissue regeneration. The past, the present and the future. *Injury* 2005; 36 (S1):s2-5.

Giannoudis PV; Psarakis S; Kontakis G. Can we accelerate fracture healing? A critical analysis of the literature. *Injury* 2007a; 38 (S1):s81-9.

Giannoudis PV; Tzioupis C; Almalki T; Buckley R. Fracture healing in osteoporotic fractures: is it really different? A basic science perspective. *Injury* 2007b; 38 (S1): s90-9.

Giannoudis PV; Kanakaris NK; Einhorn TA. Interaction of bone morphogenetic proteins with cells of the osteoclast lineage: review of the existing evidence. *Osteoporos Int* 2007c; 18(12):1565-81.

Giannoudis PV; Einhorn TA; Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury, Int. J. Care Injured* 2007d; 38S4, S3-S6.

Gissselfält K; Edberg, B; Flodin, P Synthesis and Properties of Degradable Poly(urethaneurea)s to be used for ligament reconstructions. *Biomacromolecules* 2002; 3(5): 951-8.

Gogolewski S; Pennings AJ An artificial skin based on biodegradable mixtures of polylactides and polyurethanes for full-thickness skin wound covering. *Die Makromol Chem Rapid Commun* 1983; 4 (10): 675–80.

Gogolewski S; Pennings AJ. Resorbable materials of poly (L-lactide). III. Porous materials for medical applications. *Coll Polymer Sci* 1993; 261(6): 477-84.

Gogolewski S. Resorbable polymers for internal fixation. *Clin Materials* 1992; 10 (1-2):13-20.

Gogolewski S. Bioresorbable polymers in trauma and bone surgery. *Injury*. 2000 (31) S4: d28-32.

Gogolewski S; Pineda L; Büsing CM. Bone regeneration in segmental defects with resorbable polymeric membranes: IV. Does the polymer chemical composition affect the healing process? *Biomaterials* 2000; 21(24):2513-20.

Gogolewski S; Rahn B; Wieling R. Bone regeneration in critical-size segmental diaphyseal defects implanted with bioresorbable polylactide bone substitute. Transactions. Proceedings of 27th Society for Biomaterials 27th Annual Meeting, Saint Paul, MN, USA, 2001a); 24: p 572.

Gogolewski S; Gorna K; Turner S. Regeneration of bicortical defects in iliac crest os estrogen-deficient sheep, using biodegradable polyurethane bone graft substitutes. *J Biomed Mater Res A* 2006; 77(4):802-10.

Gogolewski S; Gorna K. Biodegradable polyurethane cancellous bone graft substitutes in the treatment of iliac crest defects. *J Biomed Mater Res A* 2007; 80(1):94-101.

Gogolewski S; Gorna K; Zaczynska E; Czarny A. Structure-property relations and cytotoxicity of isosorbide-based biodegradable polyurethane scaffolds for tissue repair and regeneration. *J Biomed Mater Res A* 2008; 85(2):456-65.

Goldstein SA. The mechanical properties of trabecular bone: dependence on anatomic location and function. *J Biomech* 1987; 20(11-12):1055-61.

Gombotz WR; Pettit DK. Biodegradable polymers for protein and peptide drug delivery. *Bioconj Chem* 1995; 6(4):332-51.

Goldberg DS; Bartlett S; Yu JC; Hunter JV; Whitaker LA. Critical review of microfixation in pediatric craniofacial surgery. *J Craniofac Surg* 1995; 6(4):301-7.

Gorna K; Gogolewski S In synthetic bioresorbable polymers for implants; ASTM STP 1396; Agrawal, CM; Parr, JE; Lin, ST. Eds. American Society for Testing and Materials: West Conshohocken, PA. 2000; pp39-57.

Gorna K; Gogolewski S. In Transactions of the 27th Society for Biomaterials Annual Meeting, Saint Paul, MN, 2001; 24, pp 426.

Gorna K; Gogolewski S. Molecular stability, mechanical properties, surface characteristics and sterility of biodegradable polyurethanes treated with low-temperatures plasma. *Polym Degrad Stab* 2003; 79:475-85.

Gorna K; Gogolewski S. Biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue repair and regeneration. *J Biomed Mater Res* 2006; 79 (1):128-38.

Grad S; Kupcsik L; Gorna K; Gogolewski S. The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitations. *Biomaterials* 2003; 24:5163-71.

Grad S; Lee CR; Gorna K; Gogolewski S; Wimmer MA; Alini M. Surface motion up regulates superficial zone protein and hyaluran production in chondrocytes-seeded three-dimensional scaffolds. *Tissue Eng* 2005; 11:249-56.

Granjeiro JM; Oliveira RC; Bustos-Valenzuela JC; Sogayar MC; Taga R. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Brz J Med Biol Res* 2005; 38(10):1463-73.

Greenwald AS; 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.

Griffith DL; Keck PC; Sampath TK; Rueger DC; Carlson WD. Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(2):878-83.

Groppe J; Greenwald J; Wiater E; Rodriguez-Leon J; Economides AN; Kwiatkowski W; Affolter M; Vale WW; Belmonte JC; Choe S. Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature*. 2002; 420(6916):636-42.

Guedes e Silva CC; König Jr B; Carbonari MJ; Yoshimoto M; Allegrini Jr S; Bressiani JC. Tissue response around silicon nitride implants in rabbits. *JBMR Part A* 2007; 84A (2): 337-43.

Guelcher S. Biodegradable polyurethanes: synthesis and applications in regenerative medicine. *Tissue Eng Part B* 2008; 14 (1): 3-17.

Gugala Z; Gogolewski S. Regeneration of segmental diaphyseal defects in sheep tibiae using resorbable polymeric membranes: a preliminary study. *J Orthop Trauma* 1999; 13(3):187-195.

Gugala Z; Gogolewski S. In vitro growth and activity of primary chondrocytes on a resorbable polylactide three-dimensional scaffold. *J Biomed Mater Res* 2000; 49(2):183-191.

Gugala Z; Gogolewski S. Healing of critical-size segmental bone defects in the sheep tibiae using bioresorbable polylactide membranes. *Injury* 2002; 33 Suppl 2:B71-6.

Gugala Z; Gogolewski S. Protein adsorption, attachment, growth and activity of primary rat osteoblasts on polylactide membranes with defined surface characteristics. *Biomaterials* 2004a; 25 (12): 2341-51.

Gugala Z; Gogolewski S. Differentiation, growth and activity of rat bone marrow stromal cells on resorbable poly(L/DL-lactide) membranes. *Biomaterials* 2004b; 25 (12): 2299-307.

Gugala Z; Gogolewski S. The in vitro growth and activity of sheep osteoblasts on three-dimensional scaffolds from poly(L/DL-lactide) 80/20%. *J Biomed Mater Res A* 2005; 75 (3): 702-9.

Gugala Z; Lindsey RW; Gogolewski S. New approaches in the treatment of critical-size segmental defects in long bones. *Macromolecular Symposia* 2007; 253(1): 147-161.

Guldborg RE; Duvall CL; Peister A; Oest ME; Lin ASP; Palmer AW; Levenston ME. 3D imaging of tissue integration with porous biomaterials. *Biomaterials* 2008. 29 (28):3757-61.

Haeseker B. Mr. Job van Meekeren (1611-1666) and surgery of the hand. *Plast Reconstr Surg* 1988; 82 (3):539-546.

Haeseker B. Van Meekeren and his account of the transplant of bone from a dog into the skull of a soldier. *Plast Reconstr Surg* 1991; 88 (1):173-174.

Hausman MR; Schaffler MB; Majeska RJ. Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone* 2001; 29(6):560-4.

Healey JH; Zimmerman PA; McDonnell JM; Lane JM. Percutaneous Bone Marrow Grafting of Delayed Union and Nonunion in Cancer Patients. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1990; 256:280-5.

Healy KE; Rezania A; Stile RA. Designing biomaterials to direct biological responses. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 875:24-35.

Heckman JD; Ehler W; Brooks BP; Aufdemorte TB; Lohmann CH; Morgan T; Boyan BD. Bone morphogenetic protein but not transforming growth factor- β enhances bone formation in canine diaphyseal nonunions implanted with a biodegradable composite polymer. *J Bone Joint Surg Am* 1999. 81:1717-29.

Hedner E; Linde A. Efficacy of bone morphogenetic protein (BMP) with osteopromotive membranes: an experimental study in rat mandibular defects. *Eur J Oral Sci* 1995; 103(4): 236-41.

Hernigou P; Poignard A; Beaujean F; Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* 2005; 87(7):1430-7.

Hicok KC; Du Laney TV; Zhou YS; Halvorsen YD; Hitt DC; Cooper LF; Gimble JM. Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid in vivo. *Tissue Eng* 2004; 10(3-4):371-80.

Hill CM; An YH; Kang QK; Hartsock LA; Gogolewski S; Gorna K. Osteogenesis of osteoblast-seeded polyurethane-hydroxyapatite scaffolds in nude mice. *Transactions;*

28:418. 30th Society for Biomaterials Annual Meeting, Memphis, TN, USA, April 27-30, 2005. ISSN 1526-7547.

