

Paulo Jorge Rocha da Palma

**Estudo de novas formulações
para regeneração óssea
em defeitos de dimensão crítica**

Coimbra

2009

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

Orientador

Professor Doutor Fernando Alberto Deométrio Alves Guerra

Co-orientador

Professor Doutor João Carlos Tómas Ramos

Aos meus pais
António e Maria
pelos valores transmitidos
e ao meu irmão

À Catarina
pelo apoio incondicional
e ao nosso filho Manuel

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Fernando Guerra, um agradecimento muito especial pela honra com que nos distinguiu aceitando a orientação deste trabalho e também por ser o mentor e o responsável pelo Laboratório de Tecidos Duros do nosso departamento. Reconhecemos a sua dedicação às causas que abraça e sua capacidade de liderança, bem como a amizade inestimável que nos tem dispensado.

Ao Senhor Professor Doutor João Carlos Ramos pela sua sabedoria e amizade que foram uma constante ajuda e exemplo ao longo da minha carreira Académica. Agradeço também todo o incentivo e orientação nesta tese.

À Senhora Professora Doutora Maria Helena Figueiredo, pela sua disponibilidade e pelos seus valiosos conhecimentos e ensinamentos. O seu empenho total no desenvolvimento desta tese revelou-se crucial, sendo também incansável o apoio e amizade fazendo-nos acreditar que a realização deste trabalho era possível.

Ao Senhor Professor Doutor João Luís Maló de Abreu, com quem temos tido o grato privilégio de privar e que nos apoiou com vigor para a frequência deste Mestrado. A sua conduta na construção e na liderança do Departamento de Medicina Dentária, Estomatologia e Cirurgia Maxilo-Facial é sem dúvida um marco na Medicina Dentária nacional. Esperamos continuar a merecer a sua confiança.

Ao Senhor Professor Doutor António Silvério Manuel Cabrita coordenador deste mestrado, minha gratidão pelo apoio e interesse que sempre dedica aos Projectos de Investigação.

Ao Senhor Professor Doutor Sérgio Matos pelo apoio prestado nesta problemática de investigação, e pela paciência com que me ajudou na fase da análise histomorfométrica.

Ao Senhor Professor Doutor João Miguel dos Santos pelos ensinamentos, incentivo e amizade na realização desta tese.

Ao Senhor Professor Doutor João Alberto Baptista Patrício, Director do Laboratório de Investigação Experimental dos Hospitais da Universidade de Coimbra pela disponibilidade na utilização das instalações.

Ao Senhor Prof. Dr Jack Kauser que sempre se preocupou e incentivou o desenvolvimento dos nossos estudos abrindo todas as portas para a investigação dos materiais.

Ao Professor Doutor Andrew Tofe que disponibilizou os materiais de experiência.

À Senhora Professora Doutora Margarida Figueiredo, pela disponibilização de conhecimentos científicos destes materiais e de bibliografia.

Ao Senhor Mestre João Frade pelo apoio na análise estatística.

À Senhora D.^a Cláudia Brites pelo rigor e primor que imprimiu nas tarefas de acompanhamento das cirurgias, a recolha e organização dos respectivos dados e o processamento dos tecidos duros.

Aos Senhores Drs. Marques Ferreira e Francisco Sanches e restantes colegas da disciplina de Endodontia pela colaboração e paciência em colmatar a nossa menor disponibilidade.

À Engenheira Gabriela Martins pelos dados científicos que nos disponibilizou e à Dr.^a Ana Messias pela revisão do inglês.

Ao Sr. Bruno Freitas pelo apoio na impressão desta tese.

A todos os Colegas e funcionários que trabalham ou trabalharam no Departamento e na Faculdade de Medicina, pelo entusiasmo e incentivo ao nosso trabalho.

Ao Daniel Chaves e Marta Sousa pelo incansável apoio na resolução de questões informáticas e na formatação desta tese.

A minha gratidão é ainda extensível a todos aqueles que, de forma directa ou indirecta, contribuíram para a realização deste trabalho.

À nossa família, mulher, filho, pais e irmão pelo amor e infinita paciência, fazendo com que esta tese lhes pertença.

Sumário

Agradecimentos

Sumário

A. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

- I. Justificação do tema
- II. Planificação e apresentação do trabalho
- III. Dinâmica, remodelação e regeneração do tecido ósseo

B. ESTUDO EXPERIMENTAL EM MODELO ANIMAL

- I. Objectivos
- II. Material e métodos
- III. Resultados
- IV. Discussão
- V. Conclusões
- VI. Resumo
- VII. Abstract

C. BIBLIOGRAFIA

Índice geral

Parte **A**

INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

A. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

I. Justificação do tema

Os defeitos ósseos do complexo maxilo-facial constituem uma das problemáticas mais prementes em Medicina Dentária. Recriar o osso perdido ou reabsorvido, é uma das grandes preocupações do Médico Dentista, necessitando muitas vezes da aplicação de um biomaterial que permita uma boa regeneração óssea e tecidual. Nesta área, os materiais de substituição óssea constituem uma das mais comuns e antigas formas de terapia regenerativa^{1, 2}.

Até ao presente não foi concebido nenhum material sintético que reúna as propriedades e capacidades do tecido ósseo. Considerando que para uma boa regeneração óssea é desejável que o material de substituição possua propriedades físicas, químicas e mecânicas semelhantes às do tecido a reparar, facilmente se compreende que o próprio tecido ósseo constitua uma solução tentadora e quase sempre a melhor.

Com o objectivo de promover modalidades biológicas que possam estimular a regeneração óssea, têm vindo a ser desenhadas várias estratégias biomiméticas recorrendo à utilização de materiais o mais análogos possíveis à matriz óssea, culminando com o desenvolvimento de matrizes minerais naturais, enriquecidas com moduladores biológicos. Nesta perspectiva e deste esforço de optimização, surgiu um material particulado que representa a combinação de uma matriz mineral anorgânica de origem bovina, (ABM), à qual está ligado irreversivelmente um peptídeo sintético (P-15), especificamente envolvido na estimulação da migração, adesão e proliferação celular de osteoblastos e fibroblastos^{3, 4}.

Recentemente e numa tentativa de melhorar o manuseamento clínico dos materiais, ou controlar a migração daqueles em partículas optimizando a sua eficácia clínica, foram desenvolvidas novas formulações deste material, recorrendo a veículos transportadores das partículas de ABM/P-15. A possibilidade de injectar o produto no defeito, mantendo-o no local desejado, sem necessidade de hidratação e compactação, representa um salto qualitativo importante nas propriedades de manuseamento deste material de enxerto ósseo. Porém, estas formulações apresentam um nível de evidência científica reduzido relativamente à avaliação das suas potencialidades

regenerativas, não estando suficientemente esclarecidas assentando sobretudo em estudos *in vitro*.

Deste modo, o trabalho experimental apresentado neste estudo propõem-se avaliar *in vivo*, no coelho, a eficácia e desempenho biológico de novas gerações de materiais de enxerto ósseo biomiméticos, tendo por base um xenoenxerto particulado e enriquecido com um modulador biológico (ABM/P-15).

Este trabalho foi concebido com o objectivo de analisar o processo de osteointegração e o potencial de regeneração óssea do ABM/P-15, num defeito ósseo de contenção física, comparando a formulação convencional de partículas isoladas, sem qualquer veículo de transporte, com novas formulações contendo diferentes sistemas de transporte e diferentes concentrações de partículas. Neste contexto, foram utilizados como veículos um hidrogel de carboximetilcelulose e glicerol, um hidrogel de hialuronato de sódio e ainda uma forma liofilizada deste último. Em paralelo, foi ainda utilizada uma formulação de osso cortical granulado e desmineralizado suspensa, também, numa matriz de hialuronato de sódio, obtida de animais da mesma espécie do modelo experimental, funcionando, pois, como um aloenxerto.

Assim, os objectivos deste estudo experimental visaram essencialmente responder às seguintes questões tendo por base o comportamento biológico das diversas formulações nos processo de regeneração óssea recorrendo a estudos histológicos:

1. Será que as diferentes formulações (tendo por base diferentes veículos de transporte) podem influenciar significativamente a eficácia do ABM/P-15?
2. Será que as diferentes características físicas (modo de apresentação) dos veículos contribuem para a sua diferente performance?
3. Será que a diferente concentração de partículas/ espaçamento interfere na eficiência destas formulações?
4. Será que (utilizando o mesmo veículo de transporte) podemos comparar a eficácia de partículas de matriz óssea desmineralizada em relação às não desmineralizadas?

A avaliação dos processos de cicatrização óssea assentou essencialmente, como já foi referido, em estudos de índole histomorfológica,

realizados em microscopia de luz e em análises histomorfométricas das lâminas histológicas, com o respectivo tratamento estatístico.

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

Pretende-se dar continuidade aos trabalhos anteriormente realizados pelo grupo em que estamos integrados, contribuindo com mais alguns dados em relação ao comportamento biológico de novas formulações e novas estratégias em regeneração de tecidos recorrendo a materiais de enxerto ósseo.

II. Planificação e apresentação do trabalho

Esta dissertação encontra-se organizada em três partes distintas. Na primeira parte (*Parte A*), após a justificação do tema escolhido e depois de enunciados os objectivos procede-se a uma breve exposição sobre a "Dinâmica, remodelação e regeneração do tecido ósseo". De facto, pareceu-nos vantajoso começar com uma descrição sucinta da histofisiologia do tecido ósseo e dos processos de remodelação óssea, visando proporcionar uma perspectiva geral da cinética e interligação dos processos biológicos e moleculares envolvidos no funcionamento e dinâmica do tecido ósseo. Pretende-se com esta revisão estabelecer uma base geral de apoio morfofuncional aos estudos experimentais desenvolvidos, e apresentados no capítulo seguinte.

A segunda parte B (*Parte B*), que constitui a essência desta tese, compreende o "Estudo experimental em modelo animal" das diferentes formulações em estudo. Depois de uma descrição pormenorizada dos materiais utilizados e das metodologias aplicadas procede-se à apresentação dos resultados.

Por se tratar de um trabalho essencialmente de índole histológica e como a microscopia é uma ciência de imagens, não quisemos deixar de documentar este estudo com numerosas imagens microfotográficas do material em análise.

Optámos também por dar particular desenvolvimento aos resultados das formulações que nos pareceram de maior eficácia e aplicabilidade no futuro.

Finalmente, apresenta-se uma discussão e interpretação global dos resultados, incluindo uma análise comparativa da eficácia biológica das diferentes formulações, com base na qualidade e quantidade do novo tecido ósseo formado. Por último, são enunciadas as principais conclusões e apresentadas algumas hipóteses de trabalho futuro, de questões que ficaram em aberto, finalizando com um resumo do conjunto dos estudos experimentais realizados.

A última parte do trabalho (*Parte C*) engloba toda a bibliografia consultada.

III. Dinâmica, remodelação e regeneração do tecido ósseo

1. Introdução

O tecido ósseo constitui um notável material de construção de natureza biológica com a singular capacidade de edificar estruturas muito resistentes que se remodelam, reparam e regeneram a si próprias⁵.

O tecido ósseo é uma forma especializada de tecido conjuntivo constituído por células (2%) e por uma matriz extracelular (98%) de natureza orgânica, muito organizada e fortemente mineralizada, com importantes funções de sustentação e protecção. A mineralização da matriz confere a este tecido uma grande dureza enquanto, a fase orgânica lhe permite uma certa flexibilidade e elasticidade, o que o torna muito resistente às solicitações mecânicas^{6,7}.

A matriz óssea representa, também, o maior reservatório de iões minerais do organismo, particularmente de cálcio e fósforo, participando activamente na manutenção da homeostase dos níveis de cálcio no sangue e, conseqüentemente, em todos os fluidos dos tecidos, condição essencial para a preservação da vida. Em condições fisiológicas, as funções de suporte estrutural e reserva metabólica estão num equilíbrio estável e no caso de existir uma alteração deste equilíbrio, a função estrutural é sempre sacrificada em favor da metabólica⁷⁻⁹.

Quando lesados, os ossos têm capacidade regenerativa, ou seja, o processo de reparação óssea é efectuado através de formação de osso novo e não pela formação de tecido fibroso desde que se cumpram determinados requisitos.

Apesar do aspecto aparentemente inerte, os ossos são estruturas plásticas altamente dinâmicas que crescem, se remodelam e se mantêm activos durante toda a vida do organismo. Esta permanente reorganização, constituindo contínuas pequenas mudanças em direcção ao equilíbrio deixa marcas na estrutura que são verdadeiros arquivos de informação⁵.

A formação, modelação e remodelação do tecido ósseo é levada a cabo por diversas células ósseas, que assumem várias formas e funções e que, no seu conjunto, constituem a série osteoblástica e a série osteoclástica^{6,10}.

A actividade destas células está, contudo, sujeita à acção de numerosos factores de regulação, situados quer a nível sistémico quer a nível

local, sintetizados, neste último caso, tanto pelas próprias células como pelas células da linha hematopoiética e pelas células do sistema imunitário presentes no microambiente ósseo ^{6, 8, 11, 12}. Estes factores medeiam, pelo menos parcialmente, os efeitos dos estímulos mecânicos ^{13, 14}.

Para que a massa óssea se mantenha constante e para que as células tão diversas como os osteoblastos e osteoclastos estejam, sob um ponto de vista funcional, tão intimamente associadas no tempo e no espaço, é necessária a existência de uma completa coordenação e integração dos eventos celulares, que caracterizam o processo de formação / reabsorção óssea, de modo a manter-se um equilíbrio perfeito ^{14, 15}. O controlo molecular destes processos não está, ainda, totalmente esclarecido, mas assenta num sistema integrado de citocinas designado por eixo RANKL/RANK/OPG* ¹⁶.

2. Células do tecido ósseo

O tecido ósseo é, sob um ponto de vista celular, um tecido bastante económico, sendo constituído, apenas, por duas linhas celulares representadas pelos osteoblastos e osteoclastos ^{5, 15}.

As populações de células que constituem o tecido ósseo assumem diversas formas e designações, com base na sua diferente morfologia, actividade e localização em relação à matriz calcificada. Estas células podem ser agrupadas em duas séries diferentes: células da linha osteoblástica, responsáveis pelo processo de formação da matriz óssea e células da linha osteoclástica, relacionadas com a sua reabsorção ^{7, 17}.

2.1. Células da linha osteoblástica

As células da linha osteoblástica têm origem nas células mesenquimatosas indiferenciadas e pluriopotenciais, presentes no perióstio e no estroma da medula óssea ^{6, 7, 17}. Para além de células osteoblásticas, as células mesenquimatosas indiferenciadas podem também dar origem a células condroblásticas, fibroblásticas ou adiposas, em função da especificidade de diferentes factores indutores locais, de diferentes estímulos mecânicos e de diferentes condições de vascularização. Em relação a este último aspecto, está hoje perfeitamente demonstrado que em áreas ricamente vascularizadas a diferenciação das células com potencial osteogénico vai, naturalmente, conduzir ao aparecimento de osteoblastos e de uma matriz óssea. Mas, por

* RANK - receptor de activação do factor nuclear kappa B; RANKL - ligando para o receptor de activação do factor nuclear kappa B e OPG - osteoprotegerina.

outro lado, em regiões, onde a rede vascular não esteja suficiente desenvolvida, existindo uma baixa de tensão de oxigénio, as células osteoprogenitoras podem diferenciar-se em condroblastos e originar um tecido cartilágneo (situações muitas vezes observadas aquando da formação do calo ósseo, no processo de cicatrização das fracturas), ou mesmo em fibroblastos e dar origem a um tecido fibroso ^{7, 18, 19}.

As células da linha osteoblástica integram quatro sub-populações principais: os pré-osteoblastos, os osteoblastos maduros, as células de revestimento ósseo e os osteócitos, sendo todas elas consideradas como diferentes estádios funcionais da mesma célula. Uma série complexa de etapas de proliferação e diferenciação permite que as células mesenquimatosas pluripotenciais se transformem em osteoblastos maduros ^{8, 19, 20}.

Os pré-osteoblastos são considerados células precursoras, mas já envolvidas na diferenciação osteoblástica representando um estágio intermédio da diferenciação. Estas células encontram-se geralmente perto das superfícies de formação óssea, sob a forma de células alongadas, apresentando uma reduzida capacidade proliferativa e progressivamente vão adquirindo um fenótipo osteoblástico ^{6, 7}. O desenvolvimento embrionário e a diferenciação dos osteoblastos são controlados por factores de crescimento, como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), e o factor de crescimento de transformação β (TGF- β) que através de factores de transcrição vão activar genes associados a proteínas específicas dos estádios mais precoces da formação da matriz óssea ²¹. Os pré-osteoblastos expressam também alguns pró-oncogenes c-myc, c-fos, c-jun, que intervêm activamente na proliferação e diferenciação das células osteoblásticas jovens ^{8, 18, 20}.

Os osteoblastos tornam-se maduros quando atingem a superfície óssea e apresentam-se, então como células cúbicas, altamente polarizadas, dispostas em paliçada (frequentemente designadas por epitélio osteóide), actuando como uma barreira que controla o fluxo de iões para dentro e para fora do tecido ósseo ²² (Fig. 1). Entre estas células formam-se junções comunicantes (*gap junctions*), que são fundamentais para a ligação e comunicação entre células adjacentes, permitindo o movimento de moléculas, como o Ca^{2+} ^{8, 22, 23}.

Os osteoblastos maduros são células sem capacidade de divisão mas metabolicamente muito activas. Apresentam, de facto, características ultra-estruturais típicas da sua função, ou seja, síntese e secreção de proteínas de exportação, evidenciando um aparelho de Golgi e um retículo endoplasmático

rugoso, bem desenvolvido e numerosas mitocôndrias ^{6, 24, 25}. Entre as proteínas sintetizadas pelos osteoblastos estão o colagénio tipo I e proteínas não colagénicas como a osteopontina, a osteocalcina e a sialoproteína óssea entre outras. Os osteoblastos produzem uma forte reacção química para a fosfatase alcalina (localizada na membrana celular), que desaparece quando as células se tornam enclausuradas na matriz, como osteócitos ^{7, 22, 26}. Ainda neste contexto, é necessário sublinhar o facto de que os osteoblastos sintetizam muitos e variados factores de crescimento, que ficam incorporados na matriz óssea, desempenhando um papel determinante, tanto na formação de tecido ósseo como na diferenciação e na actividade dos osteoclastos ^{8, 18, 26}.

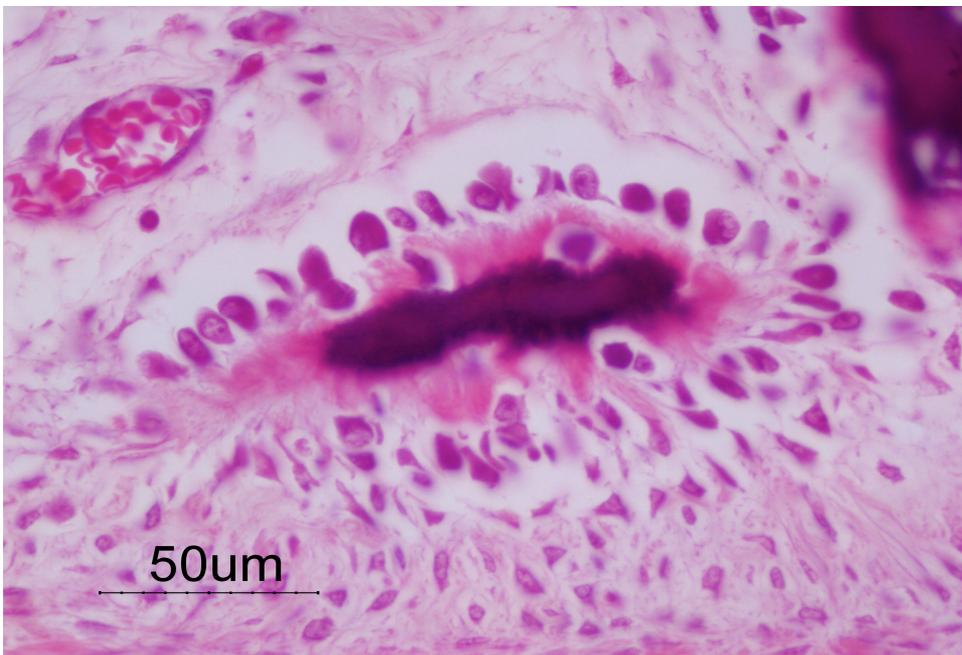


Figura 1. Osteoblastos na periferia de uma trabécula óssea em formação. É visível, também, a presença de osteóide e de matriz mineralizada.

Os osteoblastos apresentam numerosos prolongamentos citoplasmáticos, que se projectam para a matriz óssea e que se interdigitam e comunicam com os prolongamentos dos osteócitos. Este facto permite o estabelecimento de importantes relações entre os osteoblastos activos na superfície óssea e os osteócitos que estão no seio da matriz calcificada ²⁷.

Os osteoblastos são pois, como já foi referido células muito activas, sendo responsáveis pela síntese da matriz, mineralização da matriz e também pelos processos de angiogénese, fundamentais para levar a cabo todas estas actividades. Estas células funcionam ainda com receptores e transmissores de

sinais para a remodelação óssea ^{7, 8, 18}.

Com efeito, à excepção da calcitonina, todas as hormonas e muitos factores de crescimento e citocinas que controlam a reabsorção do tecido ósseo, têm receptores nos osteoblastos¹⁸. Tudo indica que são as células osteoblásticas e não os osteoclastos que desencadeiam o processo de reabsorção óssea ²⁴.

Terminado o período de secreção activa, os osteoblastos achatam-se e transformam-se em células de revestimento ou em osteócitos, ou podem desaparecer do local de formação óssea, por um mecanismo provável de apoptose ^{28, 29}.

As células de revestimento ósseo formam uma camada contínua de células achatadas que reveste a maior parte da matriz calcificada, situando-se ao longo das superfícies do endóstio. Estas células apresentam uma capacidade de síntese reduzida, sendo consideradas quiescente ou de repouso ²⁰.

O osteoblasto ao envolver-se completamente na matriz óssea calcificada, fica aprisionado em cavidades denominadas por lacunas ou osteoplastos, diferenciando-se deste modo e formando os osteócitos ⁷.

Os osteócitos são células altamente ramificadas, localizadas nas suas lacunas ósseas, comunicando entre si e com as células da superfície óssea, através de uma rede de canálculos, que contêm os seus numerosos prolongamentos citoplasmáticos e que permitem a passagem de nutrientes e de muitas outras substâncias. Os nutrientes difundem-se a partir dos vasos sanguíneos, localizados no interior dos canais de Havers, através dos canálculos para as lacunas ¹³. Os prolongamentos celulares dos osteócitos situados no interior dos canálculos encontram-se, também, interligados por junções comunicantes (*gap junctions*), formando uma rede que é conhecida como *spider's web of bone* ³⁰. A vida do osteócito depende deste processo de difusão de nutrientes e a vida da matriz óssea depende do osteócito ^{8, 13, 31, 32}. É importante sublinhar que o osteócito tem capacidade para reabsorção da matriz óssea com consequente libertação de cálcio. Este mecanismo é conhecido como osteólise osteocítica ²².

Devido ao elevado número (sendo as células mais numerosas) e complexa organização e disposição, os osteócitos estão numa situação privilegiada para captar as alterações da matriz óssea e os estímulos mecânicos que actuam sobre o osso (mecanossensores)^{13, 29, 33-35}. Estas informações são depois transmitidas às células da superfície para que estas

possam activar os processos de remodelação óssea, sempre que estes sejam necessários ³⁶. Seeman ³⁵ descreve desta forma interessante o papel do osteócito no processo de remodelação *"in the cellular symphony of bone remodelling the osteocytes is one the most important members of the orchestra, if not the first violinist or conductor"*.

2.2. Osteoclastos

Os osteoclastos desempenham uma função essencial na remodelação e na renovação do tecido ósseo. Este processo envolve a remoção de matriz óssea e a sua substituição por um novo tecido ósseo ³⁷.

Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas (Fig. 2), que têm como função principal o controlo da homeostase do cálcio através da reabsorção de matriz óssea. Estas células podem ser observadas nas superfícies do endóstio, nos canais de Havers e, ocasionalmente, na superfície do perióstio nas áreas de tecido em vias de reabsorção ^{10, 19}.

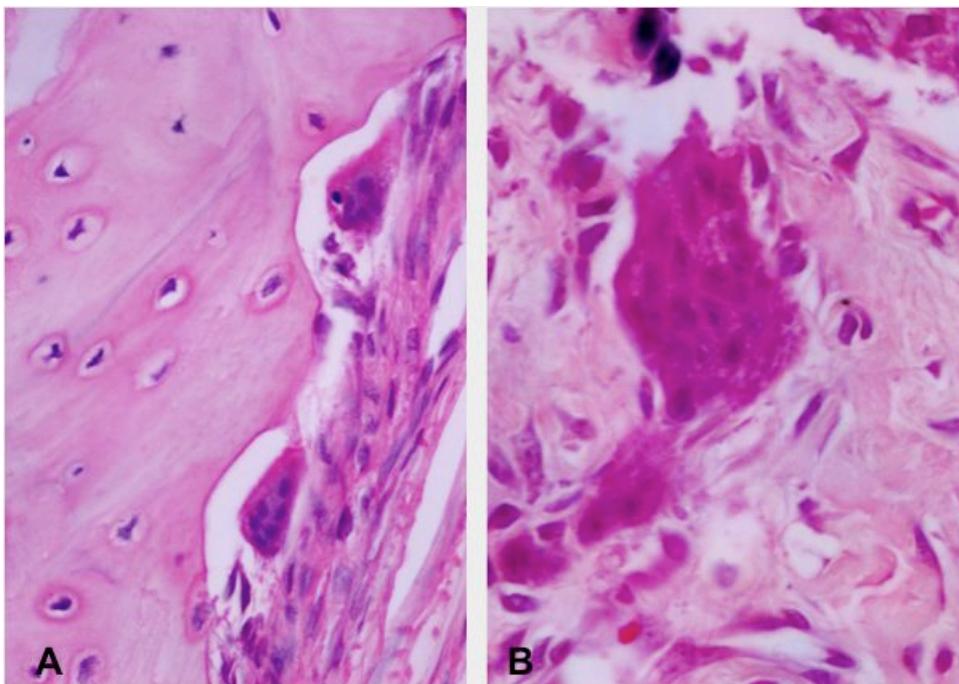


Figura 2. A) Osteoclastos em lacunas de Howship localizados no perióstio (400 X no original); **B)** Aspecto de um osteoclasto mostrando uma grande densidade de núcleos (400 X no original).

Na linha osteoclástica podemos incluir os monócitos circulantes, os presentes na medula óssea, os pré-osteoclastos e osteoclastos. A osteoclastogénese é estimulada por um factor produzido pelos osteoblastos e pelas células do estroma da médula óssea, designado por factor estimulador da colónia de monócitos / macrófagos (CSF-M). Este factor é necessário, ainda que não suficiente para a sobrevivência e proliferação dos precursores dos osteoclastos ^{8, 18}.

A diferenciação dos osteoclastos, a partir dos seus precursores monucleares, desencadeia uma série de etapas que compreendem sucessivamente, uma fase proliferativa dos precursores, o aparecimento de um fenótipo citoplasmático e membranas específicas do osteoclasto, atracção para a matriz calcificada, fusão em células multinucleadas e, finalmente, a aquisição da capacidade de reabsorção própria do osteoclasto maduro³⁸. Esta célula vai expressando vários genes essenciais para a sua função, incluindo o pró-oncogene c-src e vários componentes da bomba de protões ^{8, 39}.

As principais características funcionais do osteoclasto são: a sua íntima adesão à matriz óssea (de modo a criar um compartimento estanque de reabsorção), a acidificação deste compartimento (condição indispensável para a solubilização do mineral ósseo) e finalmente uma intensa secreção de enzimas proteolíticas (para degradar a matriz orgânica restante). A sua contituição ultra-estrutural reflecte a sua funcionalidade e, assim, o osteoclasto apresenta uma nítida polaridade, mostrando uma região apical de reabsorção, orientada para a matriz adjacente e uma região baso-lateral, orientada para o micro ambiente medular ^{7, 20}. Os núcleos estão normalmente situados na porção basal da célula, ficando, assim mais distantes da superfície óssea. Na região mais apical pode observar-se uma zona de citoplasma rica em microfilamentos, mas desprovida de organelos, denominada, por isso "zona clara", responsável pela adesão transitória à superfície da matriz óssea, demarcando os limites da área a ser reabsorvida. A zona clara envolve uma região que apresenta numerosos pregueamentos citoplasmáticos digitiformes, que se estendem até à superfície óssea. É neste área que se processa a secreção ácida e a libertação de enzimas proteolíticas ^{5, 8}.

A superfície óssea, que está a ser reabsorvida, apresenta a forma de uma cripta, ou lacuna recebendo a designação de lacuna de Howship. A adesão do osteoclasto à matriz realiza-se por intermédio de integrinas, que se ligam especificamente a certas proteínas de adesão existentes na matriz, como a trombospondina, osteopontina e sialoproteína, através de uma

sequência de reconhecimento presente nestas proteínas, constituída por três aminoácidos: arginina-glicina-ácido aspártico, conhecida pela sigla RGD ^{5, 20, 39}.

A reabsorção propriamente dita é um processo organizado e sequencial constituído por duas fases consecutivas. A primeira fase consiste num processo de acidificação do compartimento atrás mencionado, através da produção de prótons (H^+), provocando a dissolução dos cristais de hidroxiapatite presentes na matriz óssea adjacente. Numa segunda fase, tem lugar a degradação completa da matriz orgânica por acção das enzimas proteolíticas lisossómicas ^{5, 19}. Um dos marcadores característicos dos osteoclastos é a enzima lisossomal fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) ^{40, 41}.

O equilíbrio ácido-base do osteoclasto é mantido através de diversos mecanismos moleculares situados maioritariamente na membrana basolateral. Toda a sua actividade metabólica requer muita energia, sendo apoiada pelo grande número de mitocôndrias presentes na célula. O osteoclasto pode, ainda, fagocitar alguns fragmentos de matriz e proceder à sua digestão intracelular, sendo, por vezes, possível observar no seu citoplasma a presença de vacúolos citoplasmático e lisossomais secundários ^{5, 17, 20}.

É provável que o ião cálcio desempenhe um papel importante, tanto na activação como na inactivação dos osteoclastos. A acumulação de cálcio no osteoclasto e no microambiente em seu redor irá, certamente, influenciar o seu citoesqueleto, conduzindo ao desprendimento do osteoclasto e inibição do seu processo de reabsorção ^{7, 22}.

Não se conhece, ainda, o que sucede aos osteoclastos, uma vez completa a sua actividade de reabsorção, não esquecendo, no entanto, que são células móveis que se deslocam ao longo das superfícies ósseas. Certos trabalhos sugerem, que sofrem processo de apoptose ^{28, 42}.

De realçar, por último, um estudo recente, de Karsdal et al, ⁴³ que refere que os osteoclastos produzem um factor que estimula, por si só, a formação óssea. Este factor não deriva da actividade osteoclástica de reabsorção da matriz óssea, mas actua directamente e de forma anabólica nos pré-osteoblastos. Este trabalho vem mais uma vez chamar atenção para a íntima relação e associação entre osteoblastos e osteoclastos.

3. Matriz extracelular

3.1. Fase orgânica

A matriz orgânica do tecido ósseo (Fig. 3) é constituída essencialmente por colagénio tipo I (90%). O colagénio tipo I é uma proteína que apresenta uma estrutura quaternária caracterizada por três cadeias helicoidais entrelaçadas (duas $\alpha 1$ e uma $\alpha 2$)²⁰. As triplas hélices agrupam-se formando moléculas de tropocolagénio (Fig 4) que se dispõem segundo um padrão característico, com moléculas paralelas mas desencontradas, e regularmente espaçadas entre si, unidas por fortes ligações intra e inter-moleculares^{7, 22}.

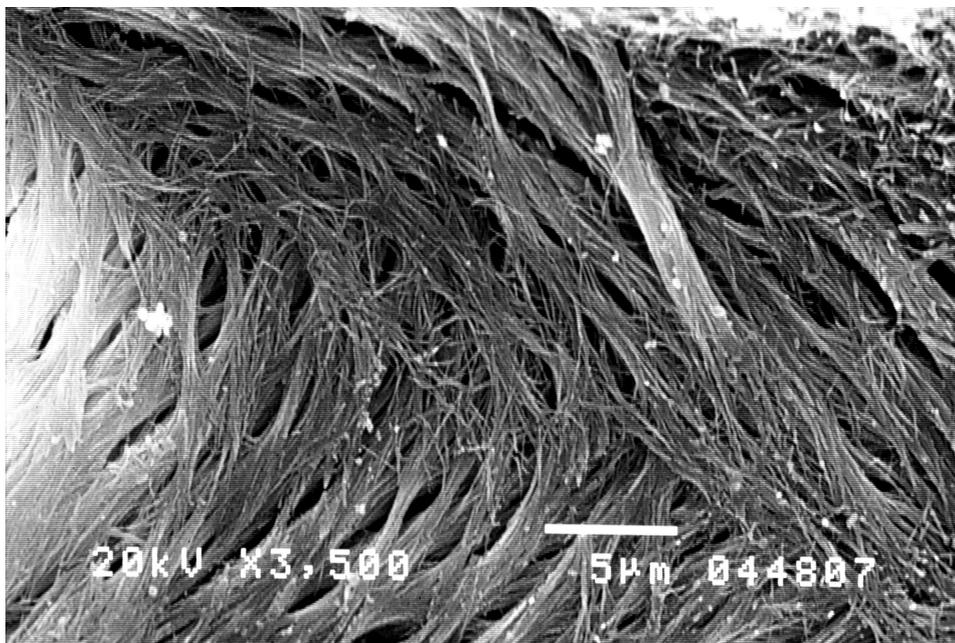


Figura 3. Microfotografia em Microscopia Eletrônica de Varrimento (MEV) do componente colagénico da matriz óssea. *

As fibrilhas de colagénio, resultantes da polimerização das moléculas de tropocolagénio, agrupam-se, por sua vez, em fibras de colagénio. As fibras, as fibrilhas e as moléculas de colagénio estão orientadas de acordo com as principais linhas de força a que a estrutura óssea está submetida⁴⁴.

Os espaços entre as moléculas de tropocolagénio que compõem as fibrilhas constituem os locais de eleição para a formação dos primeiros cristais de hidroxiapatite (Fig 4).

* Cortesia da Eng.^a Gabriela Martins e do Inst. Pedro Nunes

Deste modo, a matriz orgânica representa uma importante base molecular e estrutural como armação ou molde para a deposição do componente inorgânico ⁴⁴.

A matriz óssea contém, ainda, proteoglicanos e uma grande variedade de proteínas não colagénicas (osteocalcina, fibronectina, osteonectina, trombospondina, osteopontina e sialoproteína óssea), quase sempre associadas ao processo de mineralização que, embora muito pequenas quantidades (5%), são essenciais para a ligação do colagénio aos cristais de hidroxiapatite ^{8, 22}.

A matriz óssea é também uma fonte de factores de crescimento e citocinas que regulam grande parte da actividade e dinâmica do tecido ósseo²⁰. Muitos destes factores são sintetizados pelos osteoblastos, encontrando-se na matriz sob uma forma inactiva, dado que se encontram ligados a outras moléculas. Aquando dos processo de reabsorção e degradação, estas moléculas tornam-se activas e indispensáveis para um funcionamento integrado do tecido ósseo. Alguns factores e citocinas provêm também de células do sistema hematopoiético, estando presentes e funcionantes no microambiente ósseo ^{8, 25, 45, 46}.

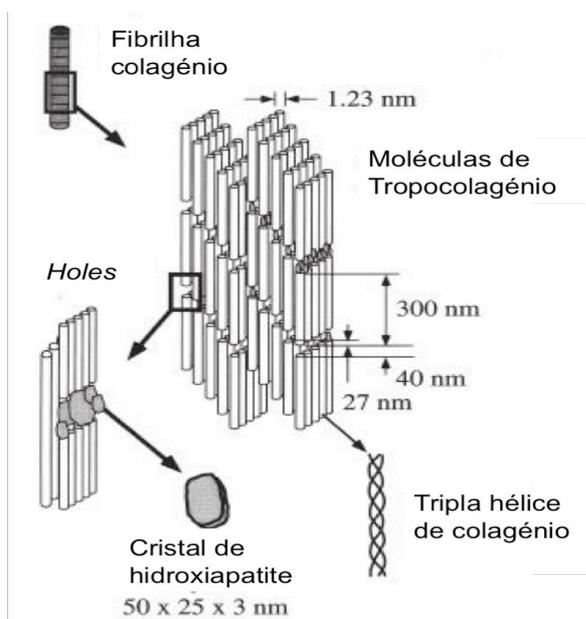


Figure 4. Disposição das moléculas de tropocolagénio e dos cristais de hidroxiapatite da matriz óssea. Os espaços entre as moléculas de tropocolagénio ("Holes") representam locais de eleição para a nucleação dos primeiros cristais de hidroxiapatite (*Adaptado de Rho, Kuhn-Spearing et al. 1998* ⁴⁴).

3.2. Fase inorgânica

O componente mineral da matriz óssea consiste principalmente em fosfatos de cálcio, que se apresentam sob a forma de cristais de hidroxiapatite (Fig. 5*), depositando-se sob controlo celular na matriz orgânica^{25, 47}.

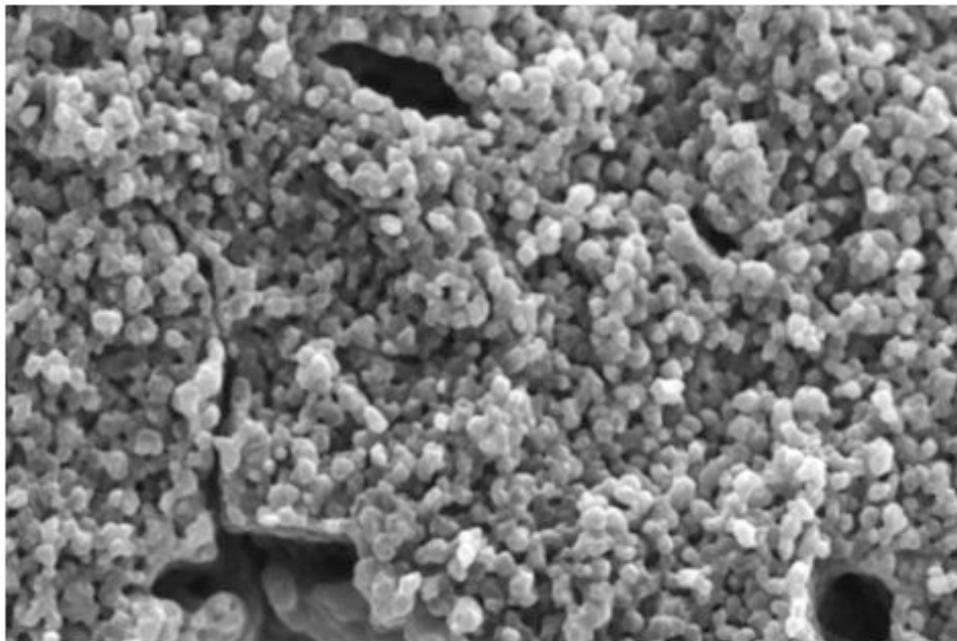


Figura 5. Aspecto em MEV da organização e distribuição dos cristais de hidroxiapatite da matriz óssea. São também visíveis algumas lacunas e canáliculos ósseos (1500 X no original).

A hidroxiapatite presente no tecido ósseo é um composto mineral de fórmula geral $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ com 200 a 400 Å de comprimento com uma estrutura cristalina hexagonal^{48, 49}. No aspecto termodinâmico, as apatites representam as estruturas mais estáveis de entre os fosfatos de cálcio, sendo provavelmente o produto final de muitas reacções^{25, 44}.

Habitualmente, as apatites de origem natural (hidroxiapatite biológica) são deficientes em cálcio sendo geralmente enriquecidas com outros iões, nomeadamente com os iões carbonato (CO_3^{2-}), que podem representar 3 a 8% da fase mineral do osso⁵⁰. A incorporação de outros elementos (Mg^{2+} , F^- e Cl^-) na hidroxiapatite contribui para um menor grau de cristalinidade. Ao longo da vida, a ocorrência de substituições vai diminuindo e a estrutura da hidroxiapatite óssea vai-se aproximando cada vez mais da sua forma

* Cortesia da Eng.^a Gabriela Martins e do Inst. Pedro Nunes.

estequiométrica, ficando cada vez mais cristalina ⁴⁴. Este facto contribui para que a remodelação do tecido ósseo não se processe com a mesma velocidade da observada na juventude ³⁵.

A organização molecular e supra molecular da matriz colagénica constitui um molde para a deposição do componente mineral, indo determinar a eficácia do processo de mineralização (Fig. 5). A arquitectura da fase mineral do osso, tal como a matriz de colagénio, forma uma malha tridimensional contínua, organizada em estruturas fibrilares acompanhado de perto a disposição e arranjo característico das fibras de colagénio. Nesta organização encontram-se ainda fortes ligações intercristais capazes de assegurar e manter a estrutura fibrilar mesmo depois de destruído o suporte proteico⁴⁹. Assim, o osso não poderá mais ser considerado meramente como um material fibroso reforçado por cristais minerais, podendo talvez ser "olhado" como uma matriz mineral reforçada por fibras de colagénio, ou então como uma rede composta e interpenetrante de colagénio e fase mineral. Assim sendo, cada uma das fases poderia servir de molde para formação da outra. Este interessante arranjo supramolecular da fase mineral, apresentando uma disposição fibrilar dos cristais, em tudo semelhante à matriz colagénica, reflecte uma íntima interacção mineral/colagénio, conferindo, deste modo, a este tecido propriedades *sui generis* ^{25, 51}. Esta organização nunca se encontra nas hidroxiapatites sintéticas ⁵².

4. Mineralização da matriz

O processo de mineralização não consiste apenas na combinação dos iões cálcio e fosfato na matriz orgânica, sob a forma de fosfato de cálcio, mas é o resultado da interacção de muitos factores biológicos e físico-químicos que agiriam em conjunto estimulando ou inibindo esse mecanismo altamente complexo ^{22, 23, 25}.

Até cerca de metade da década de 60, a mineralização da matriz óssea era considerada um mero fenómeno físico-químico, controlado por mecanismos próprios da matriz. Pouca ou nenhuma importância era dada à participação celular neste fenómeno. Apenas no final desta década foi descrita, na matriz orgânica da cartilagem em calcificação, a presença de uns "fragmentos plasmáticos", contendo cristais de mineral. Estas estruturas, denominadas vesículas da matriz, foram também observadas no tecido ósseo embrionário e na dentina do manto, contendo sempre cristais de mineral, antes que fosse possível detectá-los na restante matriz orgânica ^{22, 23, 25, 51, 53, 54}.

As vesículas matriciais, são pequenas porções arredondadas, com um diâmetro aproximado de 100 nm, envolvidas por uma membrana em tudo idêntica à membrana plasmática, que se desprendem da superfície de osteoblastos, condroblastos e odontoblastos. A célula desenvolve, inicialmente, uma espécie de bolbos na sua superfície que, rapidamente, se destacam, ficando na matriz como estruturas independentes ^{22, 25, 51, 53-57}.

No tecido ósseo as vesículas são encontradas apenas no início da mineralização do osso embrionário ou imaturo, não estando presentes no tecido lamelar. Apenas as superfícies apicais dos osteoblastos, orientadas para o tecido osteóide, podem libertar vesículas para a matriz extracelular. Este processo de vesiculação, de natureza polar, não implica a morte ou desintegração celular ^{22, 23, 25, 58}.

A vesícula da matriz recoberta por membrana constitui um microcompartimento que permite a criação de um ambiente privilegiado para a precipitação e preservação dos primeiros cristais de fosfato de cálcio. Deste modo, íões cálcio e fosfato vão sendo acumulados no interior das vesículas matriciais, atingindo níveis que levam à precipitação de fosfato de cálcio, presumivelmente com uma fase inicial amorfa que se transforma, depois, numa hidroxiapatite insolúvel sob a forma de placas cristalinas muito finas ^{22, 25, 57}.

As membranas das vesículas matriciais, com importância chave nos mecanismos de mineralização, contêm uma elevada concentração de fosfolípidos ácidos (com afinidade para o cálcio), fosfatases alcalinas (capazes de hidrolisar ésteres de fosfato), anexinas (com capacidade para funcionar como canais de cálcio), anidrase carbónica (com um importante papel no controlo do pH), e proteases e fosfolipases (responsáveis pelo colapso da vesícula quando completamente mineralizada) ^{22, 25, 53, 55, 58, 59}.

Após a formação destes cristais minerais iniciais, que actuam como verdadeiras sementes, está praticamente finalizado o papel das vesículas. A energia requerida para desencadear o fenómeno de iniciação e formação de cristais minerais é muito maior do que a necessária para o seu posterior crescimento. Uma vez formados os primeiros cristais de fosfato de cálcio, o avanço da mineralização torna-se mais fácil, pois os níveis de supersaturação dos fluidos extracelulares são suficientes para manter o processo ^{22, 55, 59}.

Os mecanismos que ocorrem e controlam a passagem dos cristais de hidroxiapatite, do interior das vesículas para a restante matriz, continuam, ainda, pouco conhecidos. Estudos realizados em microscopia electrónica mostraram que os cristais se espalham gradualmente, para além dos limites

das vesículas, estabelecendo contacto com os componentes fibrilares e interfibrilares da matriz ^{5, 22, 25}.

A deposição de mineral parece, pois, prosseguir independentemente das vesículas matriciais. Com efeito, quando todas as vesículas matriciais estiverem calcificadas, o processo de mineralização progride para as fibrilhas de colagénio, e para as regiões interfibrilares expondo os cristais aos fluidos extravasculares, que como já foi referido, são supersaturados em iões de cálcio e fosfato, permitindo a proliferação axial e lateral dos cristais. Estes cristais podem servir de suporte para uma nova proliferação e formam uma fase mineral contínua ^{22, 44, 53, 58}.

Nas fibrilhas de colagénio, os espaços ("holes") entre as moléculas de tropocolagénio, atrás descritas, constituem locais de eleição onde são depositados os primeiros cristais minerais. Esta localização preferencial dos cristais de hidroxiapatite nos espaços intermoleculares existentes nas fibrilhas de colagénio parece residir no facto destes espaços representarem: a) um requisito geométrico tridimensional adequado, b) possuírem uma distribuição ideal de cargas eléctricas para os cristais de fosfato de cálcio poderem ser nucleados (os grupos carboxílicos pertencentes aos aminoácidos negativamente carregados formam um ambiente propício à ligação dos iões positivos de cálcio que integram a hidroxiapatite) e c) apresentam um volume necessário para que os cristais possam ser formados sem provocar ruptura das estruturas fibrilares. Ou seja, o volume, configuração, forma e carga eléctrica dos espaços intermoleculares determinam a localização organização e compactação dos cristais de hidroxiapatite na matriz óssea ^{5, 22, 25, 44, 55}.

A mineralização dos espaços intermoleculares das fibras de colagénio deverá ainda, e muito provavelmente, ser mediada por outras moléculas específicas da matriz que, interagindo com o colagénio, formariam complexos que facilitariam uma nucleação heterogénea dos cristais de mineral. Entre elas, incluem-se a osteocalcina, as fosfoproteínas, as fosfoforinas e as sialoproteínas que representam promotores *in situ* para a formação de apatite, potenciando a nucleação e a estabilização de fosfatos de cálcio. ^{22, 25}.

Em síntese, pode-se afirmar que a mineralização da matriz óssea, envolve duas fases distintas. Numa primeira fase, a vesicular, tem origem o primeiro núcleo mineral sobre a protecção do microambiente interno das vesículas matriciais. Numa segunda fase que é suportada, maioritariamente, por fenómenos físico-químicos e extracelulares onde tem lugar uma nucleação heterogénea, com base no arranjo altamente organizado nas moléculas de

tropocolagénio em associação com algumas proteínas não colagénicas^{51, 53, 55, 59}. Esta sequência repete-se em situações de reparação de fracturas ósseas e na formação de dentina reparadora²².

Apesar das células exercerem um papel preponderante e directo no processo de iniciação da deposição mineral, continuam a ter uma grande responsabilidade, ainda que indirecta, na regulação e propagação fibrillar da mineralização. De facto foram elas que sintetizaram a matriz colagénica e criaram um meio iónico no qual a mineralização pode ou não progredir^{22, 53, 58}.

Nos casos em que não são encontradas vesículas da matriz como no esmalte e no cimento, a mineralização depende da existência da dentina contígua já mineralizada, cujos cristais de apatite servem como centros nucleadores, nucleação secundária (induzida pela presença de cristais formados previamente)²². De facto, no esmalte jovem os primeiros cristais de hidroxiapatite são depositados em contacto directo com a dentina do manto, que neste estágio forma uma camada mineralizada contínua. Com efeito, por não serem observadas vesículas da matriz durante o início da mineralização do esmalte, acredita-se que sejam os cristais de fosfato de cálcio da dentina do manto os agentes nucleadores para desencadear este processo²⁵.

5. Dinâmica do tecido ósseo

O osso é uma estrutura plástica altamente dinâmica, que, durante toda a vida do organismo, está em permanente remodelação de modo a manter as propriedades mecânicas e metabólicas adaptadas aos diferentes estímulos a que está sujeito. A remodelação óssea representa um dos grandes princípios da fisiologia óssea como resposta a solicitações mecânicas^{60, 61}.

Este processo de remodelação não resulta apenas da actividade concertada de osteoclastos e osteoblastos com conseqüente reabsorção ou formação de osso. De facto, é um processo complexo, controlado pela interacção de forças mecânicas, hormonas sistémicas, citoquinas, prostaglandinas e factores de crescimento produzidos localmente¹⁸. Estes últimos, sintetizados, maioritariamente, pelas próprias células ósseas ou pelas células do microambiente envolvente, são libertadas sequencialmente à medida que a remodelação vai ocorrendo e actuam de uma forma autócrina ou parácrina, sendo provável que mediem, pelo menos parcialmente, os efeitos dos estímulos mecânicos e das hormonas^{14, 16, 62}.

Uma característica importante da sequência de remodelação óssea é a sua especificidade de localização. O processo de remodelação que ocorre numa

determinada área não tem ligação cronológica directa com a remodelação observada em qualquer outra área. Este facto leva a admitir que a remodelação óssea está sobretudo sob controlo de factores locais, gerados no microambiente de cada unidade ou área específica de remodelação ^{18, 63}.

6. Remodelação Óssea

Após o processo de ossificação e maturação do esqueleto embrionário, o tecido ósseo sofre modificações constantes, que são levadas a cabo, em focos bem localizados, por um conjunto de células denominadas por "Basic Multicellular Unit" (BMUs) ^{60, 61, 64}, constituindo uma resposta funcional.