Hing KA. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? *Phil Trans. R. Soc. Lond A* 2004; 362:2821-50

Hing KA; Wilson LF; Buckland T. Comparative performance of three ceramic bone graft substitutes. *The Spine Journal* 2007; 7(4) 475-90.

Hofbauer LC; Khosla S; Dunstan CR; Lacey DL; Spelsberg TC; Riggs, BL. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 1999; 140(9):4367-70.

Hogan BL. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* 1996a; 6(4):432-438.

Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development *Genes Dev* 1996b; 10:1580-94.

Hollinger JO. Preliminary report on the osteogenic potential of a biodegradable copolymer of olylactide (PLA) and polyglycolide (PGA). *J Biomed Mater Res* 1983; 17(1): 71-82.

Hollinger JO; Kleinschmidt, JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1990; 1(1):60-8.

Hokugo A; Sawada Y; Hokugo R; Iwamura H; Kobuchi M; Kambara T; Morita S; Tabata Y. Controlled release of platelet growth factors enhances bone regeneration at rabbit calvaria. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 104(1):44-8.

Hönig JF; Merten HA; Luhr HG. Passive and active intracranial translocation of osteosynthesis plates in adolescent minipigs. *J Craniofac Surg* 1995; 6(4):292-8.

Horowitz M. Matrix proteins versus cytokines in the regulation of osteoblast function and bone formation. *Calcif Tissue Int* 2003; 72(1):5-7.

Hoshi K; Komori T, Ozawa H. Morphological characterization of skeletal cells in Cbfa1-deficient mice. *Bone* 1999; 25(6):639-51.

Houseknecht KL; Baile CA; Matteri RL; Spurlock ME. The biology of leptin: A review. *J Anim Sci* 1998; 76: 1405-20.

Hsiong SX; Boonthekul T; Huebsch N; Mooney DJ. Cyclic Arginine-Glycine-Aspartate peptides enhance three-dimensional stem cell osteogenic differentiation. *Tissue Eng Part A* 2008; 14(0):1-9.

Hutmacher DW; Hürzeler MB; Schliephake H. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996; 11(5):667-78.

Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000; 21:2529-43.

Hutmacher DW; Cool S. Concepts of scaffold-based tissue engineering-the rationale to use solid free-form fabrication techniques. *J Cell Mol Med* 2007; 11 (4):654-69.

Hutmacher DW; Schantz JT; Lam CFX; Tan KC; Lim TC. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *J Tissue Eng Regen Med* 2007; 1(4):245-60.

Hyldstrup L; Clemmensen I; Jensen BA; Transbøl I. Non-invasive evaluation of bone formation: measurements of serum alkaline phosphatase, whole body retention of diphosphonate and serum osteocalcin in metabolic bone disorders and thyroid disease. *Scand J Clin Lab Invest* 1988; 48(7):611-9.

Iera D; Haddad A.J; Sándor GKB; Ashmmakhi N. Les matériels d'ostéosynthèse résorbables. *Annales de chirurgie plastique esthétique* 2005; (50): 723-32.

Ingber DE; Levin M. What lies at the interface of regenerative medicine and developmental biology? *Development*. 2007; 134(14):2541-7

Ilan DI; Ladd, AL. Bone grafts substitutes. *Operative Techniques in Plastic and Reconstructive Surgery* 2003; 9(4):151-60.

Intini G. The use of platelet-rich plasma in bone reconstructive therapy. *Biomaterials* 2009; Jun 30 – aguarda publicação.

Ip WY; Gogolewski S. Clinical application of resorbable polymers in guided bone regeneration. *Bioeng Biomaterials* 2004; 253(1): 139-46.

Ishaug SL; Crane GM; Miller MJ; Yasko AW; Yaszemski MJ; Mikos AG. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 1997; 36(1):17-28.

Itälä AI; Ylänen HO; Ekholm C; Karlsson KH; Aro HT. Pore diameter of more than 100 μm is not requisite for bone ingrowth in rabbits. *J Biomed Mater Res* 2001; 58(6):679:83.

Ito K; Minegishi T; Takayama T; Tamura T; Yamada Y; Sato S. Effects of ipriflavone on augmented bone using a guided bone regeneration procedure. *Clin Oral Impl Res* 2007; 18(1): 60-68.

Itoh T; Mochizuki M; Nishimura R; Matsunaga S; Kadosawa T; Kokubo S; Yokota S; Sasaki N. Repair of ulnar segmental defect by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in dogs. *J Vet Med Sci* 1998; 60(4):451-8.

Itthichaisri C; Wiedmann-Al-Ahmad M; Huebner U; Al-Ahmad A; Schoen R; Schmelzeisen R; Gellrich NC. Comparative in vitro study of the proliferation and growth of human osteoblast-like cells on various biomaterials. *J Biomed Mater Res A* 2007; 82A (4): 777:87.

Jamal SA; Cummings SR; Hawker GA. Isosorbide mononitrate increases bone formation and decreases bone resorption in postmenopausal women: a randomized trial. *J Bone Miner Res* 2004; 19(9):1512-7.

Jennissen HP. Accelerated and improved osteointegration of implants biocoated with bone morphogenetic protein 2 (BMP-2). *Ann N Y Acad Sci* 2002; 961:139-42.

Johnson EE; Urist MR; Finerman GA. Bone morphogenetic protein augmentation grafting of resistant femoral nonunions. A preliminary report. *Clin Orthop Relat Res* 1988; (230):257-65.

Jones A; Arns CH; Sheppard AP; Hutmacher DW; Milhorpe BK; Knackstedt MA. Assessment of bone ingrowth into porous biomaterials using MICRO-CT. *Biomaterials* 2007; 28(15): 2491-504.

Jones SJ; Boyde A. Experimental study of changes in osteoblastic shape induced by calcitonin and parathyroid extract in an organ culture system. *Cell Tissue Res* 1976;169 (4): 499-65.

Jorgensen C; Gordeladze J; Noel D. Tissue engineering through autologous mesenchymal stem cells. *Curr Opin Biotechnol* 2004; 15(5):406-10.

Jovanovic SA; Hunt DR; Bernard GW; Spiekermann H; Wozney JM; Wikesjö UME. Bone reconstruction following implantation of rhBMP-2 and guided bone regeneration in canine alveolar ridge defects. *Clin Oral Impl Res* 2007; 18(2):224-230.

Jukes JM; Both SK; van Blitterswijk CA; de Boer J. Potential of embryonic stem cells for in vivo bone regeneration. *Regen Med* 2008; 3(6):783-5.

Kanczler JM; Oreffo ROC. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cells and Mat* 2008; 15:100-114.

Kanczler JM; Ginty PJ; Barry JJ; Clarke NM; Howdle SM; Shakesheff KM; Oreffo RO. The effect of mesenchymal populations and vascular endothelial growth factor delivered from biodegradable polymer scaffolds on bone formation. *Biomaterials* 2008; 29(12):1892-900.

Kang H-W; Tabata Y; Ikada Y. Fabrication of porous gelatine scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 1999; 20(14):1339-44.

Kang SW; Lee JS; Park MS; Park JH; Kim BS. Enhancement of in vivo bone regeneration efficacy of human mesenchymal stem cells. *J Microbiol Biotechnol* 2008; 18(5):975-82.

Karsenty G. The central regulation of bone remodeling. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11(10): 437-439.

Kavlock KD; Pechar TW; Hollinger JO; Guelcher SA; Goldstein AS. Synthesis and characterization of segmented poly(esterurethane urea) elastomers for bone tissue engineering. *Acta Biomater* 2007; 3(4):475-84.

Kawaguchi H; Pilbeam CC; Harrison JR; Raisz LG. The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. *Clin Orthop Relat Res* 1995; 313:36-46.

Kawamura M; Urist MR. Induction of callus formation by implants of bone morphogenetic protein and associated bone matrix noncollagenous proteins. *Clin Orthop Relat Res* 1988; (236):240-8.

Khan SN; Cammisa FP Jr; Sandhu HS; Diwan AD; Girardi FP; Lane JM. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg* 2005; 63 (3):362-9.

Khan YM; Katti DS; Laurencin CT. Novel polymer-synthesized ceramic composite-based system for bone repair: an in vitro evaluation. *J Biomed Mater Res A* 2004; 69(4):728-37.

Kidd KR; Nagle RB; Williams SK. Angiogenesis and neovascularization associated with extracellular matrix-modified porous implants. *J Biomed Mater Res* 2002; 59 (2): 366-77.

Kim SS; Sun PM; Jeon O; Yong CC; Kim BS. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006; 27(8):1399-1409.

Kitoh H; Kitakoji T; Tsuchiya H; Katoh M; Ishiguro N. Transplantation of culture expanded bone marrow cells and platelet rich plasma in distraction osteogenesis of the long bones. *Bone* 2007; 40(2): 522-28.

Kneser U; Schaefer DJ; Munder B; Klemm C; Andree C; Stark GB. Tissue engineering of bone. *Minimally Invasive Therapy and Allied Technologie*. 2002;11 (3):107-16.

Kokubo T; Kim H-M; Kawashita M. Novel biomaterials with different mechanical properties. *Biomaterials* 2003; 24:2161-75.

Komori T; Yagi H; Nomura S; Yamaguchi A; Sasaki K; Deguchi K; Shimizu Y; Bronson RT; Gao YH; Inada M; Sato M; Okamoto R; Kitamura Y; Yoshiki S; Kishimoto T. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997; 89(5):755-64.

Kübler N; Urist MR. Bone morphogenetic protein-mediated interaction of periosteum and diaphysis. Citric acid and other factors influencing the generation of parosteal bone. *Clin Orthop Relat Res* 1990;(258):279-94.

Kuboki Y; Jin Q; Takita H. Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83-A Suppl 1(Pt 2):s105-15.

Lacey DL; Timms E; Tan HL; Kelley MJ; Dunstan CR; Burgess T; Elliott R; Colombero A; Elliott G; Scully S; Hsu H; Sullivan J; Hawkins N; Davy E; Capparelli C; Eli A; Qian YX; Kaufman S; Sarosi I; Shalhoub V; Senaldi G; Guo J; Delaney J; Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93(2):165-76.

Landuyt P; Li F; Keustermans JP; Streydio JM; Delannay F; Munting E. The influence of high sintering temperatures on the mechanical properties of hydroxylapatite. *J Mater Sci Mater Med* 1995; 6 (1):8-13.

Langer R; Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260:920-926.

Langer R; Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. *Nature* 2004; 428:487-492.

Lanyon LE. Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif Tissue Int* 1993; 53(1):S102-6

Laurencin C; Khan Y; El-Amin SF. Bone graft substitutes. *Expert Rev Med. Devices* 2006; 3(1):49-57.

Lecanda F; Towler DA; Ziambaras K; Cheng SL; Koval M; Steinberg TH; Civitelli R. Gap junctional communication modulates gene expression in osteoblastic cells. *Mol Biol Cell* 1998 ;9(8):2249-58.

Lee CR; Grad S; Gorna K; Gogolewski K; Goessl A; Alini M. Fibrin-polyurethane composites for articular cartilage tissue engineering: a preliminary analysis. *Tissue Eng* 2005; 11:1562-73.

Lemperle SM; Calhoun CJ; Curran RW; Holmes RE. Bony healing of large cranial and mandibular defects protected from soft-tissue interposition: A comparative study of spontaneous bone regeneration, osteoconduction, and cancellous autografting in dogs. *Plast Reconstr Surg* 1998; 101(3): 660-72.

Levenberg S; Rouwkema J; Macdonald M; Garfein ES; Kohane DS; Darland DC; Marini R; van Blitterswijk CA; Mulligan RC; D'Amore PA; Langer R. Engineering vascularized skeletal muscle tissue. *Nat Biotechnol* 2005; 3(7): 879-84.

Lieberman JR; Conduah A; Urist MR. The role of growth factor in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg (AM)* 2002; 84-A(6):1032-44.

Liebschner MA. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials* 2004; 25(9):1697-714.

Lim SC; Lee MJ; Yeo HH. Effects of various implant material on regeneration of calvarial defects in rats. *Pathol Int* 2000; 50(8):594-602.

Lin Y; Wang T; Wu L; Jing W; Chen X; Li Z; Liu L; Tang W; Zheng X; Tian W. Ectopic and in situ bone formation of adipose tissue-derived stromal cells in biphasic calcium phosphate nanocomposite. *J Biomed Mater Res A* 2007; 81(4):900-10.

Lind M; Deleuran B; Thestrup-Pedersen K; Søballe K; Eriksen EF; Bünger C. Chemotaxis of human osteoblasts. Effects of osteotropic growth factors. *APMIS* 1995; 103(2):140-6.

Linde A; Alberius P; Dahlin C; Bjurstam K; Sundin Y. Osteopromotion: a soft-tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. *J Periodontol* 1993; 64(11 Suppl):1116-28.

Logeart-Avramoglou D; Anagnostou F; Bizios R; Petite H. Engineering bone: challenges and obstacles. *J Cell Mol Med* 2005; 9(1):72-84.

Lindeboom JA; Mathura KR; Aartman IH; Kroon FH; Milstein DM; Ince C. Influence of the application of platelet-enriched plasma in oral mucosal wound healing. *Clin Oral Implants Res* 2007; 18(1), 133–9.

Lu J; Blary MC; Vavasseur S; Descamps M; Anselme K; Hardouin P. Relationship between bioceramics sintering and micro-particles-induced cellular damages. *J Mater Sci Mater Med* 2004; 15(4):361-5.

Lucarelli E; Fini M; Baccheroni A; Donati D; Sangiorgi L; Cenacchi A; Del Vento AM; Meotti C; Bertoja AZ; Giardino R; Fornasari PM; Mercuri M; Picci P. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stem cells. *Biomaterials* 2003; 18:3095-100.

Lucarelli E; Fini M; Baccheroni A; Giavaresi G; Di Bella C; Aldini NN; Guzzardella G; Martini L; Cenacchi A; Di Maggio N; Sangiorgi L; Fornasari PM; Mercuri M; Giardino R; Donati D. Stromal stem cells and platelet-rich plasma improve bone allograft integration. *Clin Orthop Relat Res* 2005; 435:62-68.

Maire M; Logeart-Avramoglou D; Degat MC; Chaubet F. Retention of transforming growth factor beta1 using functionalized dextran-based hydrogels. *Biomaterials* 2005; 26(14):1771-80.

Manolagas SC. Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis *Endocr Rev* 2000; 21(2): 115-37

Maor G; Rochwerger M; Segev Y; Phillip M. Leptin acts as a growth factor on the chondrocytes of skeletal growth centers. *J Bone Miner Res* 2002; 17(6): 1034-1043.

Marks SC Jr; Popoff SN. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat* 1988;183(1):1-44.

Marsh JL. Principles of bone grafting: non-union, delayed union. *Surgery* 2006; 24 (6): 207-210.

Martina M; Hutmacher DW. Biodegradable polymers applied in tissue engineering research: a review. *Polym Int* 2007; 56 (2): 145-157.

Martini L; Fini M; Giavaresi G; Giardino R. Sheep model in orthopedic research: A literature review. *Comp Med* 2001; 51(4):292-9.

Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67:753-91.

Matsumoto T; Kuroda R; Mifune Y; Kawamoto A; Shoji T; Miwa M; Asahara T; Kurosaka M. Circulating endothelial/skeletal progenitor cells for bone regeneration and healing. *Bone* 2008; 43 (3):434-9.

McCann S; Byrne JL; Rovira M; Shaw P; Ribaud P; Sica S; Volin L; Olavarria E; Mackinnon S; Trabasso P; VanLint MT; Ljungman P; Ward K; Browne P; Gratwohl A; Widmer AF; Cordonnier C. Outbreaks of infectious diseases in stem cells transplant units: a silent cause of death for patients and transplant programmes. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33 (5):519-29.

McFarland CD; Mayer S; Scotchford C; Dalton BA; Steele JG; Downes S. Attachment of cultured human bone cells to novel polymers. *J Biomed Mater Res* 1999; 44(1):1-11.

Macgowan DJ. *In Sociologia chinesa – autoplastia. Transformação do homem em animal estiolamento e atrophia humana, casos de teratologia.* 1892. Nota do tradutor Demetrio Cinatti. Lisboa Imprensa Nacional. The Project Gutenberg.

McKay B; Sandhu HS. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in spinal fusion applications. *Spine* 2002; 27(16 Suppl 1):S66-85.

McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br* 1978; 60-B (2):150-62.

Mclaughlin RM; Roush IK. Autogenous cancellous and corticocancellous bone grafting. *Vetmed* 1998; 93:1071-4.

Meinig RP; Rahn B; Perren SM; Gogolewski S. Bone regeneration with resorbable polymeric membranes: treatment of diaphyseal bone defects in the rabbit radius with poly(L-lactide) membrane. A pilot study. *J Orthop_Trauma* 1996;10(3):178-90.

van Minnen B; van Leeuwen MB; Kors G; Zuidema J; van Kooten TG; Bos RR. In vivo resorption of a biodegradable polyurethane foam, based on 1, 4-butanediisocyanate: a three-year subcutaneous implantation study. *J Biomed Mater Res A* 2008; 85(4):972-82.

Miyazono K; Maeda S; Imamura T. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16(3):251-63.

Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch* 2009; 76 (2):56-66.

Mroz TE; Suen PW; Shamie AN; Whang PG; Whang JC. Bone graft substitutes in spinal surgery. *Operative Techniques in Orthopaedics* 2003; 13(3):146-151.

Mullender MG; Huiskes R; Versleyen H; Buma P. Osteocyte density and histomorphometric parameters in cancellous bone of the proximal femur in five mammalian species. *J Orthop Res* 1996; 14(6): 972-9.

Mundy GR. Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. *J Bone Miner Res* 1993; 8 (2):S505-10.

Murphy WL; Peters MC; Kohn DH; Mooney DJ.. Sustained release of vascular endothelial growth factor from mineralized poly(lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 2000; 21 (24): 2521-2527.

Muschler GF; Hyodo A; Manning T; Kambic H; Easley K. Evaluation of human bone morphogenetic protein 2 in a canine spinal fusion model. *Clin Orthop Relat Res* 1994; (308):229-40.

Nafei A; Danielsen CC; Linde F; Hvid I. Properties of growing trabecular ovine bone. Part I: mechanical and physical properties. *J Bone Joint Surg Br* 2000; 82(6):910-20.