Wolff, em 1892, foi quem primeiro propôs o conceito "a forma segue a função", no que se refere ao tecido ósseo ^{34, 65}. Segundo a lei descrita por Wolff, as características geométricas dos ossos e a distribuição de seus componentes são determinadas pela magnitude e direcção do *stress* funcional. Mais de um século depois, os parâmetros e factores endógenos e exógenos aos quais o processo de remodelação responde, não estão ainda suficientemente conhecidos. De qualquer forma, a lei de Wolff traduz-se pelas acções concertadas dos osteoclastos e osteoblastos ⁶⁶.

A remodelação óssea consiste num processo mediante o qual se elimina uma porção de tecido, substituindo-o por novo osso, com pouca ou nenhuma alteração da massa óssea. Deste modo, o processo de remodelação óssea compreende uma série ordenada de eventos que vão converter uma superfície óssea em repouso numa zona em remodelação, seguindo uma sequência imutável de activação – reabsorção – reversão – formação ^{60, 67}.

A activação compreende o reconhecimento de uma área precisa da superfície óssea e a sua preparação para o processo de remodelação, bem como o recrutamento dos precursores mononucleados dos osteoclastos. Na superfície óssea da zona que vai sofrer este processo verifica-se, logo no início da fase de activação uma retracção / afastamento das células de revestimento e a digestão enzimática da delgada camada de osteóide adjacente, expondo, deste modo, a matriz mineralizada para um mais fácil acesso dos osteoclastos. O início desta fase de activação parece ser da responsabilidade de citoquinas inflamatórias produzidas pelos osteócitos danificados localizados na área que ira ser sujeita a remodelação ^{60, 67}.

Na fase de reabsorção os osteoclastos cavam, no osso cortical, cavidades cilíndricas, designadas por cones de reabsorção (*cutting cones*), com cerca de 200 µm, determinando o diâmetro dos futuros sistemas de

Havers. No osso esponjoso, os osteoclastos cavam lacunas de contornos muito irregulares, com cerca de 50 µm de profundidade, denominadas por lacunas de Howship ^{60, 67}.

No local de reabsorção, aparecem a determinada altura células mononucleares com características de macrófagos e de pré-osteoblastos responsáveis pelo aparecimento de uma linha cimentante pobre em colagénio que define o limite ou fronteira entre osso velho e osso novo. Esta linha assinala também uma reversão da fase de reabsorção para o início do processo de reparação, caracterizando uma fase de inversão ^{60, 67}.

As linhas de reversão são marcas indeléveis na estrutura óssea traduzindo a intensa e constante remodelação que caracteriza este tecido. De facto são um sinal do seu passado dinâmico que o presente não deixa apagar (Figs. 6 e 7).

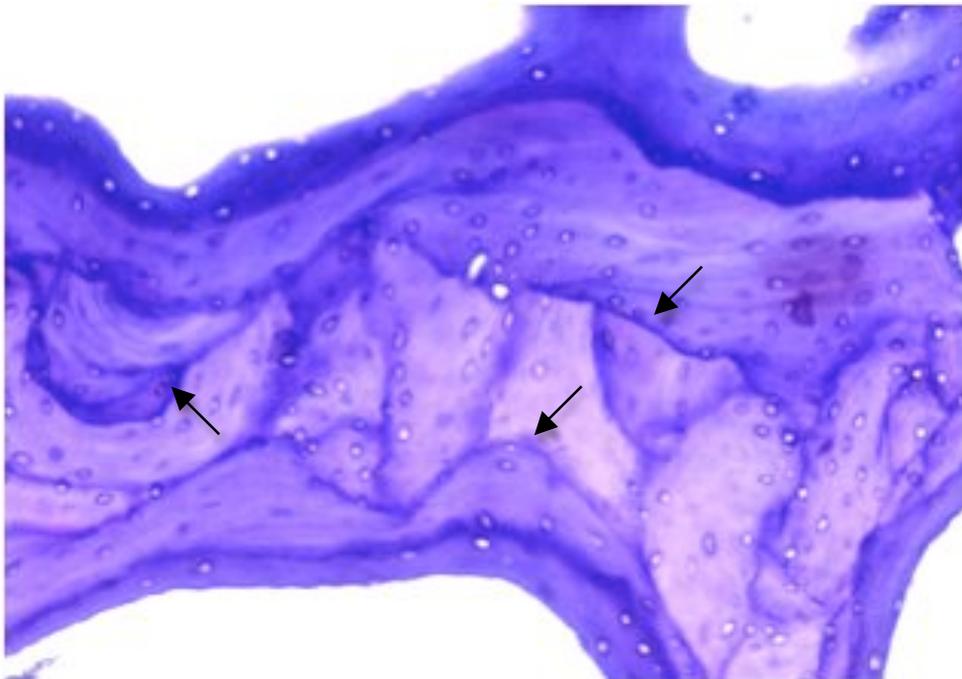


Figura 6. Linhas de reversão traduzindo uma intensa remodelação óssea visível ao nível do tecido ósseo esponjoso (setas).

Finalmente, inicia-se o preenchimento da cavidade de reabsorção, observando-se a chegada de muitas células da linha osteoblástica. O processo de proliferação e de diferenciação osteoblástica que caracteriza esta fase surge como resposta a factores libertados da matriz óssea, durante a fase anterior, de reabsorção, estando incluídos entre eles, o TGF-β, IGF, BMPs, PDGF e FGF ^{11, 16, 21, 38, 62}.

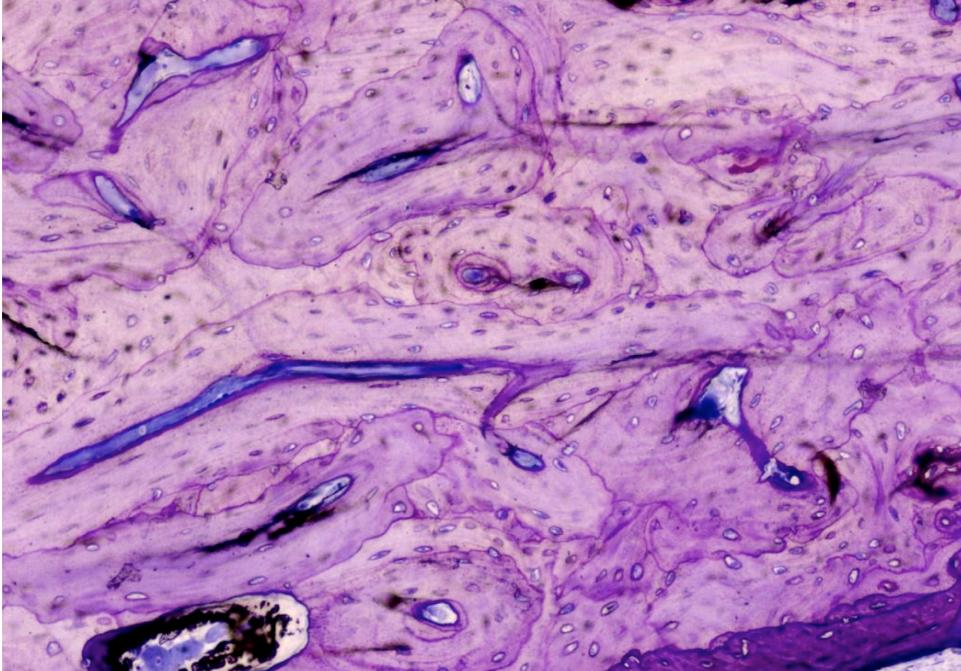


Figura 7. Linhas de reversão traduzindo uma intensa remodelação óssea ao nível do tecido ósseo cortical. São também visíveis sistemas de Havers, canais de Havers e canais de Volkman.

Esta fase de formação consiste, pois, na síntese de matriz osteóide e na sua posterior mineralização, tendo como resultado final a reconstrução da lacuna óssea de reabsorção ou de um cone de reabsorção (*cutting / filling cones*) com novo osso.

A fase de reabsorção óssea é bem mais rápida do que a de formação. Por exemplo, a quantidade de tecido ósseo reabsorvido num período de três semanas leva aproximadamente três meses para ser novamente formado^{16, 62}.

A reabsorção e a formação são fenómenos que estão intimamente acoplados, visto que o início da primeira estimula a actividade reparadora da segunda, de modo a que a reabsorção de uma certa quantidade de tecido ósseo seja substituída pela mesma quantidade de novo osso. A evidência desta interligação levou, nos últimos tempos, à procura de um factor específico que controlasse estas duas actividades, e que seria a chave fundamental do processo de remodelação óssea.

7. Sistema de citocinas RANKL/RANK/ OPG

No processo de remodelação óssea intervêm, como já foi referido, duas actividades opostas, mas complementares, estando intimamente associados no tempo e espaço: a formação de tecido, realizado pelas células da linha osteoblástica e a sua destruição ou reabsorção a cargo da linha osteoclástica. Este mecanismo complexo requerer uma completa coordenação e integração das actividades celulares que caracterizam este processo, de modo a manter um equilíbrio. O controlo molecular deste mecanismo não está ainda totalmente esclarecido sabendo-se, no entanto, que envolve: a) moléculas circulantes de natureza hormonal ou não, b) moléculas presentes na matriz extracelular sob uma forma inactiva mas que uma vez libertadas se tornam activas e c) moléculas produzidas localmente, tanto pelas células ósseas, como pelas células da linha hematopoética e células do sistema imunitário. Foi neste âmbito que recentemente foi identificado um sistema de citocinas que regula a homestasia óssea, envolvendo também o sistema imunitário e o sistema vascular ^{18, 68-70}. Da comunicação e integração das células do sistema imunitário e do sistema osteoarticular, compartilhando uma base comum, surgiu uma área emergente, de contornos mal definidos, mas de estreita articulação e sincronismo, denominada osteoimunologia ^{9, 18, 46, 63, 69-74}. Acredita-se que estes sistemas tenham tido um desenvolvimento paralelo no processo de evolução. A semelhança filogenética entre o sistema imunológico e osteoarticular resulta numa grande simbiose entre os dois, podendo ser regidos por mecanismos comuns.

Esta área de investigação assenta num eixo de regulação comum vulgarmente conhecido por RANKL/RANK/OPG, que constitui uma ponte molecular responsável pelo *crosstalk* e íntima relação entre o sistema imune e o metabolismo ósseo ^{70, 75, 76}. Este eixo coordena o processo de remodelação óssea fazendo o *coupling* entre osteoblastos e osteoclastos ^{14, 77, 78}. Em situações patológicas o processo de remodelação óssea sofre quase sempre um desvio para privilegiar a osteoclastogénese, conduzindo a um reforço da reabsorção óssea, relativamente à formação ^{46, 79-81}. De sublinhar ainda que o osteoclasto, células chave neste processo, possui pela sua ascendência algumas características imunológicas, ainda que a célula madura seja do tipo não inflamatório ⁸², pelo que a sua relação com este sistema não será de estranhar.

Os osteoblastos são um dos principais indutores da osteoclastogénese (Fig. 8) através de um mecanismo que envolve o contacto entre estas células e os precursores osteoclásticos. A activação das células osteoclásticas processa-se ao nível de uma molécula de superfície (receptor), presente na membrana do osteoclasto designada por RANK (receptor de activação do factor nuclear kappa B) ^{14, 24, 62, 77, 78}.

Por outro lado, os osteoblastos expressam na sua superfície uma outra proteína transmembranar conhecida por RANKL (ligando para o receptor de activação do factor nuclear kappa B). A interacção do RANKL (na superfície dos osteoblastos) com o seu receptor RANK (nas células precursoras de osteoclastos) determina um contacto célula-célula, que é necessário para a maturação dos osteoclastos induzindo a osteoclastogénese. Todavia, o RANKL pode também ser sintetizado pelas células dendríticas, linfócitos T e B, todos eles componentes do sistema imunológico ^{8, 18, 83}.

Os osteoblastos sintetizam ainda uma outra proteína, neste caso solúvel, a osteoprotegerina (OPG) com uma alta afinidade para o RANKL impedindo ou bloqueando a ligação do RANKL ao seu receptor RANK ⁸³. Por este mecanismo a OPG regula a população funcional dos osteoclastos, modulando o processo de osteoclastogénese, ao impedir a activação dos osteoclastos e deste modo, reduzindo a reabsorção óssea (Fig. 8).

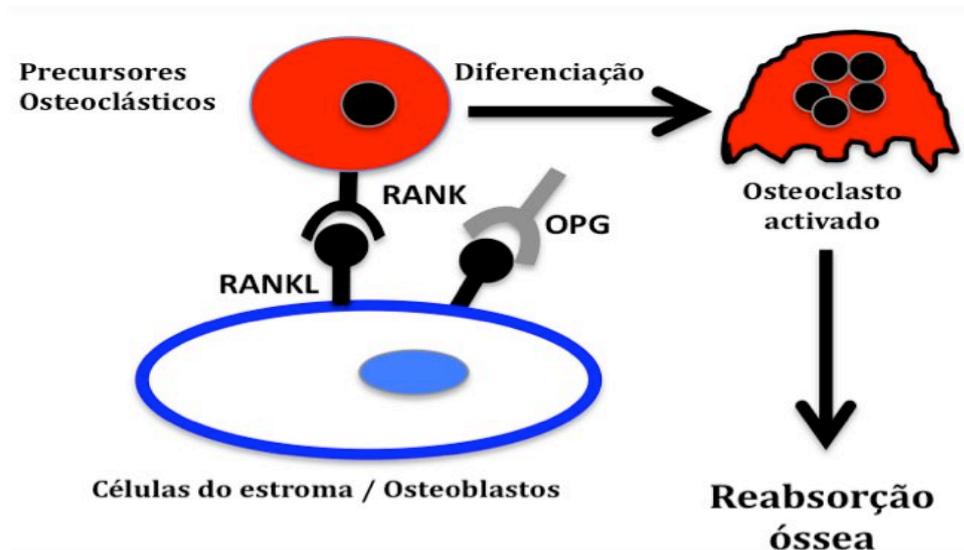


Figure 8. Esquema do processo de diferenciação dos osteoclastos (osteoclastogénese) através do sistema RANKL/RANK/OPG.

A hormona paratiroidea ou paratormona (PTH), principal hormona osteotrópica, regula o equilíbrio de cálcio no sangue ao estimular a libertação de cálcio da matriz mineralizada, através da activação metabólica dos osteoclastos ⁶. Todavia os osteoclastos não possuem receptores para a PTH. Assim, esta hormona actua sobre os osteoclastos de forma indirecta, tendo como mediadores as células da linha osteoblástica estimulando a expressão do RANKL ^{14, 84}. Por este mecanismo a quantidade de RANKL aumenta em relação à OPG, promovendo, deste modo, a osteoclastogénese. É, pois, através dos osteoblastos que a PTH exerce a sua actividade major de reabsorção da matriz óssea ⁸.

Também, as citoquinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 (IL-1), a interleucina 6 (IL-6) e o factor de necrose tumoral-alfa (TNF- α) activam directamente a osteoclastogénese, e a reabsorção óssea ^{18, 21, 81, 85}. De salientar, porém, que este mecanismo actua de forma semelhante mas independente do sistema RANK/RANKL/OPG e está na base da maior parte dos descolamentos das próteses da anca e das reabsorções ósseas associadas à periodontite crónica ^{11, 81, 86, 87}.

Facilmente se compreende que qualquer pequena modificação nesta tríade RANKL/RANK/OPG conduz a importantes alterações da fisiopatologia óssea ^{14, 18}.

Em jeito de conclusão e tendo em consideração o actual desenvolvimento da osteoimunologia pode afirmar-se que a dinâmica de remodelação óssea parece desenvolver-se tendo como ponto de partida e base de sustentação o sistema imunológico. É nesta filosofia que Roberts *et al.* ^{16, 62} afirmam "*remodeling of mineralized tissue is an inflammatory response to accumulated tissue damage*". Nesta perspectiva a figura 9 pretende ilustrar e fazer uma pequena sinopse do processo molecular e celular da reabsorção óssea "vivido" na frente de reabsorção de um cutting / filling cone, seguindo a tradicional sequência de activação - reabsorção - formação, via RANKL/RANK/OPG. O início e localização deste processo é induzido pelas citoquinas inflamatórias (prostaglandinas, IL-1 e outras) produzidas pelos osteócitos lesados. Estas citoquinas atraem, entre outras células do sistema imune, os linfócitos T e estimulam a produção de RANKL. Entretanto as células da linha osteoclástica, também provenientes da corrente sanguínea, chegam à frente de remodelação e começam a desenvolver os receptores RANK. O

RANKL (sintetizado pelos linfócitos T) ao ligar-se ao seu receptor RANK desencadeia a maturação e activação dos osteoclastos que iniciam e caracterizam a fase de reabsorção. Na sequência da actividade dos osteoclastos começam a libertar-se (da matriz óssea reabsorvida), vários factores de crescimento responsáveis pela proliferação e diferenciação dos pré-osteoblastos que migraram das zonas perivasculares para esta área de baixa densidade celular. Por sua vez, os pré-osteoblastos vão produzindo OPG (com grande afinidade para o RANKL) que ao ligar-se ao RANKL desactiva os osteoclastos, pondo termo à fase de reabsorção. Os osteoblastos entretanto diferenciados iniciam a formação e mineralização de novo tecido ósseo, completando-se, assim, o processo de *turnover* ósseo. Uma linha cimentante assinala a reversão/inversão da fase de reabsorção para a fase de formação^{16, 62}.

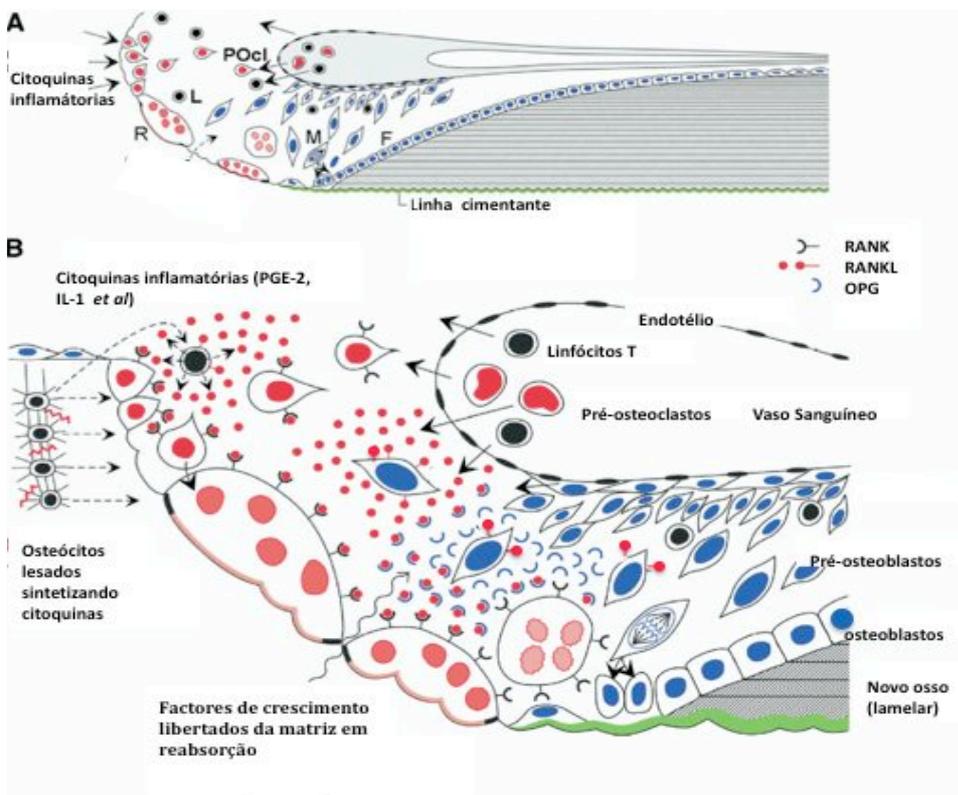


Figura 9. A) Hemi-corte de um cutting / filling cone ilustrado actividade celular associada ao processo de remodelação óssea; **B)** maior ampliação da frente de reabsorção do cutting / filling cone **A**, esquematizando o mecanismo molecular e celular envolvido na sequência de activação-reabsorção (R) formação (F) via RANKL/RANK/OPG. Linfócitos T (preto ⊙), células da linha osteoclástica (vermelho ⊙) e células da linha osteoblástica (azul ⊙). (Adaptado de Roberts WE, 2006⁶²).

Todos estes mecanismos são válidos tanto para o tecido ósseo (esponjoso e cortical) como para o cimento / dentina sendo particularmente notórios nos processos de reabsorções radiculares ^{16, 62, 88}.

A remodelação óssea e a sua directa dependência do sistema RANKL/RANK/OPG representa um factor dominante e fulcral quer na patogénese de muitas doenças osteoarticulares, quer no tratamento de base de múltiplas situações clínicas em ortodontia, endodontia, cirurgia oral, periodontologia, implantologia, entre outros ^{18, 62, 79, 82, 86, 89-91}.

8. Alguns princípios de regeneração óssea

A cicatrização dos tecidos constitui uma resposta comum a vários tipos de lesões e visa o restabelecimento da estrutura e da função tecidual face a uma agressão ⁹²⁻⁹⁴. Este processo desencadeia uma cascata de eventos altamente organizada e modulada por vários mediadores químicos, citoquinas e factores de crescimento, para além de factores ambientais e locais ⁹⁵.

O mecanismo de cicatrização pode ocorrer por dois processos: regeneração e reparação. O termo regeneração refere-se à reconstituição *ad integrum* dos tecidos danificados com base na proliferação e completa diferenciação dos elementos tecidulares do parênquima original. Deste modo, o novo tecido possui características morfológicas e propriedades funcionais que não se distinguem do tecido primitivo ^{96, 97}. Por sua vez, o processo de reparação consiste numa reconstrução incompleta, substituindo os tecidos perdidos pela formação de um tecido conjuntivo fibroso que resulta geralmente numa cicatriz. Deste modo o tecido danificado é substituído por outro cujas propriedades não são, necessariamente, iguais à do tecido original que sofreu a agressão ^{98, 99}. Considera-se hoje prioritário regenerar e não reparar, reconstruindo a forma e restaurando a função.

O desenvolvimento de estratégias terapêuticas para aplicação em engenharia de tecidos assenta tradicionalmente numa tríade regenerativa constituída por três elementos básicos que têm de interagir entre si: 1) células competentes capazes de uma resposta eficaz, 2) moléculas de sinalização com capacidade para estimular as células no sentido pretendido e 3) matrizes de suporte capazes de guiar e apoiar a formação do tecido a regenerar ¹⁰⁰⁻¹⁰².

A área de regeneração óssea tem apresentado desenvolvimentos muito promissores com base neste tipo de abordagem que envolve, como já foi descrito, a associação de elementos celulares (populações celulares com potencial osteogénico), moduladores biológicos (estímulos osteoindutores e

osteopromotores) e matrizes osteocondutoras ou mesmo biologicamente activas que promovam a regeneração óssea ¹⁰²⁻¹⁰⁵.

Mais recentemente, tem vindo a enfatizar-se para além da clássica tríade regenerativa um quarto elemento de reconhecida importância: a estabilidade mecânica. A estabilidade do micro-ambiente onde se localiza o defeito ósseo a regenerar parece determinante para a resposta biológica dos outros três elementos (células, factores de crescimento e matrizes). Este aspecto levou Peter Giannoudis ^{106, 107} a propor a substituição da tríade por um novo conceito que designou por “*diamond-model of bone healing interactions*” (Fig. 10).

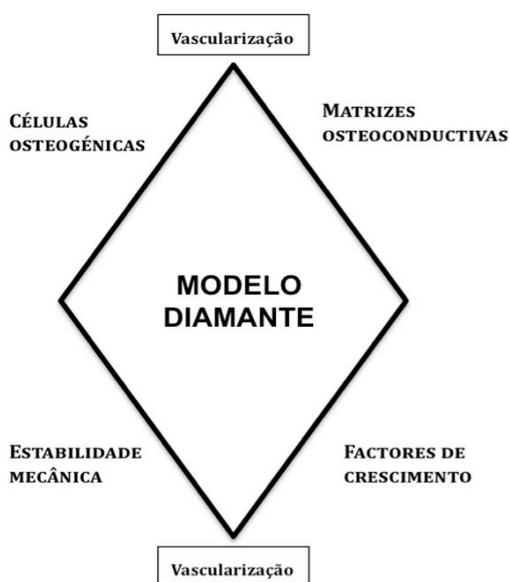


Figura 10. Modelo diamante de regeneração óssea.

Neste contexto uma boa vascularização local, consequência ainda de uma boa estabilidade, faz toda a diferença sendo também um pré-requisito essencial ¹⁰⁸. Este conceito de diamante de quatro faces terá muito mais faces se considerarmos a evolução da nanotecnologia, da genómica e da proteómica conduzindo ao desenvolvimento num futuro próximo, de um bioreactor concebido para, tendo por base aspirados de medula óssea, regenerar e fazer crescer o nosso próprio tecido ósseo quando necessário que funcionaria posteriormente como um autoenxerto ¹⁰⁹⁻¹¹².

O progresso e colaboração da Medicina, Biologia, Química Física e Engenharia, particularmente a engenharia de tecidos desempenham actualmente um papel cada vez mais importante na criação de novas soluções para novos/velhos problemas ^{50, 101, 102, 105, 110, 113-119}.

Parte **B**

ESTUDO EXPERIMENTAL EM
MODELO ANIMAL

B. ESTUDO EXPERIMENTAL EM MODELO ANIMAL

I. Objectivos

O presente estudo experimental pretende avaliar *in vivo* a eficácia e desempenho biológicos de uma nova geração de materiais de enxerto ósseo biomiméticos, tendo por base um xenoenxerto particulado e enriquecido com um modulador biológico (ABM/P-15).