Nathanson MA. Proteoglycan synthesis by skeletal muscle undergoing bone matrix-directed transformation into cartilage in vitro. *J Biol Chem* 1983; 258(17):10325-34.

Newman E; Turner AS; Wark JD. The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone* 1995; 16(4 Suppl):277S-84S.

Nomi M; Atala A; Coppi PD; Soker S. Principals of neovascularization for tissue engineering. *Mol Aspects Med* 2002;23(6):463-83.

Nordin BE; Need AG; Chatterton BE; Horowitz M; Morris HA. The relative contributions of age and years since menopause to postmenopausal bone loss. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70(1):83-8.

Nunamaker DM. Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* 1998; (355 Suppl): S56-65.

Nuss KMR; Auer JA; Boos A; Rechenberg B. An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bones. *BMC Musculoskelet Disord* 2006; 7:67.

Nyman S; Gottlow J; Karring T; Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol* 1982; 9(3):257-65.

Offenbacher S; Heasman PA; Collins JG. Modulation of host PGE2 secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J Periodontol* 1993; 64(5 Suppl):432-44.

Ogata K; Imazato S; Ehara A; Ebisu S; Kinomoto Y; Nakano T; Umakoshi Y. Comparison of osteoblast responses to hydroxyapatite and hydroxyapatite/soluble calcium phosphate composites. *J Biomed Mater Res A* 2005; 72(2): 127-35.

Ogiso B; Hughes FJ; Melcher AH; McCulloch CA. Fibroblasts inhibit mineralised bone nodule formation by rat bone marrow stromal cells in vitro. *J Cell Physiol* 1991; 146(3):442-50.

O'Keeffe RM Jr; Riemer BL; Butterfield SL. Harvesting of autogenous cancellous bone graft from the proximal tibial metaphysis. A review of 230 cases. *J Orthop Trauma* 1991;5 (4): 469-74.

Okuda K; Kawase T; Momose M; Murata M; Saito Y; Suzuki H; Wolff LF; Yoshie H. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-b and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol* 2003; 74(6), 849-57.

Orui H; Imaizumi S; Ogino T; Motoyama T. Effects of bone morphogenetic protein-2 on human tumor cell growth and differentiation: A preliminary report. *J Orthop Sci* 2000; 5(6):600-4.

Owen M. Histogenesis of bone cells. *Calcif Tissue Res* 1978; 18; 25(3): 205-7.

Paavolainen P; Karaharju E; Slätis P; Ahonen J; Holmström T. Effect of rigid plate fixation on structure and mineral content of cortical bone. *Clin Orthop Relat Res* 1978; (136):287-93.

Panagiotis M. Classification of non-union. *Injury* 2005. 36 S4:s30-7.

Papay FA; Hardy S; Morales L Jr; Walker M; Enlow D. "False" migration of rigid fixation appliances in paediatric craniofacial surgery. *J Craniofac Surg* 1995; 6(4):309-13.

Parfitt AM; Drezner MK; Glorieux FH; Kanis JA; Malluche H; Meunier PJ; Ott SM; Recker RR; Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 1987; 2(6):595-610

Parikh SN. Bone grafts substitutes: past. Present, future. *J Postgrad Med* 2002; 48:142-8.

Partridge K; Yang X; Clarke NM; Okubo Y; Bessho K; Sebald W; Howdle SM; Shakesheff KM; Oreffo RO. Adenoviral BMP-2 gene transfer in mesenchymal stem cells: in vitro and in vivo bone formation on biodegradable polymer scaffolds. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 292(1):144-52.

Perry CR. Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. *Clin Orthop Rel Res* 1999; 360:71-86.

Peterson B; Zhang J; Iglesias R; Kabo M; Hedrick M; Benhaim P; Lieberman JR. Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Tissue Eng* 2005; 11(1-2):120-9.

Phieffer LS; Goulet JA. Delayed unions of the tibia. *J Bone Joint Surg Am* 2006; 88(1):206-16.

Pearce AJ; Richards RG; Milz S; Schneider E; Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* 2007; 13:1-10.

Phemister DB. The classic: repair of bone in the presence of aseptic necrosis resulting from fractures, transplantations, and vascular obstruction. *Clin Orthop Relat Res* 2008; 466(5): 1021-33.

Pietrzak WS; Ronk R. Calcium sulfate bone void filler: a review and a look ahead. *J Craniofac Surg* 2000; 11(4):327-33.

Pilliar RM; Filiaggi MJ; Wells JD; Grynpas MD; Kandel RA. Porous calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute applications - in vitro characterization. *Biomaterials* 2001; 22(9):963-72.

Pineda LM; Büsing CM; Meinig RP; Gogolewski S. Bone regeneration with resorbable polymeric membranes. III. Effect of poly (L-lactide) membrane pore size on the bone healing process in large defects. *J Biomed Mater Res* 1996; 31:385-94.

Place ES; George JH; Williams CK; Stevens M. Synthetic polymer scaffolds for tissue engineering. *Chem Soc Rev* 2009; 38(4):1139-51.

Potes JC; Reis JC; Silva FC; Relvas C; Cabrita AS; Simões JA. The Sheep as an animal model in orthopaedic surgery. *Experimental Pathology and Health Sciences* 2008; 2(1): 29-32.

Pou AM. Update on new biomaterials and their use in reconstructive surgery. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 11:240-44.

Poynton AR; Lane JM. Safety profile for the clinical use of bone morphogenetic proteins in the spine. *Spine* 2002; 27(16 Suppl 1):S40-8.

Prolo DJ; Gutierrez RV; DeVine JS; Oklund SA. Clinical utility of allogeneic skull discs in human craniotomy. *Neurosurgery* 1984; 14(2):183-6.

Rahn BA; Perren SM. Calcein blue as a fluorescent label in bone. *Experientia* 1970; 26(5): 519-20.

Rahn BA; Perren SM. Xylenol orange, a fluorochrome useful in polychrome sequential labeling of calcifying tissues. *Stain Technol* 1971; 46(3): 125-9.

Rahn BA. Intra Vital Staining Techniques in *Handbook of Biomaterials Evaluation*, edited by Andreas F. von Recum, 2nd ed, 1999, Taylor & Francis, Philadelphia, U.S.A. 727-42.

Rai B; Oest ME; Dupont KM; Ho KH; Teoh SH; Guldberg RE. Combination of platelet-rich plasma with polycaprolactone-tricalcium phosphate scaffolds for segmental bone defect repair. *J Biomed Mater Res A* 2008; 85(4): 888-99.

Rauch F. Watching bone cells at work: what we can see from bone biopsies. *Pediatr Nephrol* 2006; 21:457-62.

Rauch F; Travers R; Parfitt, AM; Glorieux FH. Static and dynamic bone histomorphometry in children with osteogenesis imperfecta. *Bone* 2000; 26 (6): 581-9.

Reddi AH; Wientroub, S; Muthukumaran, N. Biological principles of bone induction. *Orthop. Clin. North Am* 1987; 18 (2):207-12.

Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* 1998; 16(3):247-52.

Reddi AH. Bone morphogenetic proteins and skeletal development: the kidney-bone connection. *Pediatr Nephrol* 2000; 14(7):598-601.

Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Jont Surg Am* 2001; 83-A Suppl 1(Pt 1):S1-6.

Reedy BK; Pan F; Kim WS; Gannon FH; Krasinskas A; Bartlett SP. Properties of coralline hydroxyapatite and expanded polytetrafluoroethylene membrane in the immature craniofacial skeleton. *Plast Reconstr Surg* 1999; 103 (1):20-6.

Reichert JC; Saifzadeh S; Wullschlegel ME; Epari DR; Schütz MA; Duda GN; Schell H, van Griensven M; Redl H; Hutmacher DW. The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials* 2009; 30(12):2149-63.

Resnick JI; Kinney BM; Kawamoto HK Jr. The effect of rigid internal fixation on cranial growth. *Ann Plast Surg* 1990; 25(5):372-4.

Reyes CD; Petrie TA; Burns KL; Schwartz Z; García AJ. Biomolecular surface coating to enhance orthopaedic tissue healing and integration. *Biomaterials* 2007; 28(21): 3228-35.

Rizzi SC; Heath DJ; Coombes AG; Bock N; Textor M; Downes S. Biodegradable polymer/hydroxyapatite composites: surface analysis and initial attachment of human osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 2001; 55(4):475-86.

Rodan GA; Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption--a hypothesis. *Calcif Tissue Int* 1981; 33(4):349-51.

Rohanizadeh R; Swain R; Mason S. Gelatin sponges (Gelfoam®) as a scaffold for osteoblasts. *J Mater Sci* 2007; 19(3):1173-82.

Roodman GD. Regulation of osteoclast differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1068:100-9.

Roodman GD; Kurihara N; Ohsaki Y; Kukita A; Hosking D; Demulder A; Smith JF; Singer FR. Interleukin 6. A potential autocrine/paracrine factor in Paget's disease of bone. *J Clin Invest* 1992; 89(1):46-52.

Rosen V; Thies RS. The BMP proteins in bone formation and repair. *Trends Genet* 1992; 8(3):97-102.

Ross FP. Cytokine regulation of osteoclast formation and function. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2003; 3(4):282-6.