O trabalho foi concebido com o objectivo de analisar o processo de osteointegração e o potencial de regeneração óssea do ABM/P-15, num defeito ósseo de contenção física, comparando a forma granulada convencional com novas formulações contendo diferentes sistemas de transporte e diferentes concentrações de partículas. Neste contexto, foram utilizados como veículos um hidrogel de carboximetilcelulose e glicerol, um hidrogel de hialuronato de sódio e ainda uma forma liofilizada deste último.

Em paralelo, foi ainda utilizada uma formulação de osso cortical granulado e desmineralizado suspensa, também, numa matriz de hialuronato de sódio, obtida de animais da mesma espécie do modelo experimental, funcionando, pois, como um aloenxerto.

Em síntese, os objectivos deste estudo experimental visaram essencialmente responder às seguintes questões, tendo por base o comportamento biológico das diversas formulações nos processos de regeneração óssea:

1. Será que as diferentes formulações (tendo por base diferentes veículos de transporte) podem influenciar significativamente a eficácia do ABM/P-15?
2. Será que as diferentes características físicas (modo de apresentação) dos veículos contribuem para a sua diferente *performance*?
3. Será que a diferente concentração de partículas/ espaçamento interfere na eficiência destas formulações?
4. Será que (utilizando o mesmo veículo de transporte) podemos comparar a eficácia de partículas de matriz óssea desmineralizada em relação às não desmineralizadas?

No presente trabalho, como já foi referido, a avaliação dos processos de cicatrização óssea assenta essencialmente em estudos de índole histomorfológica, realizados em microscopia de luz e em análises histomorfométricas das lâminas histológicas, com o respectivo tratamento estatístico.

II. Material e métodos

1. Materiais de enxerto ósseo

1.1. Mineral Anorgânico derivado de Bovino com P-15 (ABM/P-15)* - Grupo II

Este material de enxerto ósseo é composto por grânulos com uma matriz mineral anorgânica de origem bovina, combinada à superfície com um peptídeo sintético (P-15), não antigénico, envolvido nos mecanismos de ligação celular. Estes grânulos são constituídos por uma forma pura e policristalina de hidroxiapatite, obtida a partir de osso cortical bovino, tendo na sua superfície peptídeos de 15 aminoácidos, adicionados por adsorção. A sequência de aminoácidos forma um polipeptídeo linear, com uma sequência idêntica à existente entre os resíduos $^{766}\text{GTPGPQGIAGQRGVV}^{780}$ da cadeia alfa 1 do colagénio tipo I, envolvida na ligação celular a fibroblastos e a osteoblastos ¹²⁰⁻¹²⁷.

Este produto apresenta-se sob a forma de grânulos, com diâmetros que oscilam entre 250 e 420 μm (Fig. 11), com um valor médio de 300 μm , tendo um volume de poros de 0,13 ml/g e uma porosidade total de 28 %. Todavia, um estudo recente ¹²⁸ refere uma distribuição de tamanhos unimodal, com uma mediana de 367 μm e com uma gama de tamanhos ligeiramente mais alargada que a referida pelo fabricante. Este valor é importante, porque a dimensão das partículas vai determinar o tamanho dos espaços inter-particulares, disponíveis para a colonização celular, representado aqui o equivalente aos poros do tecido osso esponjoso.

O espectro obtido por difracção de raios X do ABM/P-15 é muito idêntico ao da hidroxiapatite, concluindo-se que é constituída por hidroxiapatite na sua forma mais pura ¹²⁸. Este facto é o resultado do processo de sintetização (1100°C) a que foi submetido este material, sendo responsável pela fusão dos cristais de hidroxiapatite, criando, deste modo, uma estrutura mais pura e cristalina do que a hidroxiapatite normalmente presente no tecido ósseo.

A preparação e caracterização do AMB/P-15 e a certificação do produto final encontra-se descrita ao pormenor em vários trabalhos referidos na literatura ^{4, 120-123, 125-127, 129-144}.

Uma nota final relativamente ao seu manuseamento. Antes do

*

Lote 03C3172. Nome comercial: Peppen P-15™. Fabricante: DENTSPLY Ceramed Dental, 12860 West Cedar Drive, Lakewood, Colorado, Estados Unidos da América, www.dentsplyfc.com

preenchimento do defeito é importante uma prévia hidratação das partículas durante 5 a 10 minutos em soro fisiológico, de forma a otimizar as suas características.



Figura 11. A) Apresentação comercial da formulação particulada de matriz mineral anorgânica, bovina derivada, combinada com um péptido P-15; **B)** Dimensão média das partículas situadas entre os 250 e os 420 μm .

A ideia de combinar um hidrogel com as partículas ABM/P-15 surge da necessidade de uma melhor coesão e estabilidade dos materiais particulados nos fluidos dos tecidos. De facto, existe uma certa dificuldade de manipulação e compactação com o ABM/P-15 bem como com outros materiais particulados, aquando do preenchimento de defeitos cirúrgicos. A sua difícil estabilização, frequente deformação e deslocação, com a conseqüente redução da quantidade de material, contribuem para aumentar esta problemática. Esta situação é devido ao facto dos materiais particulados não formarem por si só uma massa firme, coesa e estável^{1, 145}.

Numa tentativa de otimizar o manuseamento e a eficácia clínica das partículas de ABM/P-15, têm vindo a ser desenvolvidos diferentes veículos de transporte destas partículas, permitindo a sua injeção e uma mais fácil

colocação do produto granulado no defeito, mantendo-o no local desejado, sem necessidade de hidratação e compactação. Esta evolução, representa um avanço qualitativo importante nas propriedades de manuseamento destes materiais de enxerto ósseo.

Neste trabalho experimental, foram utilizadas duas formulações diferentes de hidrogel, que serão descritas com mais detalhe nas próximas alíneas.

1.2. Partículas de ABM/P-15 num hidrogel de carboximetilcelulose e glicerol (ABM/P-15/CMC)* – Grupo III

Este produto representa uma segunda geração do material apresentado e descrito no parágrafo 1.1, sendo composto por partículas de ABM/P-15 (51.6 %) suspensas num transportador de hidrogel com uma consistência tipo gelatina. Este veículo de transporte é constituído por carboximetilcelulose sódica (CMC) e glicerol, biopolímeros inertes e reconhecidamente biocompatível pelo GRAS (*Generally Recognized as Safe*).

O hidrogel funciona como um simples sistema de transporte das partículas de ABM/P-15 (0.82gm/cc) para facilitar tanto o seu manuseamento como a sua aplicação, representando uma tentativa para melhorar a contenção dos grânulos no local de enxerto. A matriz de hidrogel continha 15% de glicerina, 85% de água e 3.25 % de CMC.

O processo de incorporação das partículas no meio transportador, o preenchimento, o acondicionamento e esterilização das seringas foi realizado por uma empresa subsidiária (Bioform Inc., Franksville, WI, E.U.A.).

Para uma descrição detalhada das características deste material recomenda-se a consulta dos trabalhos de Matos e Nguyen ^{121, 141}.

Uma vez que a maior parte das formulações utilizadas neste estudo experimental têm por base o ácido hialurónico (Hy), pareceu-nos vantajoso apresentar algumas considerações sobre este composto, antes da descrição da sua metodologia de preparação e formulação.

** Lote: SK2342 52803. Fabricante: CERAPEDICS, INC.,. 11025 Dover Street, Suite 1600, Westminster, Colorado 80021, Estados Unidos da América, www.cerapedics.com.

O ácido hialurónico (Hy) é um componente *major* da matriz extracelular presente em todas as variedades de tecido conjuntivo. É um composto natural de alto peso molecular (> 1 a 2 milhões de Da), sendo estruturalmente um polímero não ramificado, constituído por unidades dissacarídicas de ác. D-glicurónico e N-acetil-glicosamina^{146, 147}. Este polissacárideo apresenta importantes e interessantes propriedades viscoelásticas devido às suas características poliméricas e polielectrolíticas, o que faz deste composto um atraente biomaterial com várias aplicações biomédicas¹⁴⁷⁻¹⁵⁰.

As suas cadeias podem formar géis hidratados e porosos que podem ser aplicados sob uma forma injectável. Estes géis vão preencher grande parte dos espaços inter-particulares permitindo ao mesmo tempo uma rápida difusão de pequenas moléculas como água, electrólitos e nutrientes^{146, 151}.

Por outro lado, o Hy está envolvido em importantes processos biológicos sobretudo relacionados com fenómenos de motilidade e proliferação celular. As interacções celulares com o Hy ocorrem através de receptores de membrana/ou de superfície (CD44*, RHAMM*, TLR4** e ICAM-1***), influenciando processos de morfogénese, cicatrização e regeneração de tecidos, e ainda fenómenos inflamatórios e metastáticos^{146, 147, 149, 151-153}. A actividade biológica do Hy varia na dependência do seu peso molecular, apresentando as cadeias de mais baixo peso molecular uma maior actividade osteogénica e angiogénica, do que as formas de maior peso molecular^{154, 155}. De facto, os seus efeitos terapêuticos dependem do tamanho da sua molécula, podendo apresentar propriedades diferentes ou mesmo opostas consoante o seu peso molecular^{147, 149, 156}. O Hy desempenha também um papel importante na sinalização química entre as células. Ao ligar-se a moléculas biologicamente activas pode criar um microambiente em redor das células capaz de modular o seu comportamento^{149, 153}.

* CD44 - Principal receptor de superfície celular para Hy

* RHAMM - Hyaluronan mediated motility receptor

** TLR4 - Toll Like Receptor

*** ICAM-1 - Intracellular adhesion molecule-1

1.3. Partículas de ABM/P-15 num hidrogel de hialuronato de sódio (ABM/P-15/ Hy)** - Grupo IV

A formulação de Hy (Fig. 12. A) utilizada neste grupo apresentou-se sob a forma de pasta (formulação injectável). Cada cm³ de hidrogel continha 0,51 g (37.5 %) de partículas de ABM/P-15. O gel de hialuronato de sódio foi formulado com 4% de Hy em água.

1.4. Partículas de ABM/P-15 num hidrogel de hialuronato de sódio liofilizado (ABM/P-15/ Hy lio)* - Grupo V

A formulação deste grupo é semelhante à descrita no parágrafo anterior 1.3, apresentando-se, porém numa forma liofilizada e maleável. Deste modo foram utilizados cilindros de 5 x 10 mm (Fig.12. B) constituídos por uma matriz inerte de hialuronato sódio liofilizada, contendo partículas de ABM/P-15 (85.6%).

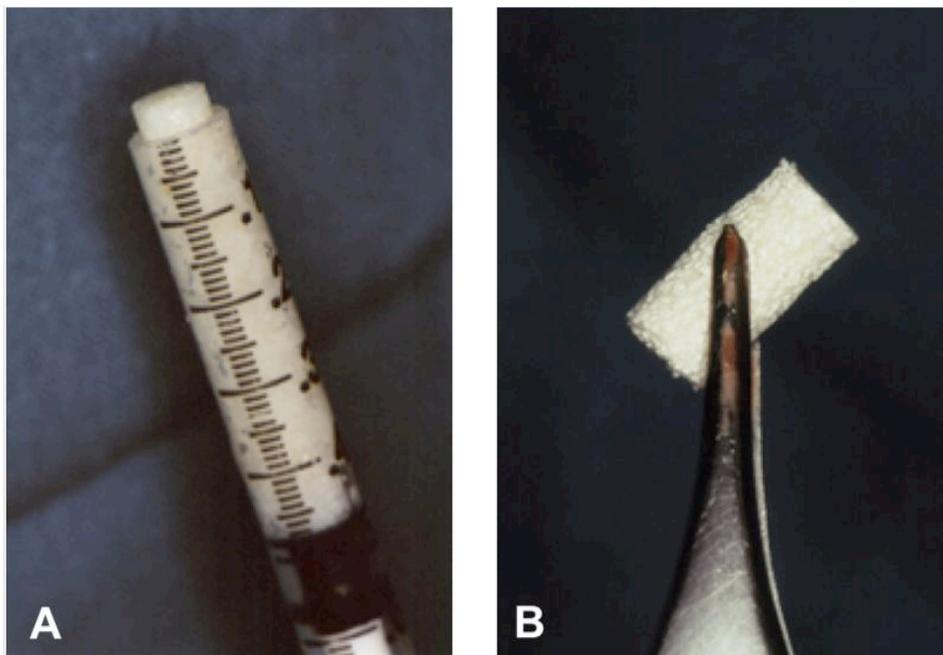


Figura 12. A) Imagem do ABM/P-15/Hy na formulação de hidrogel e veiculada numa seringa. **B)** ABM/P-15/Hy na formulação liofilizada em cilindro.

** Lote SK4042 52803. Fabricante: CERAPEDICS, INC., 11025 Dover Street, Suite 1600, Westminster, Colorado 80021, Estados Unidos da América, www.cerapedics.com.

* Lote SK4042 52803. Fabricante: CERAPEDICS, INC., 11025 Dover Street, Suite 1600, Westminster, Colorado 80021, Estados Unidos da América, www.cerapedics.com.

1.5. Partículas de osso alógeno desmineralizado num hidrogel de hialuronato de sódio (DBM/Hy)* - Grupo VI

A formulação aplicada neste grupo experimental era constituída por partículas de osso cortical desmineralizado (93 %) obtida de animais da mesma espécie (aloenxerto), suspensas numa matriz inerte de hialuronato de sódio 4% em água.

Uma pequena nota em relação a este material utilizando, também, como veículo transportador o hialuronato de sódio mas tendo por base partículas de matriz óssea desmineralizada.

O efeito osteoindutor da matriz óssea descalcificada está largamente estudado^{12, 105, 145, 157-162}. Em inúmeras situações clínicas consideram-se estes aloenxertos como os materiais de escolha, tendo muitas aplicações terapêuticas¹⁶³. Porém este aspecto continua bastante discutível, pois, alguns autores referem bons resultados^{150, 164}, outros inêxitos^{134, 165} ou ausência de vantagens em relação a outros tipos de enxerto^{159, 166} e ainda outros referem que esta actividade é inibida por uma correcta esterilização destes materiais^{159, 160, 162, 167-169}.

Interessa, no entanto salientar, nesta área de material e métodos, que a metodologia seguida para a descalcificação da matriz óssea, assim como o conteúdo mineral residual e o método de preservação podem exercer uma influência significativa nas capacidades indutoras dos enxertos ósseo descalcificados. Este aspecto pode fazer toda a diferença na eficácia deste material^{167, 169, 170}.

O processo de desmineralização promove a destruição da alta antigenicidade das membranas celulares e das glicoproteínas e ao mesmo tempo expõem as proteínas osteoindutores presentes na matriz óssea, podendo mesmo activá-las. Porém, a tão proclamada capacidade indutora pode ser afectada pela concentração e temperatura das soluções ácidas utilizadas na desmineralização, pelo tempo de exposição e ainda pelo tamanho das partículas e métodos de esterilização utilizados^{169, 171}.

A este respeito interessa sublinhar, como também vai ser referido nos resultados, que muitas das partículas aplicadas neste estudo, estavam apenas parcialmente descalcificadas, modulando certamente e de maneira positiva, o seu desempenho como material osteopromotor e osteocondutor.

* Lote 23-74. Fabricante: CERAPEDICS, INC., 11025 Dover Street, Suite 1600, Westminster, Colorado 80021, Estados Unidos da América, www.cerapedics.com.

2. Estudo *in vivo*

2.1. Amostra

Na realização deste trabalho experimental foi utilizada uma amostra constituída por trinta e dois coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da estirpe "New Zealand White", jovens machos adultos com um peso em redor de $3,8 \pm 0,4$ kg), divididos em duas séries (duas e quatro semanas) de 16 animais cada (Diagrama 1).

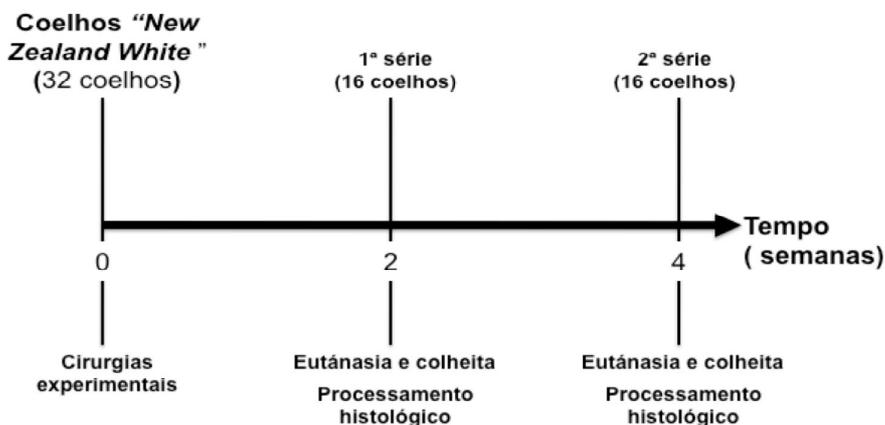


Diagrama 1. Esquema da distribuição dos animais no modelo experimental.

2.2. Manutenção, manipulação e bem estar animal

A selecção dos animais, a sua manipulação, manutenção e os procedimentos cirúrgicos foram executados no Laboratório de Investigação Experimental do Hospitais da Universidade de Coimbra, sob a direcção do Prof. Doutor João Patrício. As condições gerais de saúde dos animais foram avaliadas por técnicos qualificados, excluindo todos aqueles que apresentassem patologias crónicas ou agudas, do tipo infeccioso ou outros. Foi efectuado um registo individual para cada um dos coelhos, no dia de chegada que incluía uma descrição do seu estado clínico e peso. Após uma avaliação inicial, os animais foram colocados em gaiolas individuais, cumprindo, antes de qualquer intervenção, um período de quarentena que não foi inferior a uma semana.

Os animais foram alojados em gaiolas individuais normalizadas e adequadas para a sua espécie. Durante todo o estudo experimental estiveram sob condições padronizadas de climatização (temperatura, humidade e renovação do ar) e de luminosidade (12 horas de luz e 12 horas de escuro), situações permanentemente monitorizadas e registadas. Após os

procedimentos cirúrgicos, os animais foram transferidos para gaiolas específicas de recuperação até demonstrarem uma total capacidade de consciência e locomoção. Os animais foram então transferidos para as respectivas gaiolas padrão, sendo permitida uma locomoção sem restrições. Todas as gaiolas foram catalogadas e identificadas de acordo com as seguintes indicações: responsável do projecto, departamento, número do animal, sexo, peso e instruções específicas, se necessárias.

Todos os animais foram claramente identificados com um número através de uma tatuagem na orelha.

A dieta foi providenciada uma vez por dia, com ração seca de origem comercial com concentrações de contaminantes controladas e analisadas pelo fabricante. A água fornecida *ad libitum*, teve origem no abastecimento municipal.

2.3. Protocolos experimentais

Os protocolos experimentais estiveram ao abrigo de autorização da Comissão Consultiva do Bem Estar Animal e de Protecção dos Animais Utilizados para Fins Experimentais e/ou outros Científicos, da Direcção Geral de Veterinária, sendo observadas as normas técnicas de protecção do coelho, como animal de experimentação que constam da legislação Portuguesa actualmente em vigor (Portaria nº1005/92 de 23 de Outubro; Portaria nº 466/95, de 17 de Maio; Portaria nº1131/97 de 7 de Novembro) e na Legislação da Comunidade Europeia para o Bem Estar Animal (Directiva Nº86/609/CEE de 24 de Novembro de 1986)¹⁷²⁻¹⁷⁴.

2.3.1. Defeito ósseo experimental

Neste modelo experimental, o côndilo femoral foi a região anatómica escolhida para a realização dos defeitos e colocação das diferentes formulações do material em estudo. Esta região, apresenta-se como um local de fácil acesso cirúrgico e com um reduzido dano nos tecidos moles, sendo maioritariamente constituída por tecido ósseo esponjoso, bastante irrigada e envolvida por estruturas musculares. Todos estes requisitos satisfazem o objectivo deste trabalho, pois representam um ambiente propício para a incorporação de materiais de enxerto ósseo.

Foram efectuados dois defeitos ósseos cilíndricos por animal (N=64) na face distal do côndilo femoral (Fig. 13) e em membros opostos, através da cortical distolateral da articulação do joelho, sem comprometimento da cortical medial e da biomecânica da articulação. Cada defeito ósseo cilíndrico tinha 5 mm de diâmetro por 10 de profundidade, sendo pois considerados defeitos de dimensão crítica (Critical Size Defect - CSD). Estes defeitos representam o mais pequeno defeito ósseo que não cicatriza espontaneamente, levando a uma formação de tecido ósseo que não excede os 10% durante a restante vida do animal ^{120, 175-178}.

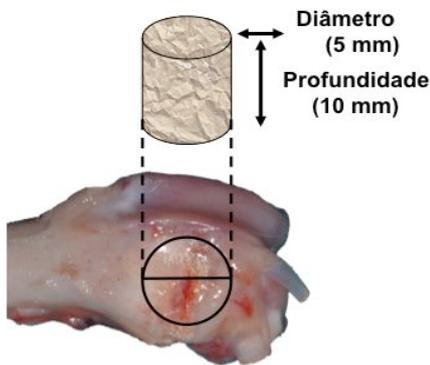


Figura 13. Modelo do defeito de dimensão crítica efectuado no fêmur do coelho.

A validação do modelo foi feita com defeitos sem preenchimento (grupo I). Foram utilizados apenas dois controlos negativos por grupo, uma vez que neste modelo animal, o CSD encontram-se se já suficientemente estabelecidos e referenciados na literatura, apresentando uma regeneração óssea muito limitada ^{120, 175-178}. Com efeito, consegue-se deste modo validar este estudo, reduzindo a quantidade de animais utilizados na investigação.

2.3.2. Grupos experimentais

A distribuição dos materiais foi efectuada de uma forma aleatória, em relação à localização anatómica e à sequência de colocação (Tabela 1 e 2). Esta abordagem permitiu reduzir o número de animais a utilizar, contribuindo para minimizar os efeitos da variação individual. Excluiu-se a repetição do material no mesmo animal, assegurando, deste modo, um mínimo de seis defeitos para cada material.

Grupo I - Defeito sem preenchimento - **controlo negativo**

Grupo II - Defeitos preenchidos com partículas de mineral anorgânico bovino-derivado contendo P-15 (**ABM/P-15**).

Grupo III – Defeitos preenchidos com partículas de ABM/P-15 (51.6 %) suspensas, numa matriz inerte de hidrogel de carboximetilcelulose e glicerol (**ABM/P-15/CMC**).

Grupo IV – Defeitos preenchidos com partículas de ABM/P-15 (37.5 %) suspensas numa matriz inerte de hialuronato de sódio (**ABM/P-15/Hy**).

Grupo V – Defeitos preenchidos com cilindros liofilizados de 5 x 10mm contendo partículas de ABM/P-15 (85.6%) numa matriz inerte de hialuronato sódio liofilizado (**ABM/P-15/Hy lio**).

Grupo VI – Defeitos preenchidos com partículas de osso alógeno desmineralizado (93 %) suspensas numa matriz inerte de hialuronato de sódio (**DBM/Hy**).

Tabela 1. Esquema da distribuição aleatória dos materiais às duas semanas.

COELHOS	Defeito direito	Defeito esquerdo
Duas semanas		
1	ABM/P-15	ABM/P-15/CMC
2	ABM/P-15	ABM/P-15/Hy
3	Vazio	ABM/P-15/Hy lio
4	ABM/P-15/CMC	DBM/Hy
5	ABM/P-15/CMC	ABM/P-15
6	ABM/P-15/CMC	Vazio
7	ABM/P-15/Hy	ABM/P-15/Hy lio
8	ABM/P-15/Hy	DBM/Hy
9	ABM/P-15/Hy	ABM/P-15
10	ABM/P-15/Hy/lio	ABM/P-15/CMC
11	ABM/P-15/Hy/lio	ABM/P-15/Hy
12	ABM/P-15/Hy/lio	DBM/Hy
13	DBM/Hy	ABM/P-15
14	DBM/Hy	ABM/P-15/CMC
15	DBM/Hy	ABM/P-15/Hy
16	ABM/P-15	ABM/P-15/Hy lio

Tabela 2. Esquema da distribuição aleatória dos materiais às quatro semanas.

COELHOS	Defeito direito	Defeito esquerdo
Quarto semanas		
17	ABM/P-15/CMC	ABM/P-15
18	ABM/P-15/Hy	ABM/P-15/CMC
19	ABM/P-15/Hy lio	ABM/P-15
20	DBM/Hy	ABM/P-15/CMC
21	ABM/P-15	ABM/P-15/CMC
22	Vazio	ABM/P-15
23	ABM/P-15/Hy lio	ABM/P-15/Hy
24	DBM/Hy	ABM/P-15/Hy
25	ABM/P-15	ABM/P-15/Hy
26	ABM/P-15/CMC	ABM/P-15/Hy/lio
27	ABM/P-15/CMC	DBM/Hy
28	DBM/Hy	ABM/P-15/Hy/lio
29	ABM/P-15	DBM/Hy
30	ABM/P-15/Hy	ABM/P-15/Hy/lio
31	ABM/P-15/Hy	DBM/Hy
32	ABM/P-15/Hy lio	Vazio

2.3.4. Volume do material colocado

O volume do material colocado em cada um dos defeitos ósseos foi de aproximadamente 0.2 cc ($V = \pi r^2 h$) ($3,14 * (5/2)^2 * 10$).

2.4. Medidas pré-anestésicas

O coelho é frequentemente considerado um dos animais de laboratório mais difíceis de anestésiar. Estes animais assustam-se com facilidade, em "stress" segregando grandes quantidades de catecolaminas, que lhe podem originar uma paragem cardíaca. É também frequente, neste estado de excitação, a ocorrência de fracturas dos membros ou das vértebras.