Sabolinski ML; Alvarez O; Auletta M; Mulder G; Parenteau NL. Cultured skin as a "smart" material for healing wounds: experience in venous ulcers. *Biomaterials* 1996; 17:311-20.

Sachlos E; Czernuszka JT. Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur Cell Mater* 2003; 5:29-39.

Sakou T. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone* 1998; 22(6):591-603.

Salgado AJ; Coutinho OP; Reis RL. Bone Tissue Engineering: state of the art and future trends. *Macromol. Biosci* 2004; 4 (8):743-65.

Salgado AJ; Coutinho OP; Reis RL; Davies JE. In vivo response to starch-based scaffolds designed for bone tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A* 2007; 80(4):983-9;

Sampath TK; Reddi AH. Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78(12):7599-603.

Sanan A; Haines SJ. Repairing holes in the head: a history of cranioplasty. *Neurosurgery* 1997; 40(3): 588-603.

Sandhu HS; Grewal HS; Parvataneni H. Bone grafting for spinal fusion. *Orthop Clin North Am* 1999; 30: 685-98.

Satomura K; Tobiume S; Tokuyama R; Yamasaki Y, Kudoh K; Maeda E; Nagayama M. Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vivo. *J Pineal Res* 2007; 42:231-9.

Scaduto AA; Lieberman JR. Gene therapy for osteoinduction. *Orthop Clin Nor Am* 1999; 30(4): 625-33.

Schaffner P; Dard M M. Review Structure and function of RGD peptides involved in bone biology. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60 (1): 119– 32.

Schieker M; Seitz H; Drosse I; Seitz S; Mutschler W. Biomaterials as scaffold for bone tissue engineering. *Eur J Trauma* 2006, 2:114-24.

Schimandle JH; Boden SD. Spine update. The use of animal models to study spinal fusion. *Spine* 1994; 19(17):1998-2006.

Schmitz JP; Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* 1986; 205:299-308.

Schmitz JP; Hollinger JO. A preliminary study of the osteogenic potential of a biodegradable alloplastic-osteoinductive alloimplant. *Clin Orthop Relat Res* 1988; (237):245-55.

Schwarz F; Herten M; Sager M; Wieland M; Dard M; Becker J. Histological and immunohistochemical analysis of initial and early osseous integration at chemically modified and conventional SLA titanium implants: preliminary results of a pilot study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2007;18 (4): 481-8.

Seeherman HJ; Bouxsein M; Kim H; Li R; Li XJ; Aiolo M; Wozney JM. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered in an injectable calcium phosphate paste accelerates osteotomy-site healing in a nonhuman primate model. 1: *J Bone Joint Surg Am* 2004; 86-A(9):1961-72.

Seeherman HJ; Wozney JM. Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16 (3): 329-45.

Semba I; Ishigami T; Sugihara K; Kitano M. Higher osteoclastic demineralization and highly mineralized cement lines with osteocalcin deposition in mandibular cortical bone of autosomal dominant osteopetrosis type II: ultrastructural and undecalcified histological investigations. *Bone* 2000;27 (3): 389-95.

Sen MK; Miclau T. Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions? *Injury* 2007; 38 (S1), s75-80.

Serke S; Säuberlich S; Abe Y; Huhn D. Analysis of CD34-positive hemopoietic progenitor cells from normal human adult peripheral blood: flow-cytometrical studies and in-vitro colony (CFU-GM, BFU-E) assays. *Ann Hematol* 1991; 62(2-3):45-53.

Seyedin SM; Thompson AY; Bentz H; Rosen DM; McPherson JM; Conti A; Siegel NR; Galluppi GR; Piez KA. Cartilage-inducing factor-A. Apparent identity to transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 1986; 261(13):5693-5.

Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cells and Mat* 2008; 15:53-76.

Shin H; Jo S; Mikos AG. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials* 2003; 24(24):4353-64.

Silver JJ; Einhorn TA Osteoporosis and aging. Current update. *Clin Orthop Relat Res* 1995; (316):10-20.

Simonet WS; Lacey DL; Dunstan CR; Kelley M; Chang MS; Lüthy R; Nguyen HQ; Wooden S; Bennett L; Boone T; Shimamoto G; DeRose M; Elliott R; Colombero A; Tan HL; Trail G; Sullivan J; Davy E; Bucay N, Renshaw-Gegg L; Hughes TM; Hill D; Pattison W; Campbell P; Sander S; Van G; Tarpley J; Derby P; Lee R; Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 18; 89(2):309-19.

Sivarajasingam V; Pell G; Morse M; Shepherd JP. Secondary Bone Grafting of Alveolar Clefts: A Densitometric Comparison of Iliac Crest and Tibial Bone Grafts. *Cleft Palate Craniofac J* 2001; 38 (1): 11-4.

Skinner JA; Kroon PO; Todo S; Scott G. A femoral component with proximal HA coating. An analysis of survival and fixation at up to ten years. *J Bone Joint Surg Br* 2003; 85(3):366-70.

Soda H; Raymond E; Sharma S; Lawrence R; Cerna C; Gomez L; Timony GA; Von Hoff DD; Izbicka E. Antiproliferative effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on human tumor colony-forming units. *Anti-Cancer Drugs* 1998; 9(4):327-32.

Solheim E. Growth factors in bone. *Int Orthopaedics* 1998; 22(6), 410-16.

Sommerfeldt DW; Rubin CT. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J* 2001; 10 (S2):s86-95.

Song JH; Kim HE; Kim HW. Collagen-apatite nanocomposite membranes for guided bone regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007; 83B (1): 248-57.

Sottosanti JS. Calcium sulfate-aided bone regeneration: a case report. : *Periodontal Clin Investig* 1995; 17(2):10-5.

Spaans CJ; Belgraver VW; Rienstra O; de Groot JH; Veth RP; Pennings AJ. Solvent-free fabrication of micro-porous polyurethane amide and polyurethane-urea scaffolds for repair and replacement of the knee-joint meniscus. *Biomaterials* 2000; 21(23):2453-60.

Stelnicki EJ; Hoffman W. Intracranial migration of microplates versus wires in neonatal pigs after frontal advancement. *J Craniofac Surg* 1998; 9(1):60-4.

Stevens MM; Marini RP; Schaefer D; Aronson J; Langer R; Shastri VP. In vivo engineering of organs: The bone bioreactor. *PNAS* 2005; 102(32):11450-5.

Swiontkowski MF; Aro HT; Donell S; Esterhai JL; Goulet J; Jones A; Kregor PJ; Nordsletten L; Paiement G; Patel A. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in open tibial fractures. A subgroup analysis of data combined from two prospective randomized studies. *J Bone Joint Surg Am* 2006; 88(6):1258-65.

Sullivan PK; Smith JF; Rozzelle AA. Cranio-orbital reconstruction: safety and image quality of metallic implants on CT and MRI scanning. *Plast Reconstr Surg* 1994; 94(5):589-96.

Sulong MZAM; Aziz RA. Wear of materials used in dentistry: a review of the literature. *J Prosthet Dent* 1990; 63(3):342-9.

Suzuki T; Yamamoto T; Toriyama M; Nishizawa K; Yokogawa Y; Mucalo MR; Kawamoto Y; Nagata F; Kameyama T. Surface instability of calcium phosphate ceramics in tissue culture medium and the effect on adhesion and growth of anchorage-dependent animal cells. *J Biomed Mater Res* 1997; 34(4):507-17.

Tamai N; Myoui A; Tomita T; Nakase T; Tanaka J; Ochi T; Yoshikawa H. Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo. *J Biomed Mater Res* 2002; 59(1):110-7.

Tay BK; Patel VV; Bradford DS. Calcium sulfate - and calcium phosphate-based bone substitutes. Mimicry of the mineral phase of bone. *Orthop Clin North Am* 1999; 30(4): 615-23.

Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. 2000. *Science* 289: 1504-8.

Termaat MF; Den Boer FC; Bakker FC; Patka P; Haarman HJ. Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 2005; 87(6):1367-78.

Thomas V; Kumari TV; Jayabalan M. In vitro studies on the effect of physical cross-linking on the biological performance of aliphatic poly (urethane urea) for blood contact applications. *Biomacromolecules* 2001; 2(2):588-96.

Thomsen JS; Laib A; Koller B; Prohaska S; Mosekilde L; Gowin W. Stereological measures of trabecular bone structure: comparison of 3D micro computed tomography with 2D histological sections in human proximal tibial bone biopsies. *J Microsc* 2005; 218 (Pt 2): 171-9.

Thor A; Franke-Stenport V; Johansson CB; Rasmusson L. Early bone formation in human bone grafts treated with platelet-rich plasma: preliminary histomorphometric results. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007; 36(12), 1164–71.

Thorwarth M; Wehrhan F; Srour S; Schultze-Mosgau S; Felszeghy E; Bader RD; Schlegel KA. Evaluation of substitutes for bone: comparison of microradiographic and histological assessments. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2007; 45 (1):41-7.

Tischer T; Milz S; Weiler C; Pautke C; Hausdorf J; Schmitz C; Maier M. Dose-dependent new bone formation by extracorporeal shock wave application on the intact femur of rabbits. *Eur Surg Res* 2008;41 (1): 44-53.