Para minimizar estes riscos é importante providenciar um ambiente tranquilo e uma manipulação adequada, sendo fundamental recorrer a pessoal devidamente treinado e tecnicamente competente ^{179, 180}.

Para além de um cuidadoso manuseamento, foi colocado um pano escuro e opaco sobre a cabeça do animal, com o objectivo de impedir a acção de estímulos luminosos, contribuindo ainda para o relaxamento do animal. Este procedimento foi mantido durante toda a intervenção cirúrgica.

Foi seguindo um jejum, pelo menos 12 horas, antes da anestesia para reduzir a quantidade de massa alimentar e a acumulação de gases, mantendo-se apenas o fornecimento de água. Desta forma, minimiza-se a interferência das vísceras na respiração e facilita-se o retorno venoso ao coração, diminuindo igualmente, o risco de regurgitação e a possibilidade de asfixia ^{181, 182}.

2.5. Anestesia

Como anestesia foi utilizada uma combinação de cloridrato de ketamina (Ketalar[®], Parke-Davis, Spa), 35 mg/kg e de cloridrato de xilazina (Rompun[®], Bayer AG, Leverkusen, Alemanha), 2 mg/kg por via intramuscular, administrada nos músculos da coxa. Para a manutenção anestésica durante a intervenção recorreu-se à administração de ketamina, por via intravenosa, através de cateterismo da veia marginal do pavilhão auricular, que nesta espécie em particular é fácil de detectar e de puncionar. As doses de reforço foram equivalentes a 1/4 da dose inicial, até ao máximo de três, consoante a resposta do animal ¹⁸².

Nestas condições, o início de acção da anestesia surge normalmente em 10 minutos, permitindo uma tolerância cirúrgica de 20 a 60 minutos. A diminuição da temperatura foi normalmente pouco significativa e obtendo-se um bom relaxamento muscular. O controlo do padrão respiratório e a sua variação constituíram o melhor indicador do plano anestésico atingido ¹⁸².

2.6. Preparação do local cirúrgico e posicionamento do animal

Os processos cirúrgicos foram realizados sob regras assépticas padronizadas. Todo o instrumental cirúrgico utilizado foi esterilizado em autoclave, segundo o protocolo hospitalar.

Foi efectuada a tricotomia da área envolvida na intervenção e seguidamente foi desinfectada com uma solução de iodopovidona (Betadine[®]).

Os animais foram posicionados, numa mesa operatória aquecida, em decúbito lateral. Os membros foram imobilizados sem uma excessiva pressão

de forma a evitar que um movimento inusitado pudesse provocar qualquer lesão aos operadores ou aos próprios animais. A grande potência muscular dos membros posteriores pode provocar, por estiramento, a fractura da sua coluna vertebral.

Durante o procedimento cirúrgico apenas ficou exposta zona de intervenção.

2.7. Cirurgia

O procedimento cirúrgico foi realizado em ambos os membros inferiores. Com uma lâmina de bisturi nº 15 foi efectuada uma incisão na face lateral da articulação sobre o fémur distal, com aproximadamente 1,5 cm de extensão. De seguida foi realizada a dissecação dos tecidos moles e do perióstio, de modo a identificar a epífise. Este passo foi realizado minuciosamente para evitar a comunicação com a cavidade articular.

Posteriormente, criou-se uma perda de substância óssea, centrada na epífise, com recurso a instrumental rotativo (sequência crescente de brocas) e com irrigação permanente de soro fisiológico estéril. Estabeleceu-se, deste modo através da cortical lateral, sem perfurar a cortical oposta, um defeito cilíndrico final com 5.0 mm de diâmetro por 10 mm de profundidade.

As irregularidades ou espículas ósseas remanescentes, sempre que presentes, foram removidas ou regularizadas.

Após irrigação copiosa com soro fisiológico, para remover o osso desbridado, procedeu-se à colocação do material experimental no local do defeito. Este procedimento foi executado cuidadosamente de modo a preencher o defeito por completo (Fig. 14). Os defeitos estabelecidos como controle negativos não foram preenchidos.

O encerramento dos tecidos moles foi realizado por planos, para conter o melhor possível os materiais. O perióstio foi suturado com fio reabsorvível (Coated Vicryl® 4/0, Ethycon, Edimburg, United Kingdom) seguidamente a pele, com pontos simples, descontínuos e não reabsorvíveis (Prolene®3/0, Ethycon, Edimburg, United Kingdom). O procedimento foi repetido no fémur contra-lateral. Toda a identificação dos materiais, etiquetas e localização foram registados.

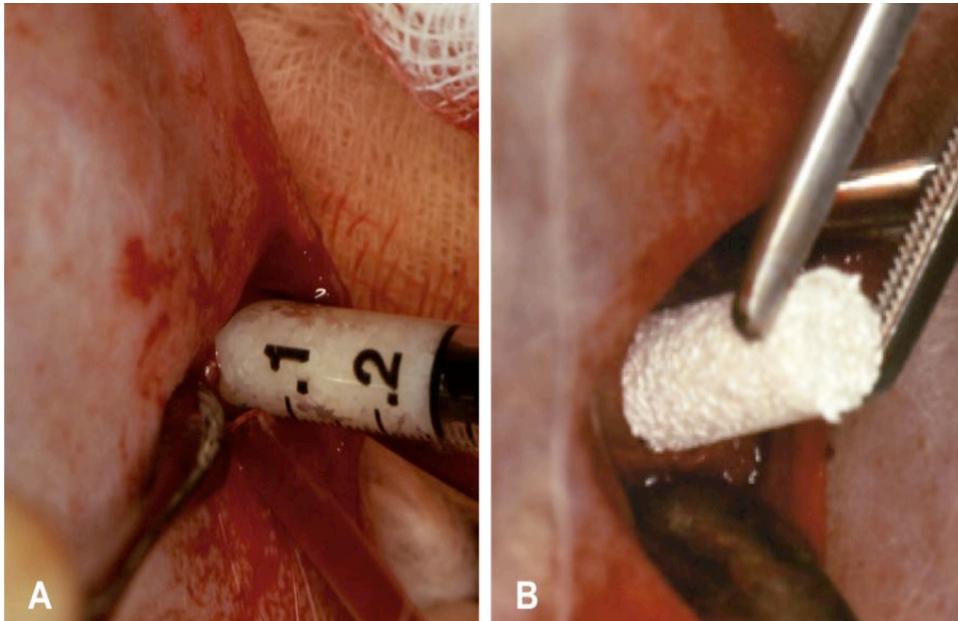


Figura 14. Imagens da colocação de duas formulações diferentes nos defeitos ósseos criados: **A)** colocação do material numa formulação em hidrogel; **B)** colocação do material numa formulação liofilizada.

2.8. Medicação e manipulação pós-operatória

Imediatamente após a cirurgia foi administrada uma dose de butorfanol tartrato (0.2 mg/kg, s.c., 2 dias) para controlo da dor e uma dose única de amoxicilina (1mg/Kg, s.c.) de longa duração (Duphamox[®]).

Os animais foram então colocados em cada gaiola específica de recuperação, num local com temperatura adequada, escuro, silencioso, confortável, limpo e isento de qualquer material de forragem que pudesse interferir com as vias respiratórias. De igual modo, foi retirado material que pudesse causar qualquer traumatismo, quando os animais iniciassem tentativas para se levantar. Houve ainda, cuidados adequados em relação à hipotermia e à aspiração de comida ou de água. Cuidados esses que passaram também pelo controlo da temperatura, recorrendo se necessário a materiais envolventes termo-isolantes. Os animais ficaram em convalescença até demonstrarem uma total capacidade de consciência e locomoção, sendo vigiados durante toda a sua recuperação anestésica. Depois da recuperação foram então transferidos para as respectivas gaiolas padrão, que lhes permitiam uma locomoção sem restrições.

Os animais foram também sujeitos a uma aferição da dor pós-operatória. Foi-lhes feita, uma monitorização diária de eventuais alterações na

ingestão de comida ou água, no peso corporal, nos padrões etológicos típicos da espécie e em relação à presença de sinais anómalos ou reacções adversas.

2.9. Eutanásia e necropsia dos animais

No final de cada período experimental (duas e quatro semanas pós-operatório), a eutanásia dos animais realizou-se individualmente, por grupos experimentais e em dias diferentes, através da administração de uma dose letal de cloridrato de ketamina. Foi realizada a necrópsia dos animais para uma avaliação do impacto sistémico dos biomateriais em estudo. Após uma análise macroscópica da carcaça dos animais, foram colhidos fragmentos dos principais órgãos (coração, fígado, pulmões, rins, baço e gânglios linfáticos da cadeia loco regional) e processados para estudos histológicos.

Os cadáveres e os resíduos procedentes da eutanásia foram posteriormente incinerados, de acordo com a legislação em vigor.

2.10. Colheita do material

A colheita do material foi realizada *en bloc*, após a dissecação meticulosa dos tecidos moles, utilizando uma serra mecanizada com refrigeração, para o corte do fémur, garantindo que as margens da peça obtida ficassem a uma distância suficiente dos defeitos a estudar. De seguida, as peças obtidas foram processadas para estudos histológicos.

2.11. Processamento histológico das amostras

O processamento histológico do material foi realizado no Laboratório de Tecidos Duros, do Departamento de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina Dentária, Estomatologia e Cirurgia Maxilo-Facial da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

As amostras foram preparadas seguindo um protocolo para material não descalcificado¹⁸³⁻¹⁸⁵. A técnica de processamento de tecidos duros foi realizada com o Sistema Exakt® (Exakt-Apparatebau, GmbH&CO, Norderstedt, Hamburgo, Alemanha). Este sistema destaca-se pela sua alta precisão, menor deformação da amostra, encurtamento do tempo de processamento e maior eficácia. O protocolo de preparação laboratorial segue várias etapas sequenciais^{121, 183-186} que serão apenas sumariamente abordadas.

2.11.1. Fixação e Lavagem

As amostras foram fixadas por imersão, imediatamente após a colheita, numa solução de formaldeído a 10% em tampão fosfato (pH 7,4), durante um período de 48 horas. O volume do componente para a fixação no recipiente deve ser de 15 a 20 vezes mais do que o volume da amostra. Com a finalidade de se removerem todos os resíduos provenientes do fixador utilizou-se a lavagem com água corrente.

2.11.2. Desidratação e infiltração

As amostras foram desidratadas por sucessivas passagens em etanol (60%, 80%, 90%, 96 % e duas passagens a 100%), com agitação contínua e durante os tempos recomendados.

Em seguida procedeu-se à infiltração das peças, utilizando a unidade de desidratação e inclusão (Jkika Labortechnik® HS 501 digital), sob agitação contínua, reduzindo-se assim para metade o tempo normalmente necessário.

Para o processo de infiltração recorrendo-se a soluções de percentagens crescentes em metilmetacrilato (Technovit® 7200 VLC, Kulzer) e etanol (resina / álcool: 30/70 %, 50/50%, 70/30% e por último duas passagens em 100%, sendo adicionado 1g de peróxido benzóico à última passagem).

2.11.3. Inclusão / polimerização

No seguimento, procedeu-se a inclusão / polimerização das amostras nos moldes plásticos de inclusão com metilmetacrilato (Technovit® 7200 VLC, Kulzer) numa unidade de inclusão / polimerização (Exakt® 520 Light Polymerization Unit) sob refrigeração contínua.

2.11.4. Cortes iniciais dos blocos

Os cortes iniciais visam a reduzir os blocos acrílicos expondo as amostras incluídas a tamanhos aceitáveis para as lâminas, orientando as amostras de forma paralela à possível colagem na lâmina inicial, bem como orientar a amostra para o polimento "*facing*" da amostra. Os cortes foram transversais ao eixo maior dos defeitos, com 700 µm a 1000 µm de espessura, sendo efectuados na unidade de corte (Exakt® 300 CP Precision Parallel Control) (Fig.15) e subsequente procedeu-se a preparação da primeira lâmina.



Figura 15. Sistema Exakt® instalado no Laboratório de Tecidos Duros do Departamento de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (equipamento de processamento histológico de material não descalcificado).

2.11.5. Montagem dos blocos

Assim, estes blocos de amostras com as superfícies paralelas foram seguidamente preparados e montados numa primeira lâmina (slide microscópicos – Exakt® 50x100x1,5) usando a cola Technovit 4000, em prensa de fixação a vácuo, fazendo cola específica (Technovit® 4000, Kulzer).

2.11.6. Preparação da sanduíche

Nesta etapa foi realizado o polimento da superfície da amostra até atingir a zona a estudar, sendo denominada por “facing” da amostra. Este polimento foi realizado com lixas de diferentes granulometrias (lixas de sílica e carbide, Hermes®, Alemanha) na unidade de polimento (Micro Grinding System Exakt® 400 CS).

Após a realização do *facing*, recorreu-se a unidade de polimerização (Exakt® TYP/nº 42/344) para a colagem da lâmina final (50x75x1,5mm). Consequentemente separou-se a sanduíche, ou seja, as duas lâminas (inicial e final) e iniciou-se o polimento da lâmina final.

2.11.7. Preparação da lâmina final

O polimento foi efectuado com aplicação de pesos, também constantes entre os 100 e 200 gramas na coluna de fixação das amostras em movimento de vaivém em veios de rosca sem fim.

Pretendeu-se uma a espessura final da amostra de 50 µm, para tal efectuou-se um polimento calibrado, na Unidade de polimento com discos de granulometria decrescente (1000, 1200, 2500, e 4000, Hermes®, Alemanha).

2.11.8. Coloração

Os cortes foram corados com Azul de Toluidina, segundo a técnica descrita por Donath ¹⁸³⁻¹⁸⁵ para os tecidos duros. Esta metodologia, permite estabelecer uma distinção entre tecido osteóide e tecido ósseo mineralizado, bem como a distinção e identificação correcta da morfologia das células.

Durante todo o processamento foi assegurada uma rigorosa identificação da amostra contendo o número do animal, a localização do defeito, a designação do estudo e o número do corte.

2.12. Métodos de análise

A avaliação histológica incluiu para além de uma análise qualitativa, uma avaliação quantitativa de alguns elementos presentes nos cortes.

2.12.1. Análise histológica qualitativa

A análise qualitativa dos cortes histológicos consistiu na avaliação do processo de cicatrização óssea, incidindo fundamentalmente na observação e registo das características histomorfológicas dos tecidos, nas características da interface osso / materiais implantados e na presença ou ausência de resposta inflamatória.

As observações das lâminas foram efectuadas com recurso a um estereomicroscópio (Nikon® SMZ 1500, Tóquio, Japão), com sistema de reforço de luz por fibra óptica (Intralix® 5000 – I, Volpi, Suíça) e a um microscópio de luz de campo claro (Nikon® Eclipse 600, Tóquio, Japão). Estes dispositivos têm ambos capacidade para acoplar um equipamento fotográfico convencional (Nikon® FDX-35, com sensor multiponto Nikon® U-III, Tóquio, Japão), e digital (Nikon® Coolpix 4500, Tóquio, Japão), bem como uma câmara de vídeo digital (Optronics® DEI 750D CE, Goleta, Califórnia, Estados Unidos da América) ligada a um monitor (Sony® Trinitron, Tóquio, Japão).

2.12.2. Análise histológica quantitativa

A análise quantitativa foi realizada através da captação das imagens a partir da câmara de vídeo (Nikon® SMZ 1500, Tóquio, Japão), atrás mencionada, acoplada ao estereomicroscópio (Optronics® DEI 750D CE, Goleta, Califórnia, Estados Unidos da América) e ligada a um computador PC (Intel® Pentium®III).

A histomorfometria foi efectuada tendo por base um “software” para análise de imagem (Bioquant Nova®, Bioquant® – Image Analysis Corporation, Nashville, Estados Unidos da América). Este programa tem a capacidade de

distinguir as diferentes afinidades tintoriais dos tecidos e componentes da amostra, convertendo essa informação em quantificação de áreas, reproduções tridimensionais, determinação de densidades e outros parâmetros mais especializados. Este sistema de avaliação permite uma maior objectividade e precisão comparativamente com outros sistemas de avaliação, como a radiomorfometria ¹⁵ ou sistemas com escalas de graus ¹⁸⁷.

A calibração do programa e a análise foram sempre efectuados pelo mesmo operador. Todas as sessões foram antecedidas por uma verificação da calibração intra-examinador.

A histomorfometria (Fig.16) utilizou como referência uma área total do defeito de 30 mm², assumida como área padrão para todos os defeitos de forma a minorar enviesamentos nas medições. Foi estabelecida uma área de estudo com a forma de um círculo de aproximadamente 6 mm de diâmetro, com uma pequena margem de tolerância ligeiramente superior ao valor teórico do defeito cirúrgico (5 mm), com o objectivo de englobar o máximo de informação histológica útil. Esta opção pareceu-nos a mais acertada, uma vez que na maioria dos cortes os limites reais de interesse histológico dos defeitos não poderiam ser totalmente englobados num círculo com 5 mm de diâmetro e deve ser considerado o efeito de corte.

Na análise histomorfométrica foram avaliados os seguintes parâmetros:

a) quantificação da percentagem de partículas

- área ocupada pelas partículas / área do defeito x 100%

b) quantificação da percentagem de novo osso

- % de novo osso = (área de novo osso / área do defeito) x 100%

c) percentagem de novo osso versus partículas do enxerto

- % novo osso / % partículas

d) resolução do defeito

- Preenchimento do defeito = % de novo osso + % de partículas / área do total do defeito.

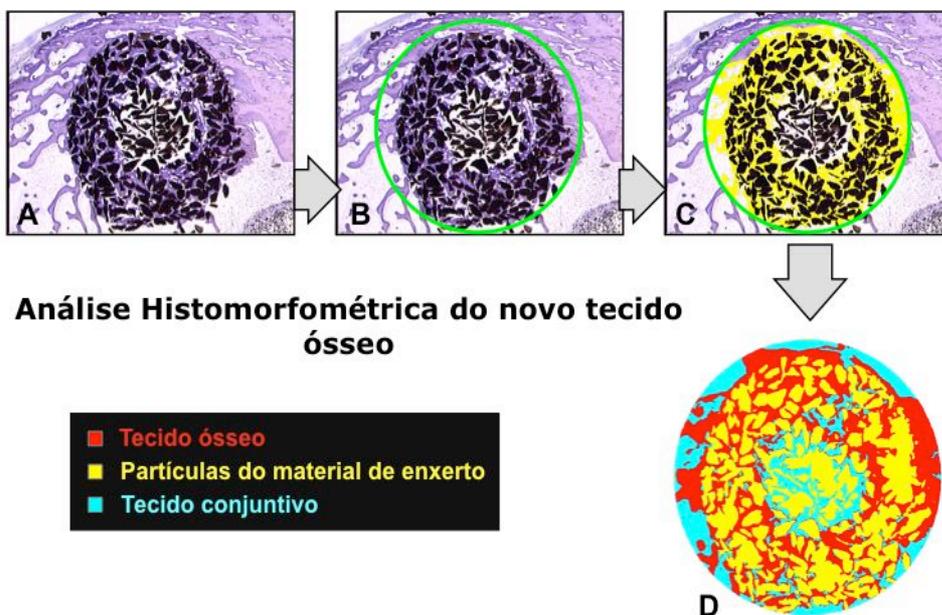


Figura 16. Etapas da histomorfometria; **A)** imagem do defeito, obtida com estereomicroscópio acoplado a um *software* analítico; **B)** delimitação da área total do defeito (círculo verde); **C)** identificação por pseudocor do novo tecido ósseo (áreas amarelas); **D)** representação das variáveis histomorfométricas em relação à área do defeito: tecido ósseo (vermelho), partículas (amarelo) e tecido conjuntivo (azul).

Nas observações em microscopia de luz e sobretudo quando se pretendem fazer análises quantitativas, coloca-se sempre o problema da espessura do corte. Este facto é particularmente, evidente no presente trabalho, uma vez que se utiliza cortes de 50 μm . Variando a profundidade de foco, podemos obter diferentes imagens do mesmo campo (Figs. 17 e 18). Porém, este “erro” é sempre o mesmo em todas as observações, o que atenua a sua relevância em estudos comparativos, como é o caso presente. O facto da coloração utilizada ser uma coloração limitada à superfície do corte, contribui para o não agravamento deste problema.

2.12.3. Análise estatística

A análise dos dados foi realizada em ambiente Mac OS X, com recurso ao programa estatístico SPSS 16.0. Para a comparação entre os diferentes grupos (inter-grupos) utilizámos o teste de Kruskal Wallis. Na avaliação do mesmo material, feita às duas e quatro semanas (intra-grupos), utilizou-se o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*. Esta análise foi feita com um nível de significância de 95% ($p \leq 0.05$).

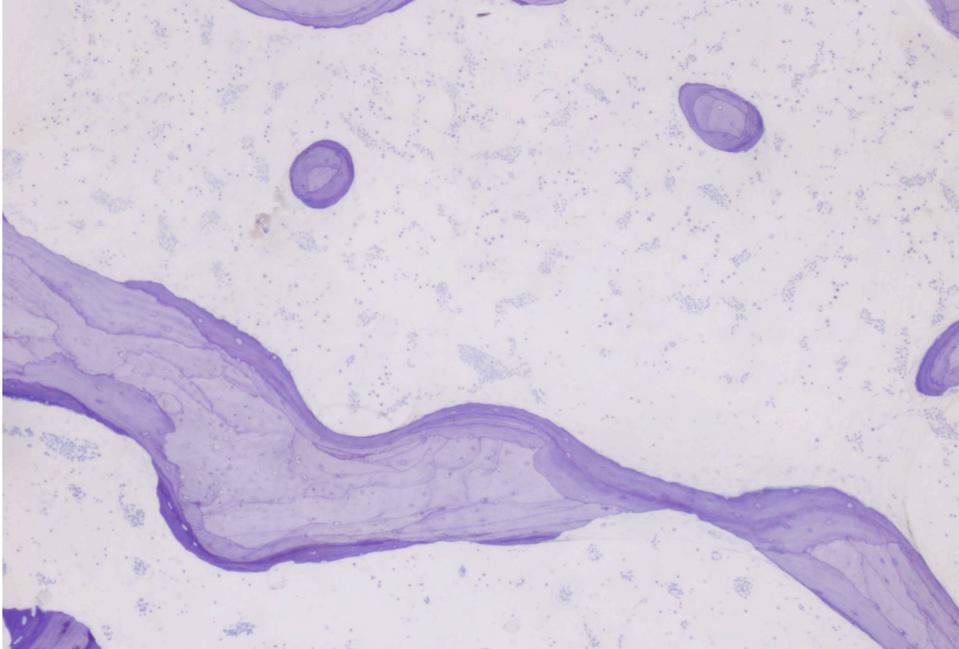


Figura 17. Observação de uma trabécula óssea em microscopia de luz (200x no original).



Figura 18. Aspecto do mesmo campo representado na figura anterior (Fig. 17) modificando a profundidade de foco. Observa-se a presença de uma maior quantidade de tecido ósseo (não corado) em relação a imagem anterior (200x no original).

III. Resultados

1. Observação geral dos animais

Os animais de experiência utilizados neste estudo apresentaram uma adequada recuperação cirúrgica, e sobreviveram saudáveis durante todo o período experimental. Não foram detectados quaisquer de complicações pós-operatórias, sistêmicas ou locais decorrentes da intervenção cirúrgica.

As variações de peso dos animais durante o período do estudo e a rápida recuperação dos comportamentos etológicos normais desta espécie, revelaram um impacto reduzido do protocolo experimental na saúde e bem-estar dos animais. O peso médio final dos animais na altura do sacrifício foi de 3.9 ± 0.3 Kg, não revelando diferenças estatisticamente significativas em relação ao peso médio inicial ($p > 0.05$, estabelecido através do teste de *Wilcoxon Signed Rank*), tendo-se verificado também um ligeiro aumento de peso individual na maioria dos animais.

2. Análise macroscópica

As observações macroscópicas dos fêmures, recolhidos em bloc após a dissecação da pele e dos tecidos moles, não mostraram alterações morfológicas nem a existência de processos inflamatórios, para além das espectáveis e decorrentes do acto cirúrgico. Constatou-se, também, uma evolução normal do processo cicatricial, com uma boa tolerância dos tecidos em redor dos defeitos. Estes dados foram posteriormente complementados com biópsias colhidas dos diversos órgãos (coração, rim, fígado, baço e gânglios linfáticos da cadeia loco regional) para análise histopatológica, efectuada em microscopia de luz, e que, por sua vez, não demonstraram também quaisquer alterações anátomo-patológicas.

3. Análise histológica – Microscopia de Luz

Qualquer agressão causada no tecido ósseo, como em qualquer tecido vascularizado, leva ao imediato desenvolvimento de um hematoma e formação de uma matriz provisória que consiste essencialmente numa rede de fibrina. Segue-se uma resposta inflamatória aguda com tecido de granulação, um processo de angiogénese e finalmente a síntese de uma matriz óssea, posteriormente mineralizada, conduzindo ao aparecimento de novo osso.

A resposta inflamatória aguda estimula a angiogénese e activa a secreção de citocinas (IL1, IL6) e de factores de crescimento (TGF- β , PDGF,

IGF, BMPs) que promovem o influxo (recrutamento e migração) de células mesenquimatosas pluripotenciais para o local da lesão, sendo ainda responsáveis pela sua proliferação e diferenciação em osteoblastos.

O hematoma e o tecido de granulação constituem matrizes osteocondutoras que suportam (componentes estruturais) e estimulam (moléculas bioactivas) o processo de regeneração óssea.

Como o objectivo primário deste estudo visava a avaliação do comportamento biológico de diferentes formulações na regeneração óssea, julgou-se conveniente deixar passar a fase de hemorragia e inflamação, comum a todos os processos de reparação óssea, e iniciar os estudos histológicos dos defeitos a partir dos quinze dias de experiência.

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

Visando proporcionar uma certa continuidade e um melhor entendimento dos fenómenos biológicos decorrentes das diferentes variantes utilizadas, pareceu-nos mais lógico iniciar a apresentação dos resultados pelos defeitos sem preenchimento.

3.1. Grupo I - Defeito ósseo sem preenchimento (controlo negativo)

Foram utilizados como controlo negativo (defeito sem preenchimento) apenas dois defeitos por período de avaliação. Desta forma, houve uma redução do número de animais a incluir na amostra e, simultaneamente, uma validação interna do estudo.

a) Duas semanas

Nos defeitos sem preenchimento, ao fim de quinze dias de evolução pós-operatória, constatou-se a existência de pequenas áreas de tecido ósseo, localizadas preferencialmente às margens do defeito (Fig. 19). De facto, o aspecto predominante nestes defeitos foi a presença de tecido cicatricial fibrovascular, moderadamente denso, com apenas alguns centros de ossificação.

As trabéculas de formação recente apresentavam características morfológicas e tintoriais de osso imaturo (Fig. 20). O tecido ósseo imaturo não tem uma aparência lamelar organizada, tendo uma disposição desordenada das fibras de colagénio e maior afinidade para os corantes básicos. Além disso, é também caracterizado pela presença de uma grande densidade de células

(osteócitos) dispostas irregularmente e alojadas em lacunas arredondadas. Estas espículas, ainda que residuais, estavam, como já foi referido, confinadas às margens do defeito, sendo o resultado de um processo de osteogénese predominantemente de origem intramembranosa. A formação de trabéculas ósseas constitui uma ténue invasão centrípeta de preenchimento do defeito criado, que ficou muito longe de atingir a sua zona central. Nesta região, apenas se encontrava tecido fibroso e restos de fibrina.

É de referir ainda, o aparecimento de um grande número de trabéculas ósseas imaturas de localização subperióstica (Fig. 21), ocupando uma extensa área entre a face externa do osso cortical e o perióstio, na região correspondente ao calo ósseo.

b) Quatro semanas

Após trinta dias de evolução, em nenhuma das secções efectuadas, se verificou o completo e adequado encerramento dos defeitos por tecido ósseo, encontrando-se estes preenchidos com tecido fibroso. Pelo contrário, verificou-se, com frequência, uma diminuição do número de espículas ósseas observadas aos quinze dias. Os defeitos encontram-se agora, ocupados por tecido conjuntivo, como bastante medula óssea, tendo desaparecido com já foi referido, a quase totalidade das estruturas ósseas anteriormente visualizadas. As escassas espículas presentes neste período estavam constituídas por tecido imaturo, encontrando-se num nítido processo de reabsorção por osteoclastos.

As áreas de tecido ósseo trabecular de localização subperióstica, anteriormente referidas foram também, alvo de um processo de reabsorção, estando agora reduzidas a um pequeno reforço ósseo (Fig. 22).

Em síntese, nos defeitos ósseos sem preenchimento, ainda que no início se observe uma evolução no sentido da cicatrização óssea, não se registou em nenhum dos casos estudados um adequado encerramento do defeito, ficando muito longe disso, verificando-se sempre a presença de grande quantidade de tecido fibroso, justificando a sua denominação de defeito de dimensão crítica.

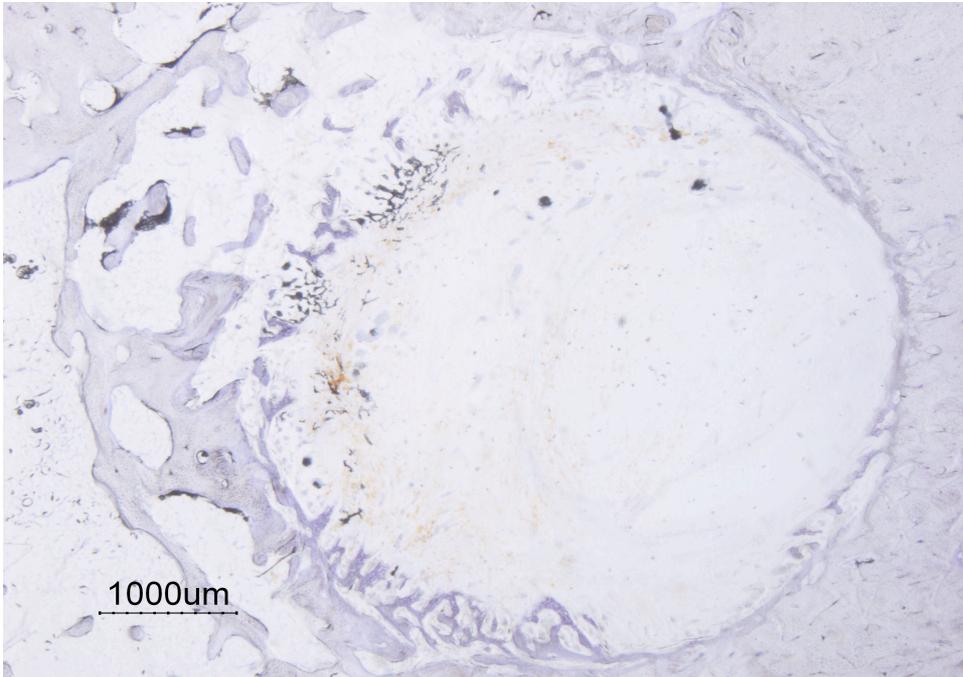


Figura 19. Corte histológico de um defeito ósseo sem preenchimento, aos quinze dias de evolução, mostrando apenas um escasso numero de trabéculas localizadas na periferia.

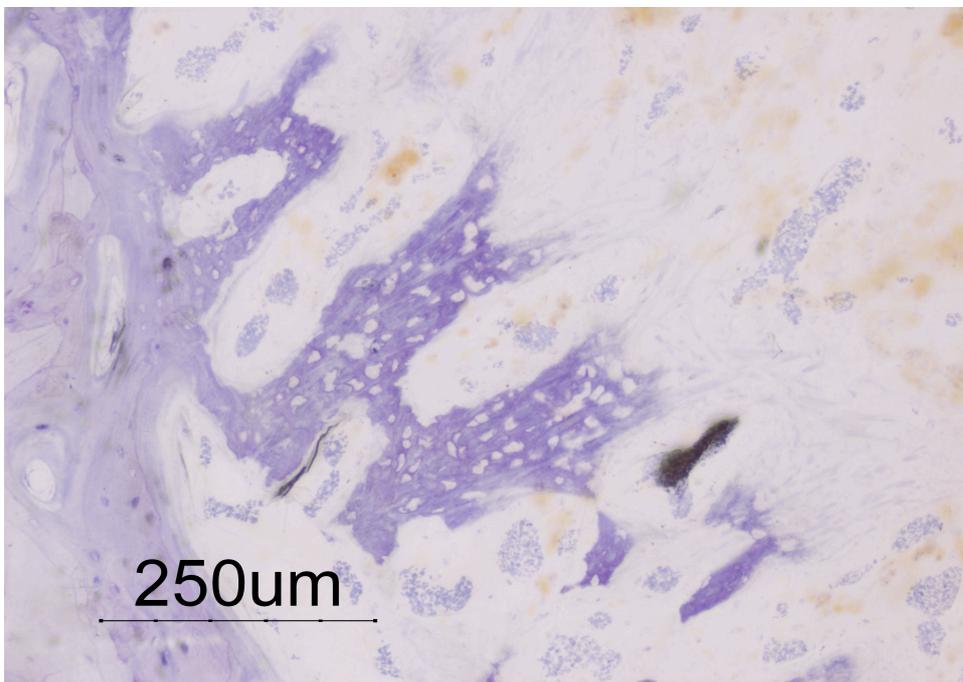


Figura 20. Maior ampliação duma área representada na figura anterior 19 permitindo identificar trabéculas ósseas, constituídas por um tecido imaturo, formadas no seio de um tecido conjuntivo muito vascularizado, por um processo de ossificação intramembranosa. De notar ainda a sua continuidade com as margens do defeito.

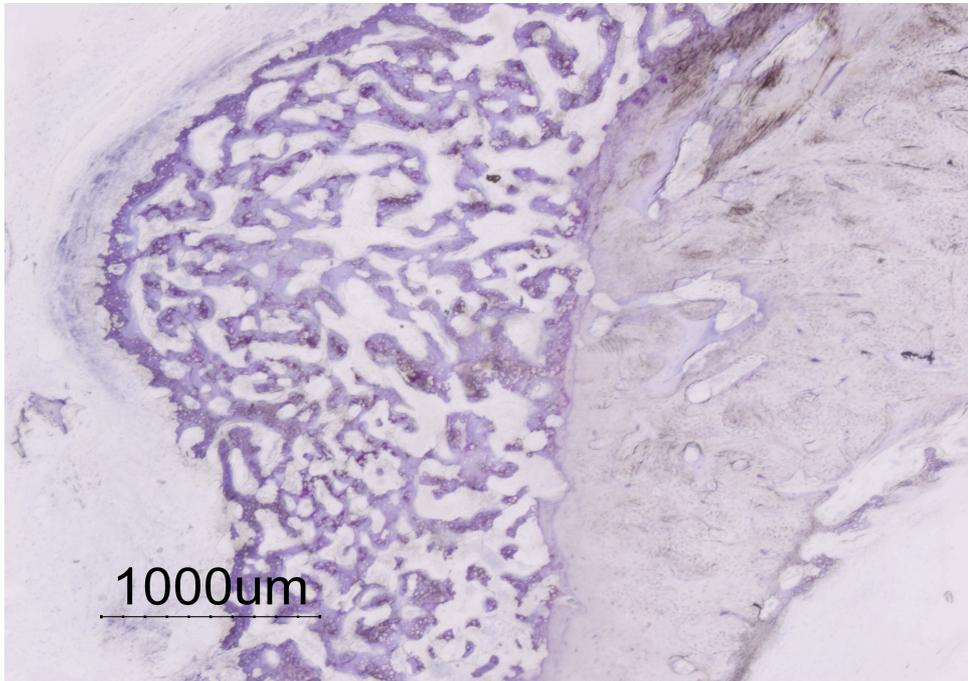


Figura 21. Presença de uma grande densidade de trabéculas ósseas, aos quinze dias de evolução, ocupando uma extensa área entre a face externa do osso cortical e o respectivo perióstio a nível do calo ósseo.

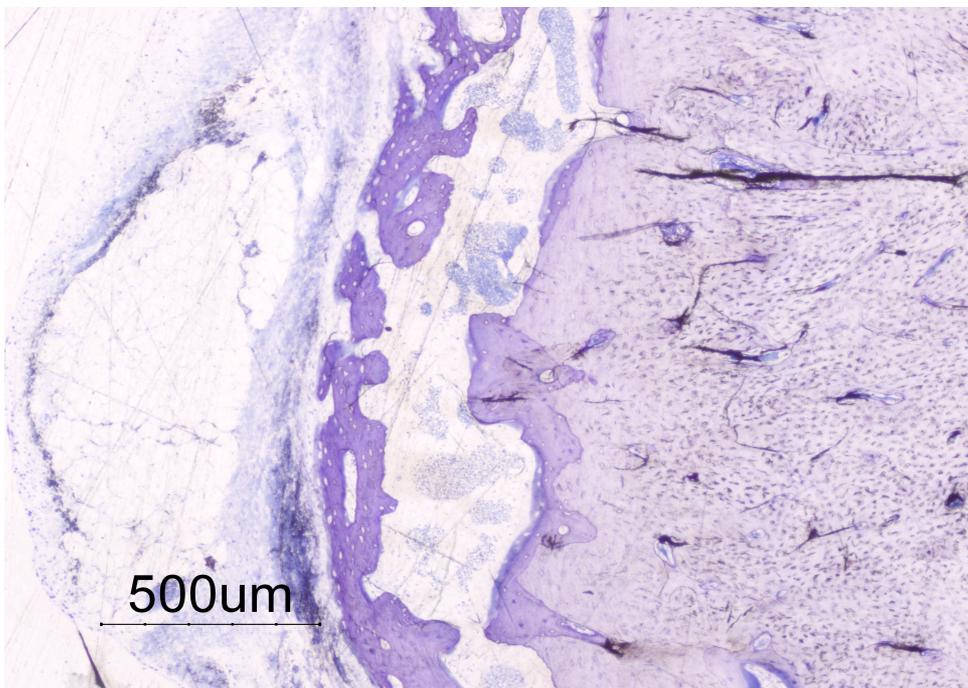


Figura 22. Aspecto de uma zona correspondente a da figura anterior mas já com trinta dias de evolução. É nítida a redução do número de trabéculas em relação aos quinze dias, traduzindo um intenso processo de reabsorção óssea.

3.2. Grupo II - Defeitos preenchidos com partículas de mineral anorgânico bovino-derivado (ABM/P-15)

a) Duas semanas

Nas secções horizontais dos defeitos preenchidos com grânulos de AMB/P-15 foi notória a presença de uma enorme concentração de partículas, distribuídas de uma forma homogénea por todo o defeito (Fig. 23). Por vezes, apresentavam-se bastante compactadas, com espaços muito reduzidos entre si.

Aos quinze dias, a formação de novo tecido ósseo era nitidamente visível, progredindo a partir das margens do defeito com uma orientação centrípeta, existindo uma linha de demarcação entre o osso original e o novo osso. Nas zonas mais periféricas era visível, para além das partículas de ABM/P-15, uma profusão de finas e intrincadas trabéculas ósseas, separadas por espaços preenchidos com tecido conjuntivo laxo muito vascularizado. A aposição de novo osso que ocorreu directamente à superfície dos grânulos, apresentava características de osso imaturo (Figs. 24 e 25). Muitas das trabéculas encontradas formavam pontes de ligação entre si e entre o tecido ósseo imaturo que reveste as partículas. Por vezes, sobre este tecido imaturo era visível a aparecimento de algum tecido lamelar e de osteóide.

As regiões centrais dos defeitos as partículas encontravam-se envolvidas por um tecido conjuntivo laxo, com elevada densidade celular, poucos vasos sanguíneos e restos de fibrina (Fig. 26). Ainda assim, foi possível observar nesta zona algumas áreas de tecido ósseo adjacente às partículas.

b) Quatro semanas

Aos trinta dias de evolução pós-operatória observou-se um acréscimo na neoformação óssea, tanto em quantidade como em qualidade, quando comparado com os quinze dias, abrangendo todo o defeito desde as margens até à zona central. De facto, foi notável neste período a neoformação óssea ocupando as áreas periféricas e centrais do defeito (Fig. 27).

Foi evidente a existência de trabéculas ósseas compostas por tecido lamelar e tecido ósseo imaturo (Figs. 28 e 29). A maioria das partículas do material de enxerto, encontravam-se incorporadas nestas novas trabéculas ósseas, que estabeleciam íntimas e numerosas ligações entre as partículas revestidas. Foi possível observar em muitos cortes uma continuidade de tecido ósseo ("*bridging*"), com partículas osteointegradas, entre margens opostas do defeito. A espessura das trabéculas era já assinalável, principalmente nas

áreas periféricas do defeito, com aparecimento de osso lamelar, caracterizado por uma deposição regular e paralela das fibras de colagénio (Figs. 29 e 30). Este espessamento vai reduzindo gradualmente os espaços inter-particulares ocupados, aos quinze dias, por tecido conjuntivo e fibrina.

Nas zonas mais centrais do defeito a formação de novo osso, ainda que bastante evidente, foi menor do que junto às margens, ocorrendo, de igual forma, muitas pontes de ligação entre as partículas. As trabéculas, constituídas por áreas de tecido imaturo e lamelar, delimitavam entre si espaços ocupados por um tecido ricamente vascularizados, sendo nalgumas zonas, visível a aparecimento de medula óssea.

Foi interessante registar alguns fenómenos de reabsorção das partículas, conduzindo à sua degradação, desgaste e fragmentação (Figs. 31 e 32). Com efeito, na periferia das partículas era frequente a existência de zonas desmineralizadas, que se apresentavam bastante mais claras e, por vezes, a presença de lacunas irregulares com osteoclastos (Figs. 31 e 32). Encontraram-se, também, imagens sugestivas da presença de cones de reabsorção intra-particulares correspondentes à reabsorção osteoclástica dos canais de Havers (Fig. 31) e dos canais de Volkmann, característicos da estrutura de osso cortical e ainda conservados e visíveis nalgumas partículas.

A este respeito, convém sublinhar que as partículas que não estavam envolvidas por tecido ósseo (menos protegidas), se apresentavam bastante mais acessíveis ao "ataque" dos osteoclastos. Este aspecto, verifica-se para qualquer formulação. Também neste período foi notória a presença de numerosos processos de reabsorção das trabéculas ósseas imaturas, em paralelo com a formação de um tecido lamelar.

Em síntese, o conjunto de imagens apresentadas ilustra um processo sequencial e centrípeto em que os defeitos ósseos preenchidos com partículas de AMB/P-15 foram sendo progressivamente ocupados por uma notável quantidade de tecido ósseo. Estas áreas de tecido ósseo estavam constituídas por numerosas trabéculas de novo osso revestindo, integrando e ligando as partículas entre si e às paredes do defeito, estabelecendo um *continuum* formado por tecido ósseo e material. A actividade osteoclástica é bastante intensa levando a uma reabsorção progressiva das áreas de tecido ósseo imaturo, bem como à degradação, desgaste e fragmentação de muitas partículas. Há que sublinhar, no entanto, a persistência de grandes áreas de tecido ósseo imaturo ainda não remodelado no final deste período experimental.

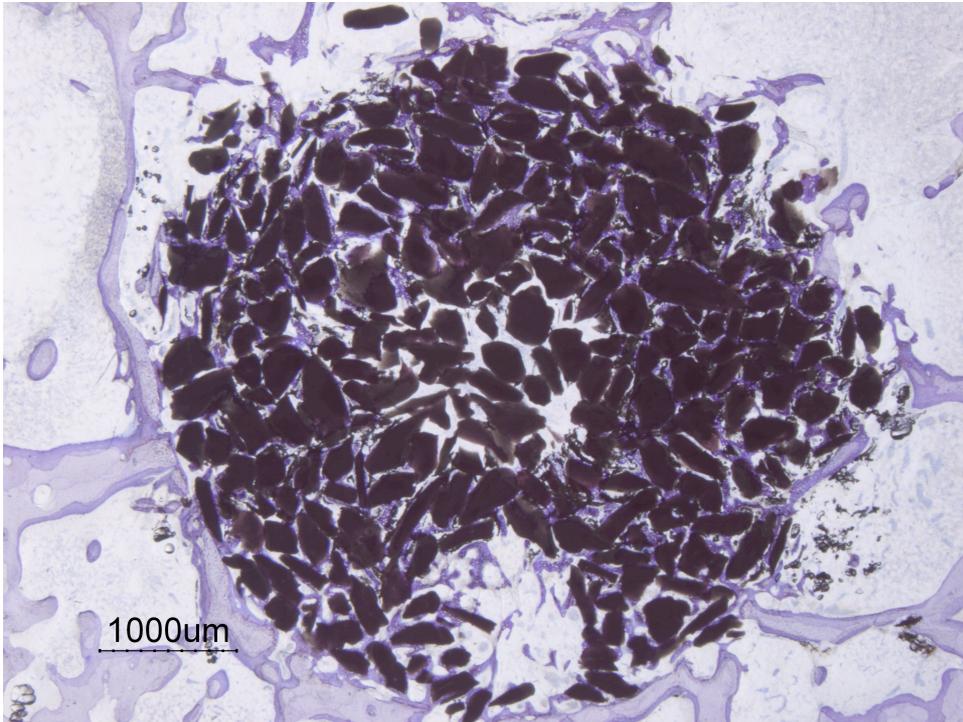


Figura 23. Corte transversal de um defeito preenchido com grânulos de ABM/P-15 aos quinze dias, mostrando uma distribuição bastante homogênea das partículas.

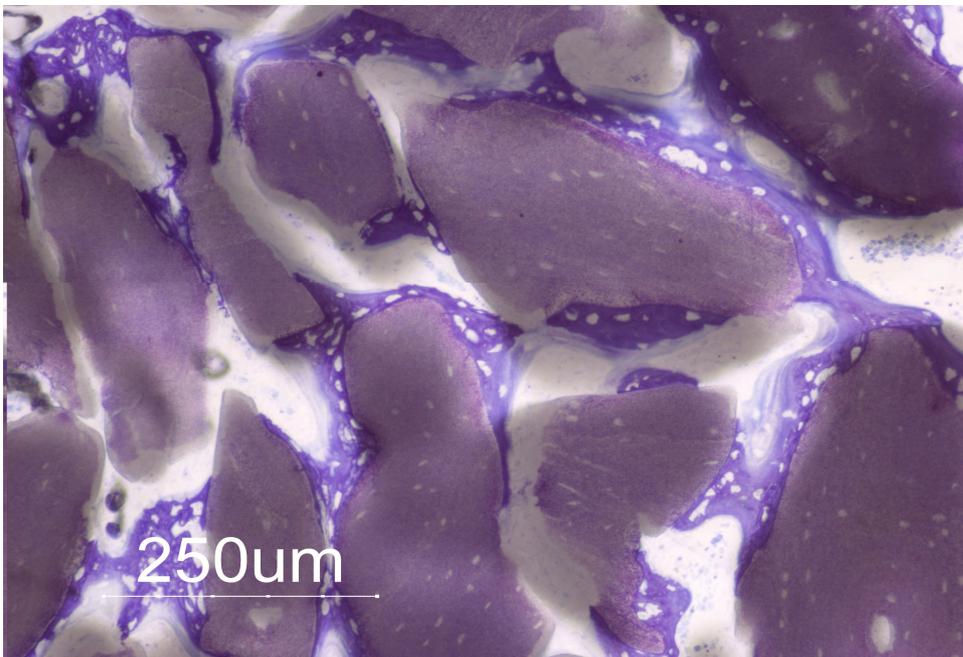


Figura 24. Aspecto da rede de trabéculas ósseas, formadas por tecido imaturo, presente aos quinze dias envolvendo e ligando as partículas entre si.

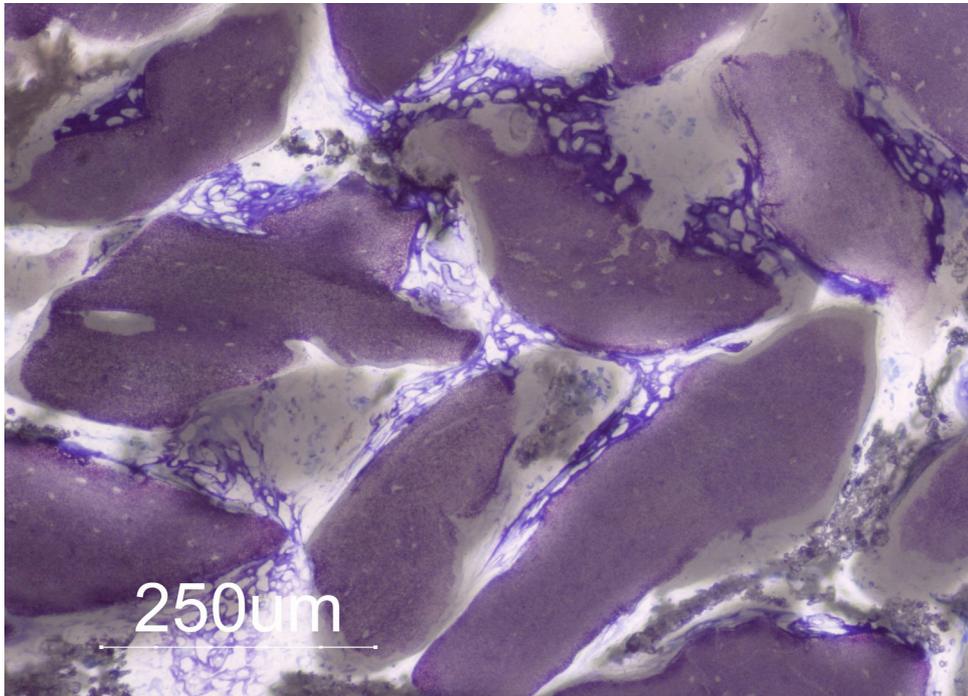


Figura 25. Partículas de ABM/P-15 revestidas por um tecido ósseo muito imaturo formado por aposição directa à superfície deste material. São ainda visíveis áreas de tecido conjuntivo laxo e zonas de fibrina ocupando muito dos espaços inter-partículas.