Todd S; Rawsterne R; Ulijn R; Gough J. Osteoblast response to amino acid-modified surfaces, *MRS Proceedings 950E*, Paper no: 0950-D04-20, 2006.

Togawa D; Bauer TW; Lieberman IH; Sakai H. Lumbar intervertebral body fusion cages: histological evaluation of clinically failed cages retrieved from humans. *J Bone Joint Surg Am* 2004; 86:70-9.

Tomford WW. Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts. *J Bone Joint Surg Am* 1995; 77(11):1742-54.

Tonino AJ; Davidson CL; Klopper PJ; Linclau LA. Protection from stress in bone and its effects. Experiments with stainless steel and plastic plates in dogs. *J Bone Joint Surg Br* 1976; 58(1):107-13.

Toriumi DM; O'Grady K; Horlbeck DM; Desai D; Turek TJ; Wozney J. Mandibular reconstruction using bone morphogenetic protein 2: long-term follow-up in a canine model. *Laryngoscope* 1999; 109(9): 1481-9.

Torricelli P; Fini M; Giavaresi G; Giardino R. Bone tissue cultures: an in vitro model for the evaluation of bone defect healing after L-Arginine and L-Lysine administration. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2001;29 (4): 325-34.

Tsiridis E; Upadhyay N; Giannoudis PV. Molecular aspects of fracture healing: which are the import molecules? *Injury* 2007; 38 S1:S11-25.

Tsuruga E; Takita H; Itoh H; Wakisaka Y; Kuboki Y. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J Biochem* 1997; 121(2):317-24.

Uludag H; Gao T; Porter TJ; Friess W; Wozney JM. Delivery systems for BMPs: factors contributing to protein retention at an application site. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83-A Suppl 1(Pt 2):S128-35.

Urist M. Bone formation by osteoinduction. *Science* 1965; 150:893-9.

- Vacanti CA. The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med* 2006; 10(3):569-76.
- Vaccaro AR. The role of the osteoconductive scaffold in synthetic bone graft. *Orthopedics* 2002; 25(5 Suppl):s571-8.
- Vaccaro AR; Patel T; Fischgrund J; Anderson DG; Truumees E; Herkowitz H; Phillips F; Hilibrand A; Albert TJ. A pilot safety and efficacy study of OP-1 putty (rhBMP-7) as an adjunct to iliac crest autograft in posterolateral lumbar fusions. *Eur Spine J* 2003; 12(5):495-500.
- Vaibhav B; Nilesh P; Vikram S; Anshul C. Bone morphogenetic protein and its application in trauma cases: A current concept update. *Injury*. 2007; 12:1-9.
- Verrier S; Pallu S; Bareille R; Jonczyk A; Meyer J; Dard M; Amédée J. Function of linear and cyclic RGD-containing peptides in osteoprogenitor cells adhesion process. *Biomaterials* 2002; 23 (2): 585– 96.
- Villareal DT; Morley JE. Trophic factors in aging. Should older people receive hormonal replacement therapy? *Drugs Aging* 1994; 4(6):492-509.
- Walker DH; Wright NM. Bone morphogenetic proteins and spinal fusion. *Neurosurg Focus* 2002; 13(6):e3.
- Walker WF; Liem KF. The Protochordates and the origin of vertebrates. In "Functional Anatomy" of the vertebrates. An Evolutionary perspective". 1994² ed: 26-49.
- Wan M; Cao X. BMP signaling in skeletal development. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328(3):651-7.
- Walker WF; Liem KF 1994. The Protochordates and the origin of vertebrates. In "Functional Anatomy" of the vertebrates. An Evolutionary perspective". 2^a ed.: 26-49.
- Wang M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials* 2003; (24):2133-51.

Wang Y; Cui FZ; Jiao YP; Hu K; Fan DD. Modification of bone graft by blending with lecithin to improve hydrophilicity and biocompatibility. *Biomed. Mater* 2008; 3 (1), 15012

Warnke PH; Springer IN; Wiltfang J; Acil Y; Eufinger H; Wehmöller M; Russo PA; Bolte H; Sherry E; Behrens E; Terheyden H. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet* 2004; 364(9436):766-70.

Warnke PH; Wiltfang J; Springer I; Acil Y; Bolte H; Kosmahl M; Russo PA; Sherry E; Lützen U; Wolfart S; Terheyden H. Man as living bioreactor: fate of an exogenously prepared customized tissue-engineered mandible. *Biomaterials* 2006; 27 (17):3163-7.

Weese JL; Rosenthal MS; Gould H. Avoidance of artefacts on computerized tomograms by selection of appropriate surgical clips. *Am J Surg* 1984; 147(5):684-7.

Weibrich G; Kleis WK; Hafner G; Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg* 2002; 30(2):97-102.

Weng D; Hürzeler MB; Quiñones CR; Ohlms A; Caffesse RG. Contribution of the periosteum to bone formation in guided bone regeneration. A study in monkeys. 1: *Clin Oral Implants Res* 2000; 11(6):546-54.

Whitman DH; Berry RL; Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55 (11):1294-99.

Włodarski KH. Properties and origin of osteoblasts. *Clin Orthop Relat Res* 1990 ;(252):276-93.

Wong L; Dufresne CR; Richtsmeier JT; Manson PN. The effect of rigid fixation on growth of the neurocranium. *Plast Reconstr Surg* 1991; 88(3): 395-403.

Wong SY; Kariks J; Evans RA; Dunstan CR; Hills E. The effect of age on bone composition and viability in the femoral head. *J. Bone Joint Surg Am* 1985; 67 (2): 274-83.

Wozney JM; Rosen V; Celeste AJ; Mitsock LM; Whitters MJ; Kriz RW; Hewick RM; Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988; 242(4885):1528-34.

Wozney JM. The bone morphogenetic protein family: multifunctional cellular regulators in the embryo and adult. *Eur J Oral Sci* 1998; 106 Suppl 1:160-6.

Wozney JM; Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin. Orthop. Relat. Res* 1998; 346:26-37.

Wyllie AH; Kerr JF; Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68:251-306.

Yamaguchi A; Komori T. Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* 2000; 21(4):393-411.

Yancopoulos GD; Davis S; Gale NW; Rudge JS; Wiegand SJ; Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407(6801):242-8.

Yaremchuk MJ; Fiala TG; Barker F; Ragland R. The effects of rigid fixation on craniofacial growth of rhesus monkeys. *Plast Reconstr Surg* 1994; 93(1):1-10.

Yaremchuk MJ; Rubin JP; Posnick JC. Symposium "Implantable Materials in Facial Aesthetic and Reconstructive Surgery: Biocompatibility and Clinical Applications". American Society of Maxillofacial Surgeons. Montreal, Quebec, October 6, 1995. *J Craniofac Surg* 1996; 7(6):473-84.

Yasuda H; Shima N; Nakagawa N; Mochizuki SI; Yano K; Fujise N; Sato Y; Goto M; Yamaguchi K; Kuriyama M; Kanno T; Murakami A; Tsuda E; Mrinaga T; Higashio K. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998; 39(3):1329-37.

Yoon ST; Boden SD. Osteoinductive molecules in orthopaedics: basic science and preclinical studies. *Clin. Orthop. Relat Res* 2002; 395:33-43.

Young MF. Bone matrix proteins: more than markers. *Calcif Tissue Int* 2003; 72(1):2-4.

Young MF. Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporos Int* 2003; 14 (Supl 3): S35 – S42.

Yu JC; Bartlett SP; Goldberg DS; Gannon F; Hunter J; Habecker P, Whitaker LA. An experimental study of the effects of craniofacial growth on the long-term positional stability of microfixation. *J Craniofac Surg* 1996; 7(1):64-8.

Zedda M; Lepore G; Manca P; Chisu V; Farina V. Comparative Bone Histology of Adult Horses (*Equus caballus*) and Cows (*Bos taurus*). *Anat Histol Embryol* 2008;37(6): 442-5.

Zerwekh JE; Kourosh S; Scheinberg R; Kitano T; Edwards ML; Shin D; Selby DK; Fibrillar collagen-biphasic calcium phosphate composite as a bone graft substitute for spinal fusion. *J Orthop Res* 1992; 10(4):562-72.

Zuk PA; Zhu M; Mizuno H; Huang J; Futrell JW; Katz AJ; Benhaim P; Lorenz HP; Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7(2):211-28.

Zuk PA; Zhu M; Ashjian P; De Ugarte; DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13(12):4279-95.

ANEXO 1

8. ANEXO

Descrição dos materiais testados

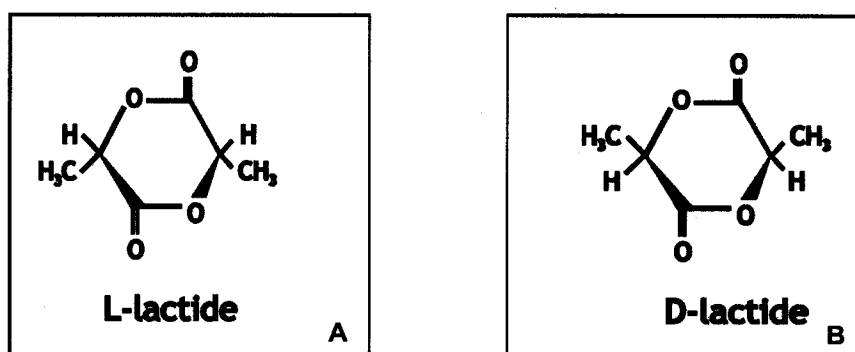
Membranas de ácido poli(L/DL-láctico) 80/20

As membranas foram produzidas a partir de uma matéria-prima base adquirida à CCA Biochem (Gorinchem, Países Baixos) nos laboratórios do Departamento de Investigação de polímeros da Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen – Association for the Study of Internal Fixation, AO/ASIF Research Institute (ARI) – Suíça, a partir de uma solução polimérica em solventes não clorados e por um processo de fase inversa. As membranas com uma espessura de 0,24 a 0,26 mm foram cortadas em fracções de 50 x 50 mm.