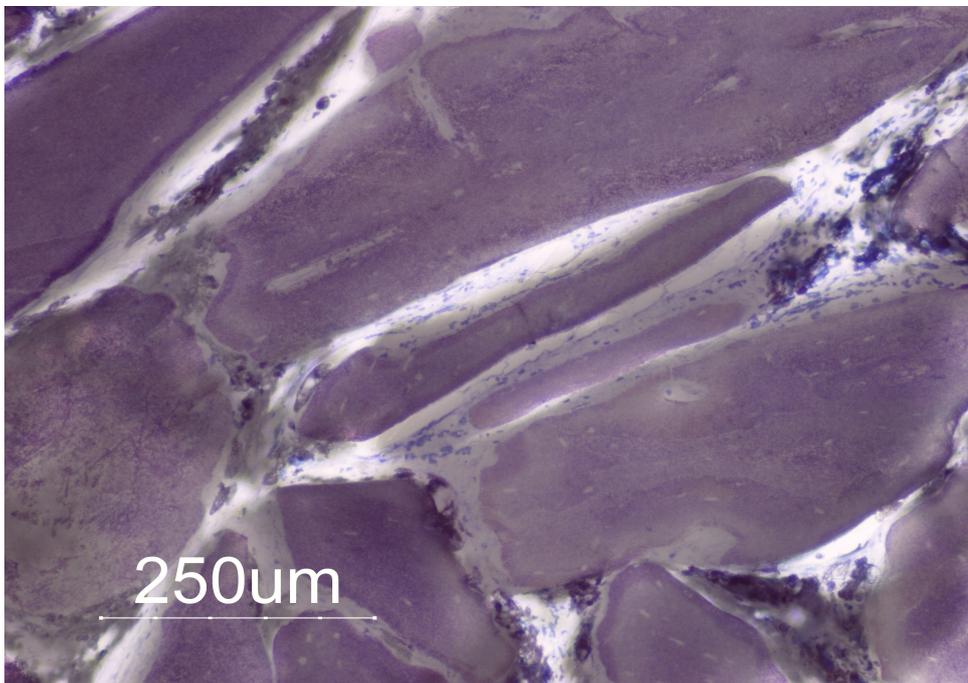


Figura 26. Imagem da área central de um defeito, com quinze dias, ocupada por partículas envolvidas apenas por tecido conjuntivo com uma elevada densidade celular.

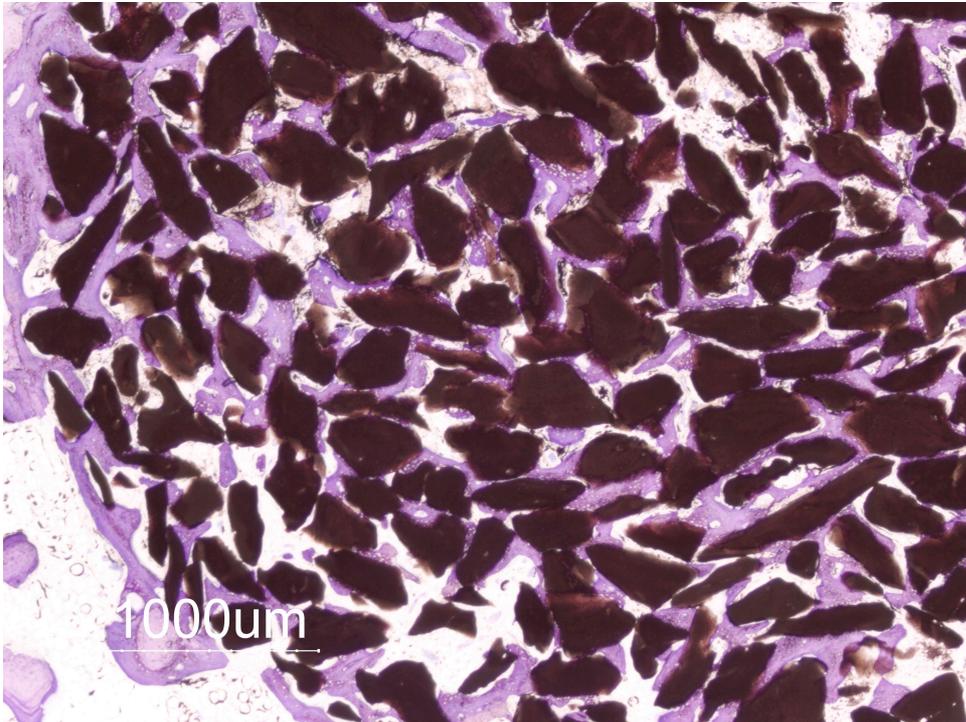


Figura 27. Corte histológico de um defeito ósseo preenchido com ABM/P-15, aos trinta dias, mostrando uma rede de trabéculas ósseas ocupando praticamente todo o defeito.

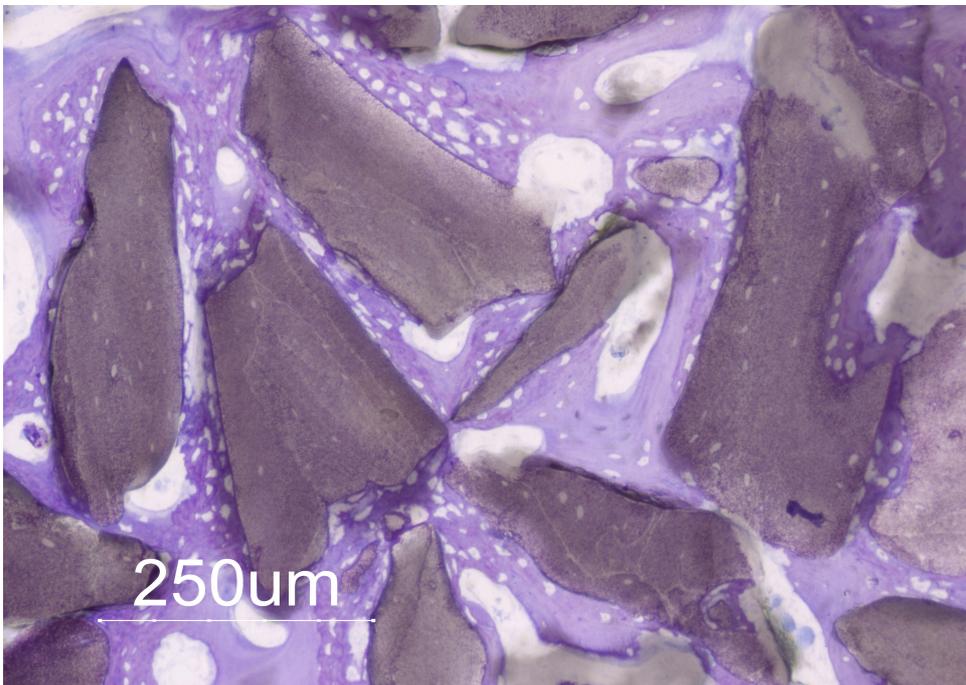


Figura 28. Aspecto do processo de osteointegração das partículas de ABM/P-15, aos trinta dias, estabelecendo um *continuum* formado por tecido ósseo e material.

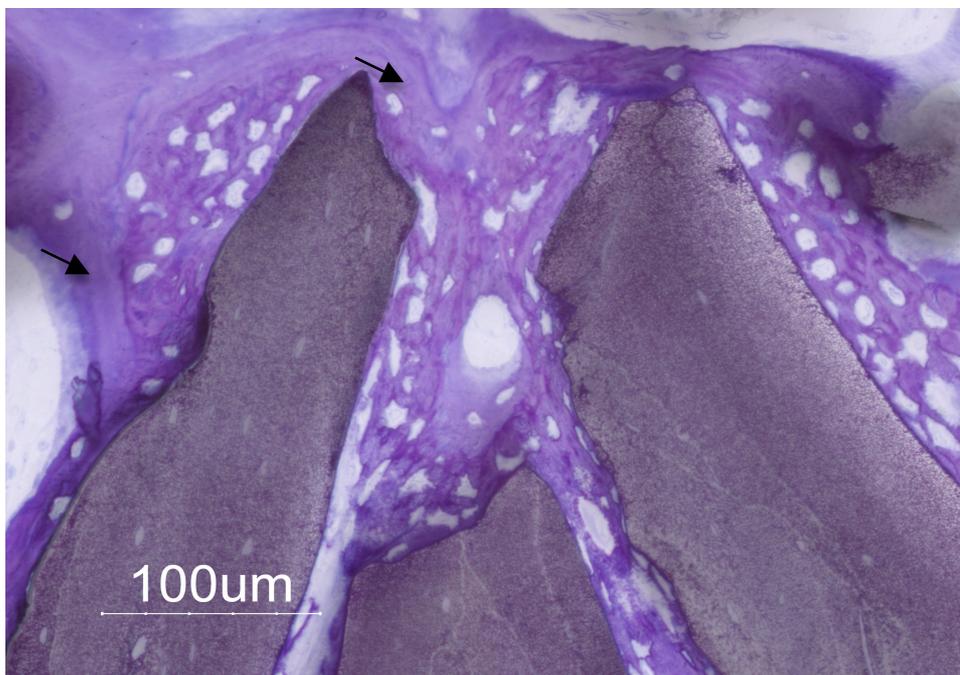


Figura 29. Maior ampliação duma zona representada na figura 28, pondo em evidência o revestimento directo das partículas com tecido ósseo imaturo. É ainda possível observar o aparecimento de algumas áreas de tecido lamelar (setas), situadas na periferia do tecido imaturo, contribuindo para um espessamento da rede trabecular.

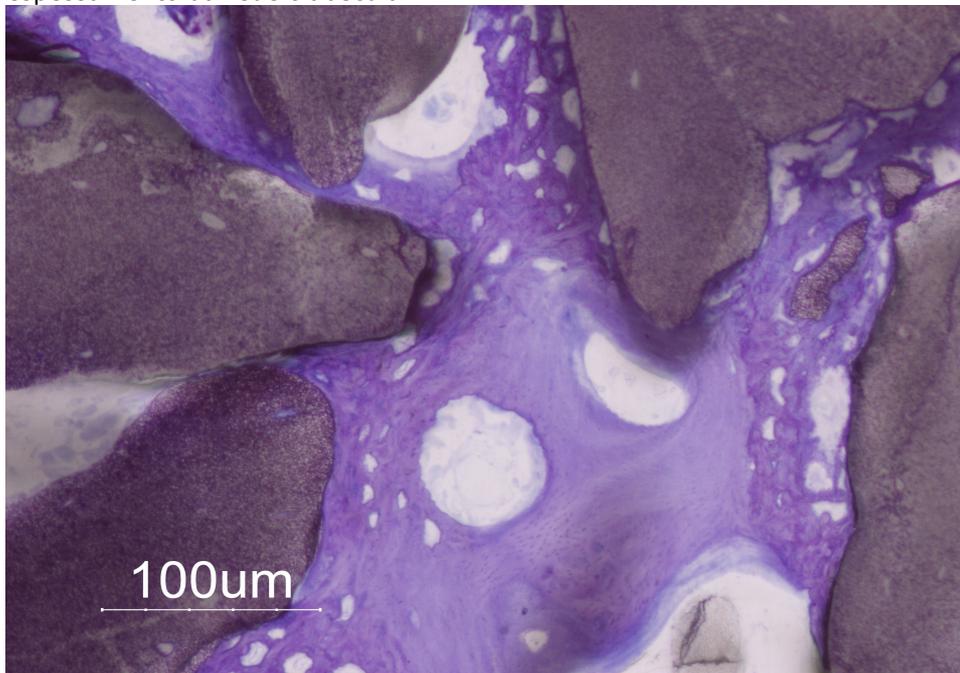


Figura 30. Maior ampliação duma zona representada na figura 28, mostrando a presença de um tecido ósseo lamelar, ligando diferentes áreas de tecido ósseo imaturo e de partículas, preenchendo e reduzindo gradualmente os espaços inter-particulares.

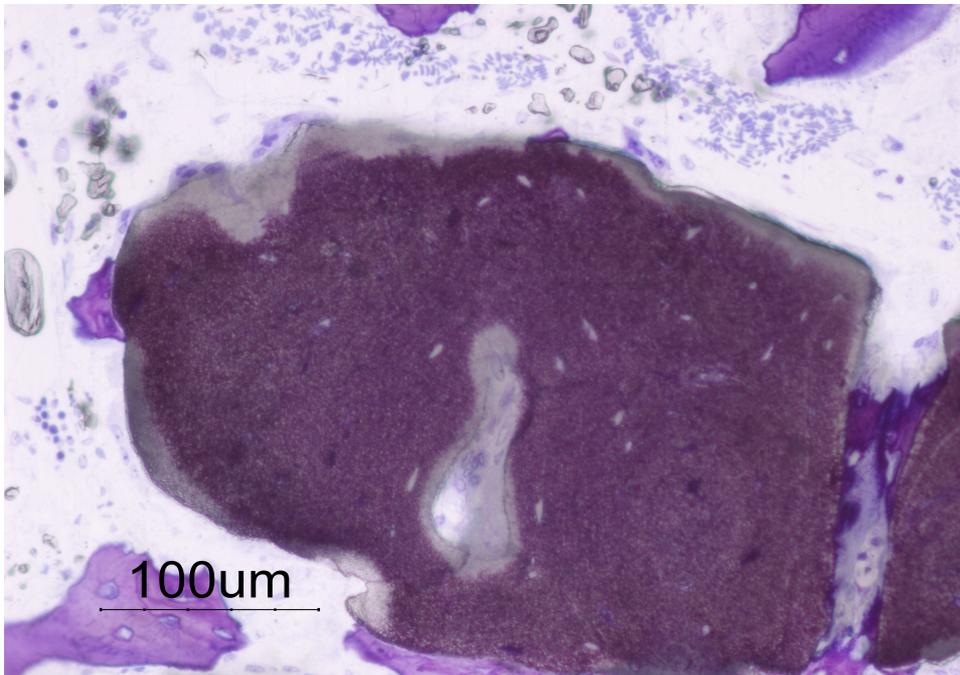


Figura 31. Imagem sugestiva de um cone de reabsorção resultante da actividade osteoclástica no interior de um canal de Havers visível numa partícula de ABM/P-15. É ainda possível detectar a presença de osteoclastos à superfície desta partícula, contribuindo para o seu desgaste e fragmentação.

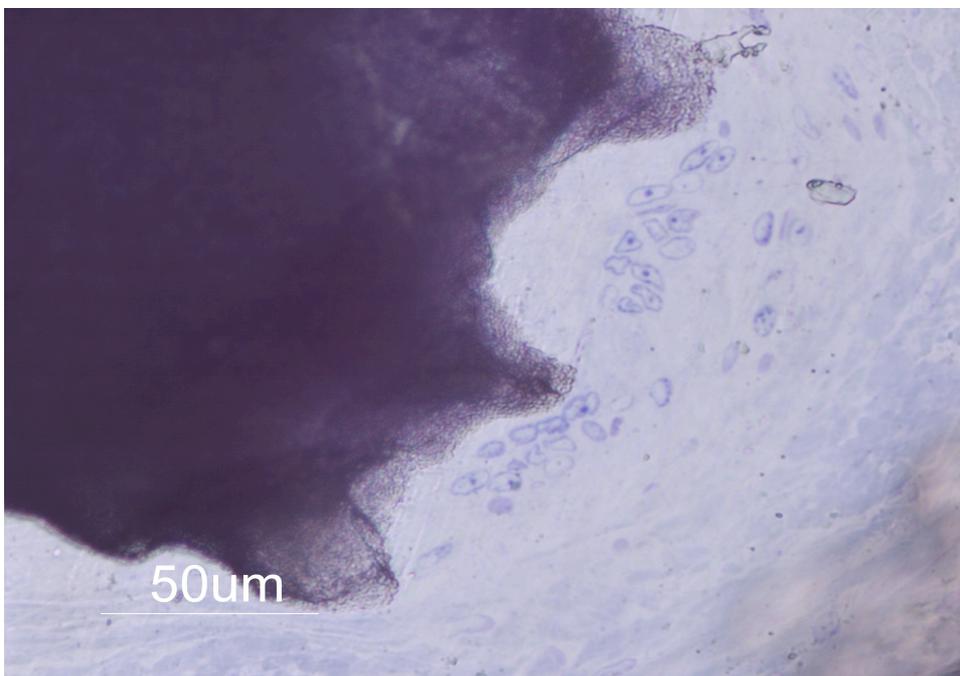


Figura 32. Fenómenos de reabsorção osteoclástica, observadas aos trinta dias, na periferia de uma das partículas de ABM/P-15 levando à sua desmineralização, desgaste e degradação. É visível ainda a existência de lacunas de Howship e a presença de osteoclastos.

3.3. Grupo III - Defeitos preenchidos com partículas de mineral anorgânico bovino-derivado numa matriz de hidrogel de carboximetilcelulose /glicerol (ABM/P-15/CMC)

a) Duas semanas

Nos defeitos preenchidos com partículas de AMB/P-15 suspensas numa matriz de hidrogel inerte (carboximetilcelulose /glicerol) era evidente uma menor concentração de partículas (Fig. 33), em comparação com os resultados obtidos apenas com as partículas AMB/P-15. Para além disso, foi possível constatar a migração das partículas (Fig. 33), que se mostravam relativamente dispersas com amplos espaços entre si, ou agrupadas em pequenos aglomerados sem continuidade com o resto do defeito, ou ainda, pura e simplesmente agrupadas à periferia do defeito, havendo na zona central poucas partículas. Esta migração, em alguns casos levou ao alojamento de partículas na cavidade medular da diáfise e nas zonas subperiósticas.

Aos quinze dias, estes defeitos mostraram uma menor formação de novo osso, em relação ao ABM/P-15 particulado, sendo apenas detectadas algumas espículas ósseas nas margens do defeito, ficando muito aquém da zona central. Assim, nestas zonas periféricas era visível a presença de trabéculas ósseas constituídas essencialmente por tecido ósseo imaturo (Figs. 34 e 35), formado essencialmente por um processo de ossificação intramembranoso. Contudo, em alguns casos, foi possível observar a existência de algumas zonas de tecido lamelar e osteóide, sobretudo localizadas junto às partículas que ficaram mais perto da parede do defeito. Por outro lado, em áreas intermédias do defeito, com menor vascularização, identificaram-se, alguns aspectos característicos de ossificação endocondral ainda com condrócitos hipertrofiados.

Nas zonas centrais, para além das partículas, verifica-se a existência de tecido conjuntivo laxo com poucos vasos sanguíneos e áreas de fibrina (Fig. 36), sendo a formação de novo osso praticamente insignificante.

b) Quatro semanas

As imagens registadas aos trinta dias, apresentam um padrão muito semelhante aos dos quinze dias, mantendo-se a dispersão e migração aleatória das partículas (Fig. 37).

Neste segundo período experimental, a deposição de novo osso efectuou-se de forma pouco uniforme, seguindo a distribuição heterogénea dos grânulos do material, sendo predominante nas áreas em redor dos

conjuntos de partículas que se localizavam nas margens do defeito (Fig. 38). A maioria das trabéculas ósseas que envolviam os agregados de partículas continuava a apresentar características de um tecido imaturo desorganizado, observando-se a coexistência de processos de ossificação intramembranosa e endocondral. Apenas, nalgumas zonas mais periféricas, contíguas às margens do defeito, foi possível identificar osso lamelar com algum grau de maturação. Para além disso, foi igualmente visível uma intensa actividade osteoclástica, num processo de reabsorção, particularmente evidente na superfície das partículas mais expostas.

Nas zonas centrais do defeito, os agregados de partículas ainda presentes estavam maioritariamente rodeados por tecido fibroso sem promoção de neoformação óssea.

Em síntese, o conjunto de imagens apresentado mostra que esta formulação ao permitir uma dispersão e migração das partículas de ABM/P-15, não parece promover a formação de trabéculas ósseas para além das zonas periférica do defeito nem a sua maturação.

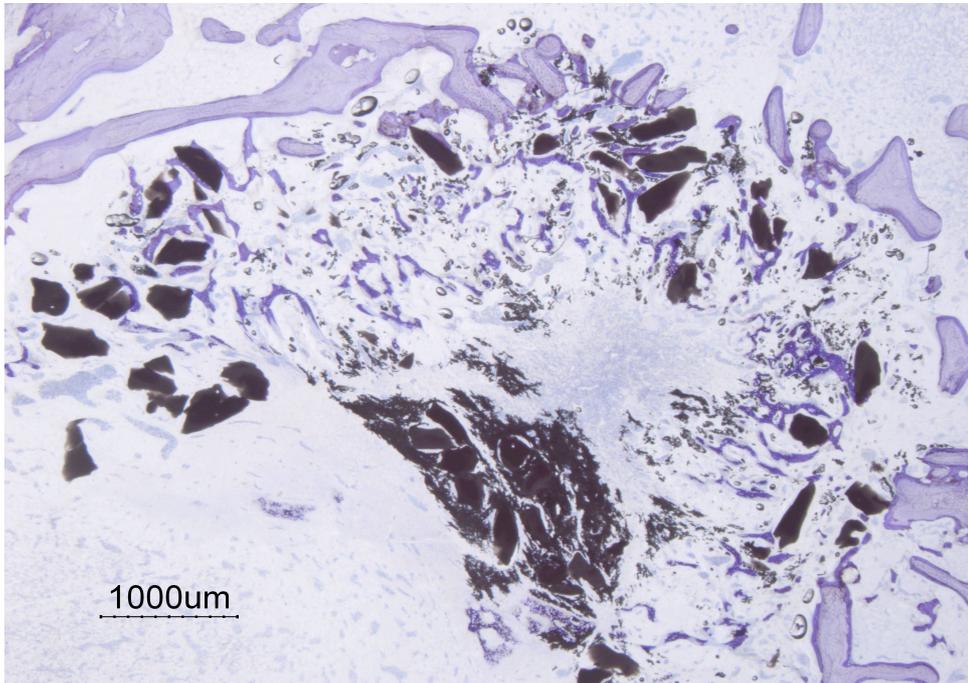


Figura 33. Imagem de um defeito preenchido com ABM/P-15/CMC, com quinze dias de evolução, sendo evidente uma certa dispersão e migração das partículas.

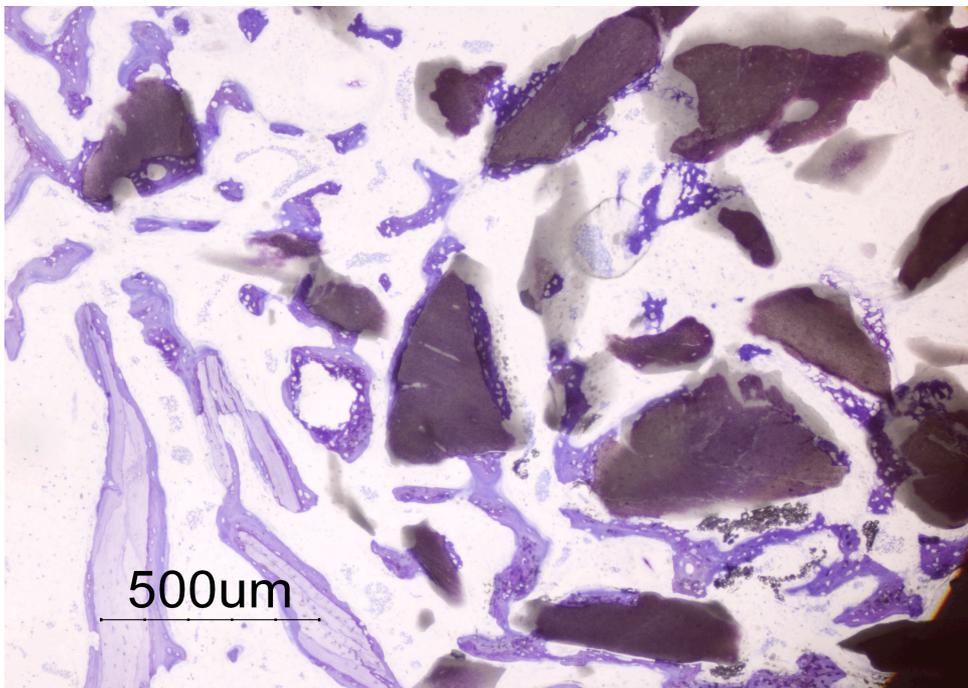


Figura 34. Aspecto da periferia de um dos defeitos, também com quinze dias, mostrando a existência de zonas de tecido ósseo formando algumas trabéculas e envolvendo algumas partículas separadas, no entanto por grandes áreas de tecido conjuntivo.

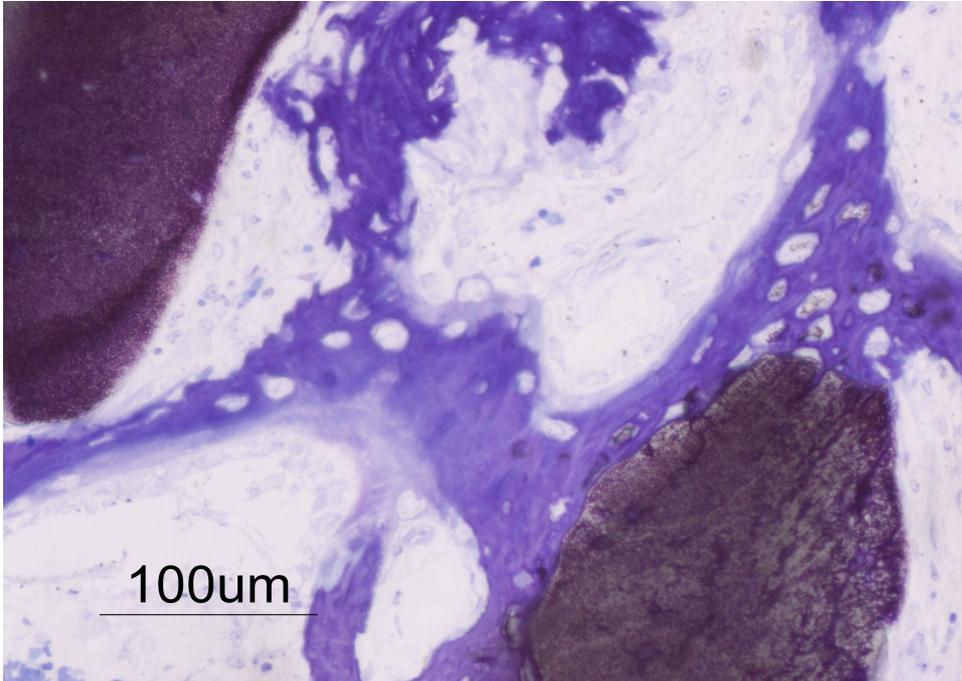


Figura 35. Aspecto da formação de tecido ósseo imaturo revestindo e ligando algumas partículas, aos quinze dias.