As membranas de ácido poli(L/DL-láctico) 80/20 foram produzidas a partir de três tipos de ácidos polilácticos cujos monómeros (isómeros) utilizados na síntese (Figuras 1.10 A e B) foram: Láctico, D-láctico e DL-láctico, numa proporção de 80% de L-láctico e 20% D-láctico e DL-láctico. O fabrico das membranas utilizadas foi referido em detalhe por Gugala e Gogolewski (1999).

As membranas foram lavadas em etanol para a remoção de impurezas e secas até peso constante. De forma a permitir a sua utilização em cirurgia foram posteriormente embaladas em bolsas plásticas que foram esterilizadas a frio com etileno glicol (ETO) e desgaseificadas, de forma rotineira, num esterilizador e novamente submetidas a vácuo num forno a 60° C e com pressão de 63×10^{-1} milibares (mbar), durante 10 horas. Por fim foram encerradas num terceiro invólucro de folha de alumínio.

A dimensão relativa dos poros das membranas foi estimada através do SEM micrographs (Hitachi Field Emission Scanning Electron Microscope S-4100, Tóquio, Japão).



Estrutura química do isômero L-Láctico; **B** – Estrutura química do isômero D-Láctico. (Cortesia do Professor Doutor Sylwester Gogolewski)

Esponjas de poliuretano

Os monómeros utilizados na síntese do poliuretano foram três, o di-isocianato alifático hexametileno (*Sigma*, Milwaukee, E.U.A), o poli diol (ϵ -caprolactona) (PCL) (Aldrich, Milwaukee, E.U.A) e o diol “isosorbide” como extensor de cadeia (1,4:3,6-dianhidro-D-sorbitol) (Isso, Aldrich, Milwaukee, E.U.A).

O polioli foi baseado numa mistura de 50% of poli (ϵ -caprolactona) com um peso molecular 2000 dalton (componente hidrófobo) e 50% de polietileno glicol com um peso molecular de 600 dalton (componente hidrófilo).

Foram assim utilizadas as seguintes composições:

Composição A (PUA): A esponja constava de di-isocianato alifático hexametileno, polioli com 50% componente hidrofílica (constituída por poli diol de óxido de etileno), 50% da componente hidrofóbica (constituída por poli diol de ϵ -caprolactona), cristais de hidroxiapatite nanométrica modificada com um sistema de creatina/putrescina.

Composição B (PUB): A esponja constava de di-isocianato alifático hexametileno, polioli com 50% componente hidrofílica (constituída por poli diol de óxido de etileno), 50% da componente hidrofóbica (constituída por poli diol de ϵ -caprolactona), cristais de hidroxiapatite nanométrica modificada com lecitina de soja.

O di-isocianato foi destilado sob vácuo a 1,06 mbar e o isosorbide foi seco num forno a vácuo a 40° C durante seis horas. O polioli (PCL) foi utilizado tal qual fornecido, sem purificação posterior. Como catalizador foi utilizado o “dibutiltin

dilaurate”. O *ratio* entre o di-isocianato, o poliol e o extensor da cadeia foi de 3:1:2 e o conteúdo do segmento duro no poliuretano resultante, foi de 60%.

O poliuretano utilizado neste projecto foi produzido utilizando uma técnica que combina os processos de dissolução selectiva de partículas de sacrifício e de fase inversa. De entre os parâmetros que afectam a formação de estruturas biodegradáveis porosas à base de poliuretano, incluem-se o tipo de solvente utilizado para a dissolução do polímero e o tamanho e concentração das partículas de sacrifício sólidas, misturadas à solução do polímero.

Os solventes utilizados para a preparação dos materiais de suporte, todos de elevado ponto de ebulição, foram o dimetilformamida (DMF), o dimetilsulfóxido (DMSO), o metil-2-pirrolidona (NMP). Como não solventes ou coagulantes para estimular o desenvolvimento de microporos, foram utilizados a acetona (A), etanol (ETOH), isopropanol (THF) e água (Fluka, Buchs, Suíça).

A geometria e o tamanho dos microporos são largamente determinados pelo tipo de solvente utilizado para a dissolução do polímero, o tipo de não-solvente, o *ratio* solvente/não-solvente e obviamente, a dimensão das partículas de sacrifício utilizadas. A presença do não-solvente conduz à formação de microporos nas paredes que separam os poros maiores, permitindo um aumento na permeabilidade do próprio material de suporte (Gorna e Gogolewski, 2006).

Nos casos em que os materiais de suporte poliméricos são produzidos exclusivamente utilizando partículas de sacrifício sólidas, o tamanho dos poros formados é maioritariamente controlado pelo tamanho das partículas de sacrifício. Neste caso concreto havendo também um não-solvente presente, este facto fez com que a presença deste tenha condicionado, como referido, a geometria e dimensão dos poros existentes. A permuta entre solvente/não-solvente inicia a separação de fase e este processo continua até que a solução do polímero contenha quantidade suficiente de não-solvente para precipitar. Esta separação de fase, induzida pelo líquido, conduz à formação de microporos, sobretudo nas paredes dos macroporos, que se formaram como resultado da replicação das partículas de sacrifício sólidas (Gorna e Gogolewski, 2006).

O fosfato de sódio heptahidratado foi utilizado como partícula de sacrifício sólida. Este sal foi moído com um moinho de laboratório e peneirado através de

peneiras analíticas (Fritsch Laborgeartebau, Idar-Oberstein, Alemanha). As fracções de sal com partículas de dimensões de 90 a 140 µm, 140 a 300 µm, 300 a 400 µm e 90 a 400 µm, foram recolhidas e usadas para a preparação das estruturas com uma dimensão de poros pré-determinada. Hidroxiapatite de nanodimensão com partículas de dimensão média de 20 nm (Advanced Biomaterials, Berkeley, E.U.A.) foram usadas como material de preenchimento osteocondutor (Gorna e Gogolewski, 2006). Na estrutura seleccionada foi utilizado hidroxiapatite de nanodimensões, 25 peso %, que foi adicionada à solução do polímero.

Numa primeira fase, o diol “isosorbide” liquefeito reagiu com o di-isocianato numa pressão de catalista (0,01 peso %) para formar um pré-polímero vítreo. O pré-polímero foi então dissolvido em DMF e posteriormente o PCL foi adicionado à solução de pré-polímero e a reacção foi mantida a 100° C para completar a síntese. A dissolução foi levada a cabo a 50° C durante seis horas, sob agitação. A solução viscosa de polímero foi diluída em DMF, filtrada através de um filtro de vidro G-2, e posteriormente aglomerada e precipitada com uma mistura de etanol e água destilada. A adição gota-a-gota do não-solvente é feita até serem visíveis os primeiros sinais de opacidade (“ponte de nuvem”).

A concentração típica do poliuretano na solução foi de 9,5 % (peso/volume). 15 Gramas (g) de poliuretano foram dissolvidos em 105 mililitros (ml) de solvente. Nesta fase foram adicionadas as partículas de sacrifício sólidas, sob vigorosa agitação. Esta pasta polímero-partículas de sacrifício permaneceu sete dias a secar em moldes, tendo sido os blocos ao fim deste período, removidos e as partículas de sacrifício também removidas utilizando como líquido filtrante/poroso, a água (Gorna e Gogolewski, 2006).

Após secagem a 60° C sob vácuo, o polímero foi novamente dissolvido em DMF até obter uma solução 5 peso % que posteriormente foi filtrada e moldada em cuvetes, para obter filmes que foram armazenados em dissecadores até uso posterior. Após o processo de secagem dá-se um fenómeno de relaxamento e a dimensão dos poros sofre alteração o que tem como consequência que a dimensão dos poros da estrutura seja menor do que a dimensão das partículas de sacrifício (Gorna e Gogolewski, 2006).

A estrutura porosa destes materiais de suporte foi observada utilizando um microscópio electrónico de varredura e emissão de campo a operar a 5 kV.

De forma a permitir a sua utilização em cirurgia estas esponjas foram embaladas em bolsas plásticas que foram esterilizadas a frio com ETO e desgaseificadas, de forma rotineira, num esterilizador e novamente submetidas a vácuo num forno a 60° C e com pressão de 63×10^{-1} mbar durante 10 horas. Por fim foram encerradas num terceiro invólucro de folha de alumínio.

Características da estrutura produzida:

- Peso molecular médio: Estes valores foram determinados a partir dos dados de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC): Número molecular médio de 224,990 Da e peso molecular médio de 509,700 Da, com um índice de polidispersidade (distribuição do peso molecular) de 2,26 (Gorna e Gogolewski, 2006).

- A análise térmica foi determinada a partir de um “scanner” calorímetro diferencial Perkin-Elmer Pyris DSC-1 (Norwalk, E.U.A.), calibrado com *indium* As análises foram feitas à temperatura ambiente e em intervalos de 60 a 750° C com uma taxa de aquecimento de 10° C/min.

- A densidade e porosidade das estruturas foram medidas por técnica standard¹ (Gorna e Gogolewski, 2006).

- A porosidade, ou seja o *ratio* poro/volume foi determinado a partir do *ratio* do volume não sólido, poros, em relação ao volume total do material, incluindo componentes sólidas e não sólidas, segundo o métodos descrito por Gorna e Gogolewski (2006).

- A permeabilidade das estruturas porosas de poliuretano foram medidas com aparelho de medição da permeabilidade próprio (Merck, Darmstadt, Alemanha), tendo sido o valor resultante calculado pela média de seis medições.

- As propriedades mecânicas foram medidas nas amostras secas e nas amostras húmidas. As forças compressivas a 25% de deformação e *young's modulli* foram determinadas utilizando um modelo de teste Instron 4302 (High

Wycombe, Bucks, Reino Unido).

Geralmente as propriedades mecânicas dos materiais de suporte húmidos são cerca de 70% inferiores aos materiais de suporte secos. A hidroxiapatite não intervém na estrutura dos poros, apenas melhora, como mencionado anteriormente, as capacidades mecânicas dos materiais de suporte em que é aplicada (Gorna e Gogolewski, 2006). As propriedades mecânicas estão dependentes do tamanho e estrutura dos poros do material de suporte. Relativamente aos materiais de suporte obtidos com o sistema DMF-THF, estes apresentaram excelente inter-conectividade entre os poros, densidades na ordem de 90 kg/m^3 e poro/volume na ordem de 90%. Estes materiais de suporte apresentam forças compressivas na ordem de 0,025 a 0,03 MPa e *modullus* compressivos na ordem de 0,06 a 0,09 MPa, como foi anteriormente mencionado.

Principais métodos para a produção de substitutos ósseos sintéticos

Relativamente ao fabrico deste tipo de substitutos, Salgado et al., (2004) diz que é fundamental que a metodologia de processamento não seja afectada pelas propriedades do material e que a técnica seja precisa e consistente no que concerne à porosidade, dimensão e distribuição dos poros e inter-conectividade. Diferentes grupos de estruturas temporárias devem exibir variações mínimas nas suas propriedades ao longo do seu processamento, quando submetidos aos mesmos parâmetros e condições de processamento.

Os requisitos necessários para um substituto ósseo sintético parecem simples, ou seja, obter uma matriz porosa com um grau de porosidade que permita uma inter-conectividade suficiente para que haja crescimento ósseo para o seu interior e, simultaneâneamente, ser suficientemente resistente de forma a suportar carga mecânica durante os períodos de integração e reparação. Do material ósseo de substituição espera-se ainda que interaja com os tecidos circundantes de modo a formar uma ligação segura com os mesmos, e que estimule novas células a crescerem e a invadirem essa mesma estrutura.

Alguns materiais de suporte poliméricos porosos tri-dimensionais são

¹ Cellular and plastics and rubbers – Determination of apparent (bulk) density. ISO 845:1988 (E).

produzidos utilizando técnicas de processamento baseadas na fusão ou na dissolução do polímero. Em ambos os casos, os polímeros são transformados a partir do estado líquido (polímero fundido ou em solução) para o estado sólido (processo de fase inversa) utilizando várias técnicas. Algumas das técnicas mais comuns para a obtenção de materiais porosos são: a dissolução selectiva de partículas de sacrifício, liofilização, fabrico de sólidos de forma livre, ligação de fibras (previamente obtidas por extrusão de polímero em solução - “wet spinning” ou polímero fundido ou “melt spinning” com formação de gás por expansão) e cristalização eutética (Pineda *et al.*, 1996; Boyan *et al.*, 1999; Burg *et al.*, 2000; Gugala e Gogolewski, 2000; Salgado *et al.*, 2004).

Os materiais de suporte produzidos utilizando a ligação de fibras consistem em estruturas compostas por microfibras enroladas, normalmente com baixa resistência mecânica. Neste tipo de materiais de suporte a dimensão dos poros é dificilmente controlável e as propriedades mecânicas são inadequadas para uma grande parte das aplicações na engenharia de tecidos.

As técnicas de expansão, dissolução selectiva de partículas e liofilização, produzem estruturas porosas com um controlo aceitável da dimensão e geometria dos poros e um *ratio* poro-volume adequado (Gugala e Gogolewski, 2000).

A técnica de fabrico de sólidos de forma livre, embora alguns autores a considerem ideal, está longe de o ser pois não permite por exemplo, o fabrico de materiais de suporte com uma dimensão de poros inferior a determinado diâmetro (Gorna e Gogolewski, 2006).

Outra das formas de obtenção de estruturas porosas pode ser por “freeze casting”. Esta técnica produz cerâmicas de formas complexas ou partes poliméricas (Fukasawa *et al.*, 2001). Segundo esta técnica uma mistura aquosa de cerâmica é vertida num molde e congelada. O solvente congelado actua temporariamente como ligante de forma a manter a estrutura unida, quando da remoção do molde. A estrutura é posteriormente submetida a uma secagem por congelação de forma a provocar a sublimação do solvente sob vácuo, evitando assim o stress da secagem e a consequente perda de volume, o que poderia dar origem a rachas. Após a secagem, as estruturas são submetidas a uma

aglomeração de forma a obter-se um material de resistência aumentada, dureza e, porosidade desejada. Através do controlo da direcção de crescimento dos cristais de gelo é possível impor ao material uma orientação preferencial da porosidade (Kang *et al.*, 1999).

Estruturas porosas com porosidades de cerca 40% a 65% podem ser obtidas por congelação de suspensões aquosas de hidroxiapatite, com consequente sublimação e aglomeração. A porosidade resultante é aberta e unidireccional, exibindo uma morfologia lamelar. O diâmetro dos poros pode ser controlado, modificando a taxa de congelação das pastas e a concentração das mesmas. Dois exemplos típicos deste empenho são os compósitos de um mineral-polímero, a força através da química e, uma estrutura natural cristalina, produzida através de “ice templating”, a força através das arquitectura (Deville *et al.*, 2006).

Fabrico das estruturas de poliuretano elastomérico tridimensional como material de suporte ósseo:

Na indústria as espumas de poliuretano são produzidas através de agentes dispersantes, contudo a elevada toxicidade destas substâncias impede a sua utilização na preparação de materiais de suporte que possam ser utilizados em aplicações biomédicas.

Na prática laboratorial os poliuretanos porosos tri-dimensionais são produzidos basicamente de duas formas:

- Utilização de dióxido de carbono gasoso que se forma durante a síntese do polímero (reacção de expansão) quando a água é utilizada como extensor da cadeia. O gás libertado permite “expandir” o polímero. Neste processo, a química dos monómeros e as razões entre os grupos –NCO e os grupos –OH, são parâmetros determinantes na hidrofiliidade final do material, na proporção volume/porosidade, na dimensão dos poros e na geometria dos mesmos. O inconveniente deste processo, exceptuando a hidrofiliidade que é totalmente controlada, é o facto de todas as outras características serem de difícil controlo. De qualquer forma, estas estruturas temporárias têm um bom desempenho em contacto com células e tecidos e, por outro lado, este processo permite uma

produção em larga escala destes materiais de suporte.

- Uma outra alternativa explora as técnicas utilizadas para a preparação de materiais de suporte a partir de outros polímeros bio-absorvíveis como os polihidroxibutiratos (PHB). Esta técnica utiliza a replicação de partículas de sacrifício sólidas, o processo de fase inversa e a combinação de ambos para a produção de estruturas tridimensionais (Gogolewski e Gorna, 2007).

Uma das potenciais desvantagens de utilizar partículas de sacrifício na preparação de materiais de suporte poliméricos, é a necessidade da efectiva remoção das partículas de sacrifício. O tempo necessário para esta remoção, através de lavagens com água, está dependente da dimensão das partículas de sal utilizadas e em geral, quanto mais pequenas as partículas, maior é o tempo necessário para a remoção do sal (Gorna e Gogolewski, 2006).

Como se pode facilmente concluir a dificuldade maior reside na obtenção de um equilíbrio entre uma estrutura temporária porosa mas com elevada resistência. Faz sentido dizer-se que uma estrutura tridimensional apropriada é um componente essencial de qualquer estratégia de engenharia tecidual (Salgado *et al.*, 2004) mas certamente não basta só por si.

De forma a ultrapassar este obstáculo a solução passa por fabricar uma estrutura composta em que haja um enriquecimento da matéria-prima de base com uma substância de elevada resistência como a hidroxiapatite. Estas estruturas são certamente produzidas por engenharia tecidual. Este campo da ciência está a estabelecer as fundações para futuras gerações de substitutos ósseos e terapias de regeneração óssea que irão certamente contribuir para uma significativa melhoria da qualidade de vida através da manutenção do esqueleto e a reversão de certas patologias (Hing, 2004).