Figura 36. Imagem de região central de um defeito, aos quinze dias, mostrando apenas partículas e tecido conjuntivo.

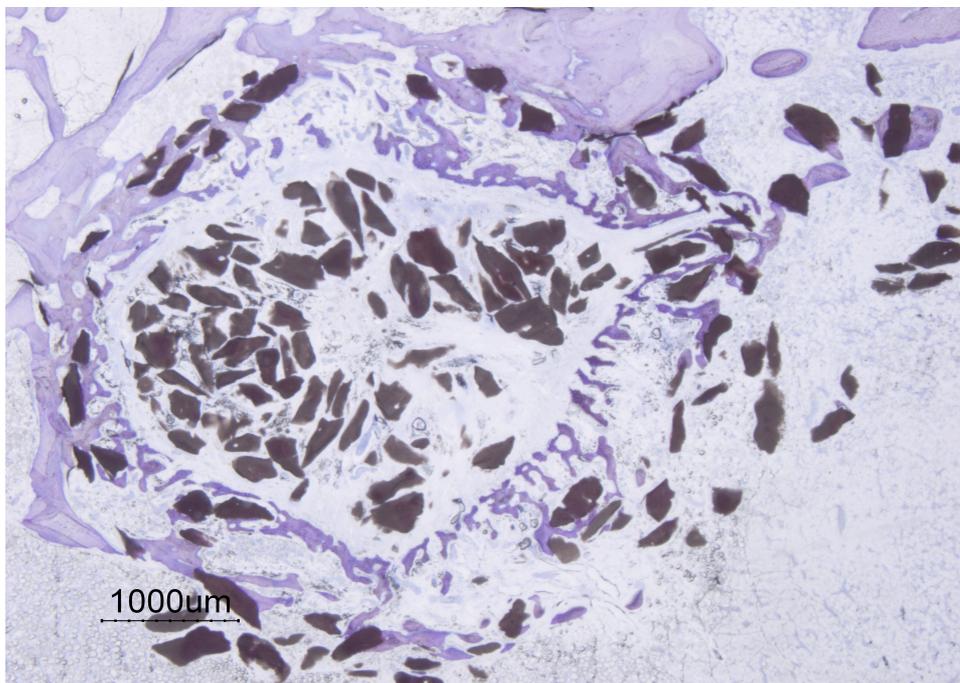


Figura 37. Defeito com trinta dias de evolução apresentando, tal como aos quinze dias, uma dispersão e alguma migração das partículas. É ainda possível verificar que a formação de tecido ósseo estava bastante confinada às regiões periféricas.



Figura 38. Margem de um defeito, com trinta dias de evolução, mostrando ainda a presença de muito tecido ósseo imaturo.

3.4. Grupo IV - Defeitos preenchidos com partículas de mineral anorgânico bovino-derivado numa matriz de hidrogel de Hialuronato de Sódio (ABM/P-15/Hy)

a) Duas semanas

Nos defeitos preenchidos com partículas, de ABM/P-15 suspensas numa matriz de hidrogel inerte (hialuronato de sódio) foi, mais uma vez, evidente a existência de uma fraca concentração de partículas, aliada a uma certa tendência para a sua migração (Fig. 39), aspecto muito semelhante ao encontrado anteriormente com o ABM/P-15 numa matriz de CMC.

Para além da distribuição irregular das partículas foi notória aos quinze dias uma deposição de novo osso, formando numerosas trabéculas com uma orientação centrípeta, mas sem atingir a zona mais central do defeito (Fig. 39). Tal como se observou nos grupos anteriores, as trabéculas ósseas que se apresentavam numa fase de maturação mais adiantada estavam geralmente associadas a áreas de maior concentração de partículas e situadas mais periféricamente. De facto, nas zonas periféricas era visível a presença de trabéculas ósseas mais desenvolvidas, constituídas já por algumas áreas de tecido ósseo lamelar e osteóide (Figs. 40 e 41).

Nas áreas de transição para a parte mais central do defeito, observou-se um nítido padrão de ossificação endocondral traduzido pela presença de condrócitos hipertrofiados e regiões de matriz cartilaginosa calcificada (Fig. 42).

A zona central do defeito está ainda e apenas constituída por tecido conjuntivo laxo e escasso número de partículas, apresentando, também, um menor grau de vascularização em relação às áreas periféricas.

O conjunto de imagens apresentado mostra, nesta fase, que nos processos de osteogénese em causa, os mecanismos de ossificação intramembranosa e endocondral concorrem em simultâneo e em contínuo, dependendo do suprimento sanguíneo e da localização espacial no defeito.

b) Quatro semanas

Aos trinta dias, o padrão de distribuição das partículas continua muito semelhante ao período anterior, com uma dispersão aleatória das partículas e com grandes espaçamentos entre si (Fig. 44).

Neste período experimental, continuava a existir uma grande densidade de trabéculas ósseas, sendo mais espessas e com um maior grau de

maturação e organização, do que aos quinze dias, aproximando-se bastante da arquitectura normal do osso trabecular (Fig. 45).

Com frequência, nas zonas mais intermédias, as trabéculas ósseas apresentavam ainda um eixo de matriz cartilaginosa.

Nas áreas centrais, nota-se o aparecimento de um tecido conjuntivo moderadamente denso, com alguns vasos sanguíneos, sendo também bastante baixa a densidade de partículas aqui localizadas.

Em síntese, esta formulação permitiu em relação à anterior, uma regeneração óssea mais completa e mais rápida. Registou-se todavia, uma certa tendência para a migração das partículas. A deposição de tecido ósseo seguiu e acompanhou a distribuição das partículas atingindo as trabéculas óssea de formação recente num razoável grau de maturação, tanto na zona periférica como intermédia e em particular em redor das partículas.

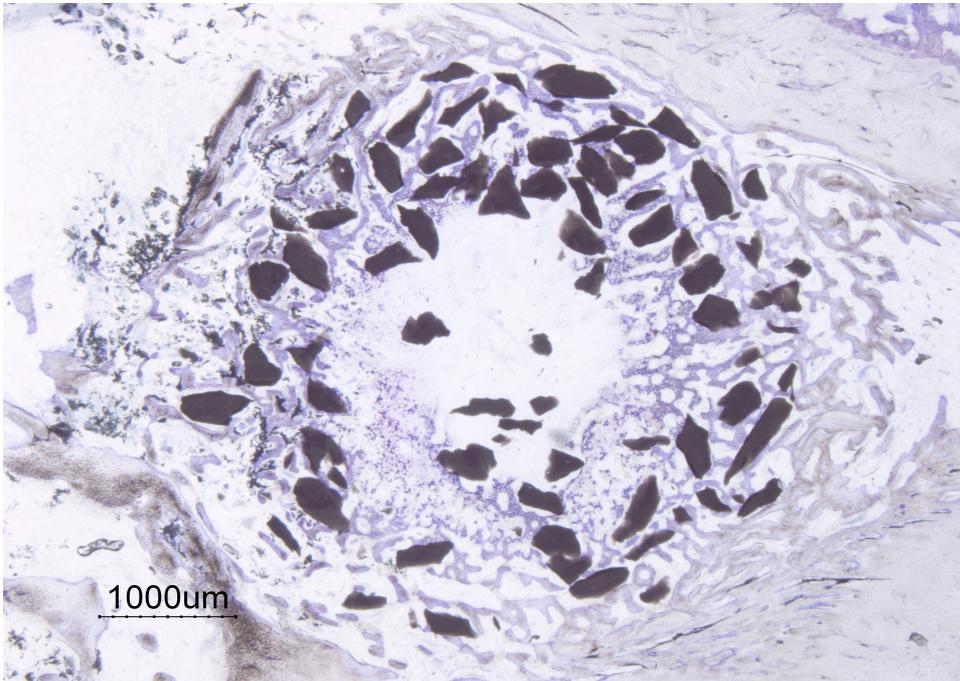


Figura 39. Defeito preenchido com ABM/P-15 numa matriz Hy mostrando a distribuição e localização das partículas e a disposição das trabéculas ósseas que as acompanham, aos quinze dias de evolução.

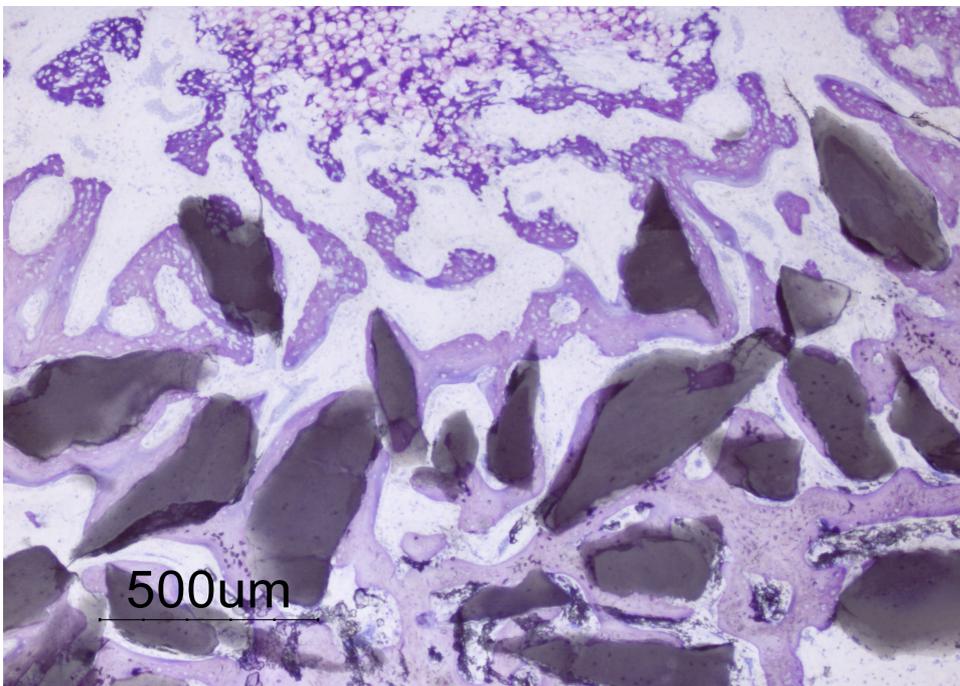


Figura 40. Presença de um nítido gradiente de maturação das trabéculas ósseas em função da quantidade de partículas presente e da localização espacial no defeito. Nota-se um maior grau de maturação óssea na periferia e nas zonas de maior densidade de partículas.

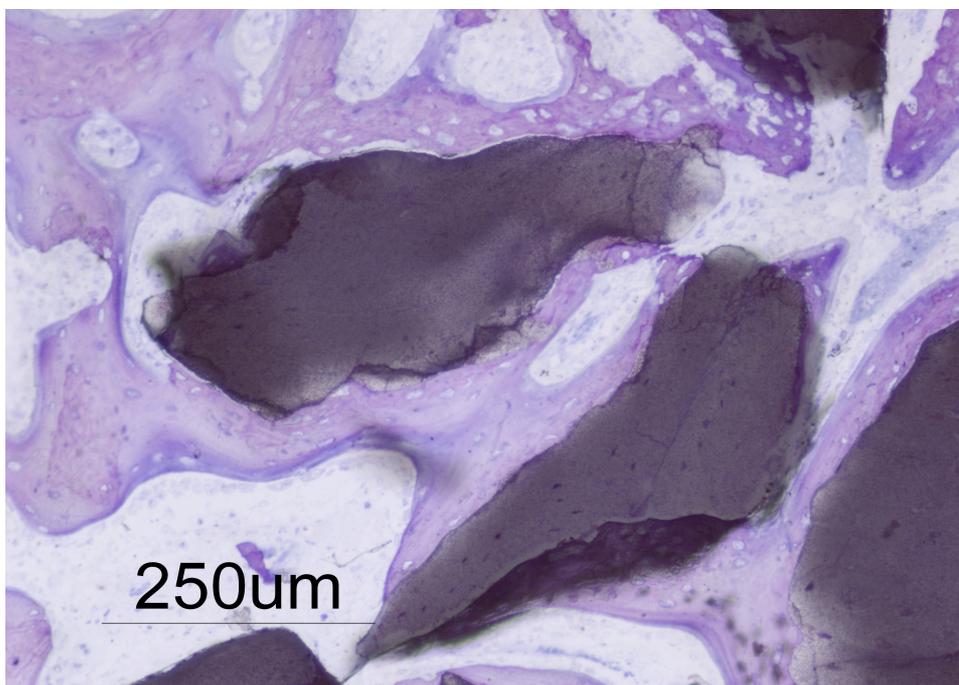


Figura 41. Maior ampliação de uma zona representada na figura anterior, pondo em evidência a presença de tecido imaturo, directamente em contacto com as partículas, áreas de reabsorção (setas) e zonas de tecido lamelar ainda com osteóide e osteoblastos activos.

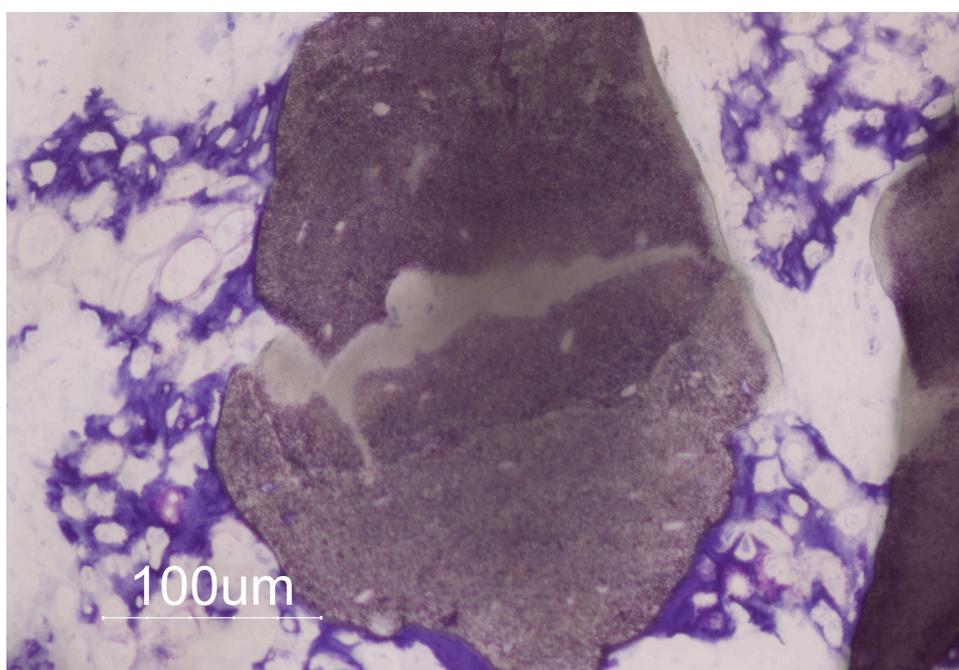


Figura 42. Imagem de um padrão de ossificação endocondral, mostrando condrócitos hipertrofiados e regiões de matriz calcificada em redor de uma partícula ABM/P-15 em nítido processo de fragmentação.

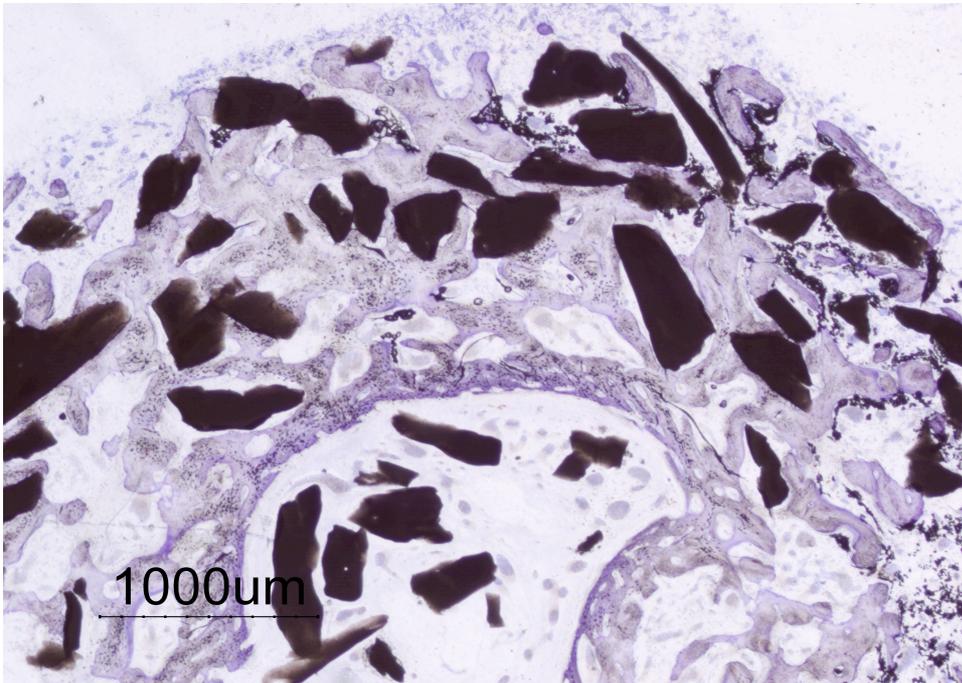


Figura 43. Distribuição e localização das partículas num defeito com trinta dias de evolução. É também visível uma rede de trabéculas ósseas orientadas em direcção ao centro do defeito, mas ainda sem o alcançar.

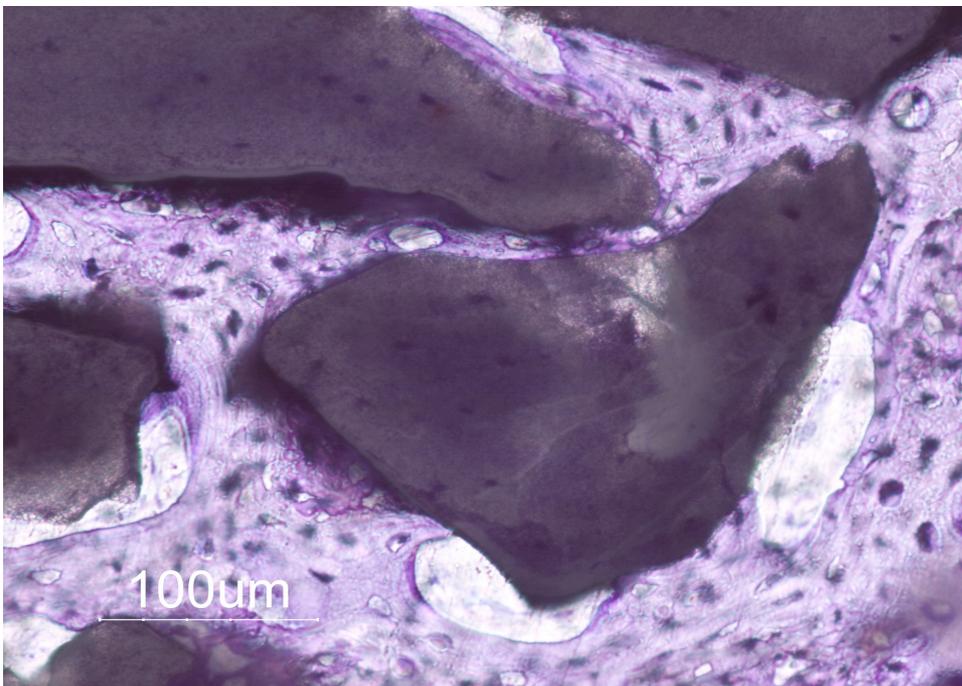


Figura 44. Organização do tecido ósseo presente nas trabéculas situadas junto à margem de um defeito preenchido com ABM/P-15/Hy, com trinta dias, aproximando-se bastante da normal e vital arquitectura óssea.

3.5. Grupo V - Defeitos preenchidos com partículas de mineral anorgânico bovino - derivado numa matriz de hidrogel de Hialuronato de Sódio liofilizado (ABM/P-15/Hy lio)

a) Duas semanas

Os defeitos preenchidos com uma suspensão de partículas de AMB/P-15 numa matriz de hidrogel inerte (hialuronato de sódio) liofilizada evidenciaram uma distribuição bem mais homogénea (Fig. 45) do que a observada no grupo IV, sem contudo atingir a concentração de partículas registada nos defeitos preenchidos só com AMB/P-15.

Aos quinze dias, na zona periférica do defeito, o padrão de distribuição de novo osso foi muito semelhante ao descrito para as partículas de AMB/P-15/Hy, mantendo a mesma orientação centrípeta. Porém, neste período já existiam muitas trabéculas ósseas contendo áreas de tecido lamelar (Figs. 45, 46 e 47), aspecto até aqui pouco frequente aos quinze dias. Em paralelo, podem também observar-se muitos sinais de actividade osteoclástica quer no tecido ósseo imaturo, quer nas partículas de ABM/P-15 (Fig. 48).

De igual modo foi possível identificar padrões de ossificação intramembranosa (Fig. 49) e endocondral (Fig. 50) que competiam entre si, sendo o perfil da ossificação endocondral mais visível nas zonas menos vascularizadas e mais longe das margens do defeito.

b) Quatro semanas

Aos trinta dias, continua a verificar-se uma razoável uniformidade na distribuição das partículas, sem grandes espaçamentos ou migrações visíveis (Fig. 51).

Neste período experimental, existe uma grande densidade de trabéculas ósseas, notando-se que as localizadas na parte periférica do defeito são muito mais espessas e com um maior grau de organização e maturação (Figs. 52 e 53), do que as observadas aos quinze dias, sendo muito semelhantes a qualquer tecido ósseo esponjoso.

Estas áreas de tecido ósseo formam uma forte unidade e coesão com as partículas, o que reflecte um bom processo de osteointegração deste do material.

Numa maior ampliação é possível detectar sinais de um intenso processo de remodelação óssea, traduzido por inúmeras linhas de reversão, em paralelo com um gradual desaparecimento das áreas de tecido ósseo imaturo (Figs. 54 e 55). Simultaneamente, foi possível detectar uma grande

actividade osteoclástica de reabsorção das partículas. Aqui interessa salientar a presença de zonas de tecido conjuntivo laxo em redor de algumas partículas (Figs. 53, 54 e 55). Estas regiões representam os locais onde se localizavam, normalmente, aos quinze dias, as áreas de tecido ósseo imaturo. Estas zonas, quando observadas numa maior ampliação, mostram a presença de grande quantidade de células da linha osteoblástica e osteoclástica.

Na zona central, observa-se geralmente a persistência de um tecido conjuntivo moderadamente denso, com alguns vasos sanguíneos, apesar da densidade de partículas aqui localizadas.

Porém, como se pode observar pelas figuras apresentadas aos trinta dias, a grande parte do tecido ósseo (Fig. 56) existente rapidamente atingiu um aspecto muito próximo da normal e vital microarquitECTURA óssea.

Em síntese, esta formulação ao oferecer uma maior concentração de partículas e maior estabilidade no defeito, possibilitou uma regeneração óssea ainda mais completa do que a anterior, não liofilizada, com uma perfeita osteointegração das partículas. O tecido ósseo presente nas trabéculas apresentava uma constituição histológica e uma dinâmica funcional de remodelação muito semelhante a qualquer outro tecido ósseo esponjoso.

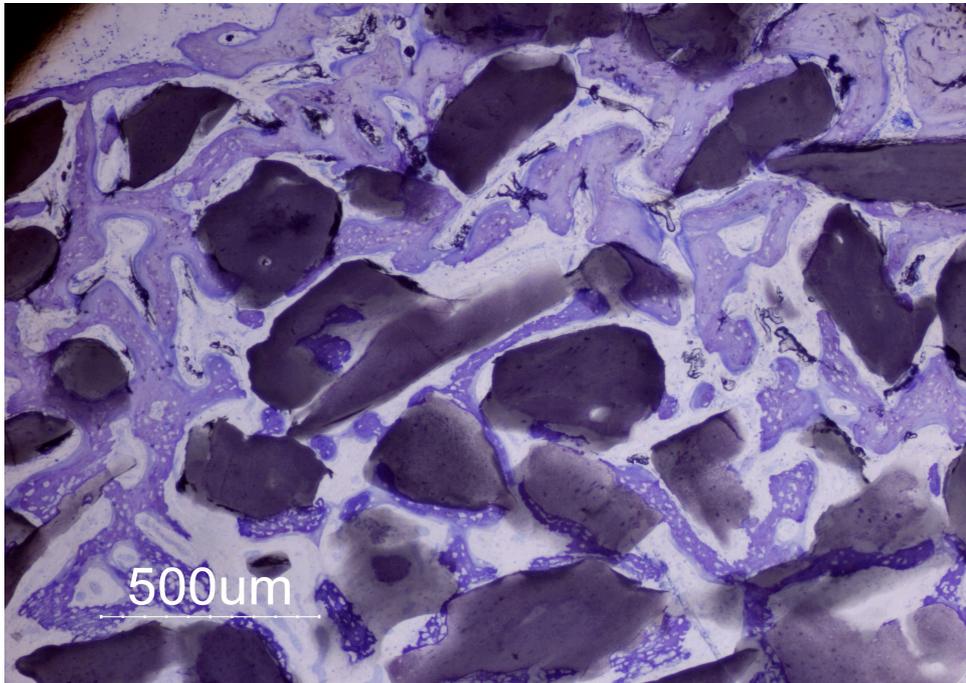


Figura 45. Imagem de um defeito preenchido com ABM/P-15/Hy lo, com quinze dias de evolução, mostrando uma grande densidade de partículas osteointegradas num tecido ósseo, que já mostra muitas áreas de tecido lamelar.

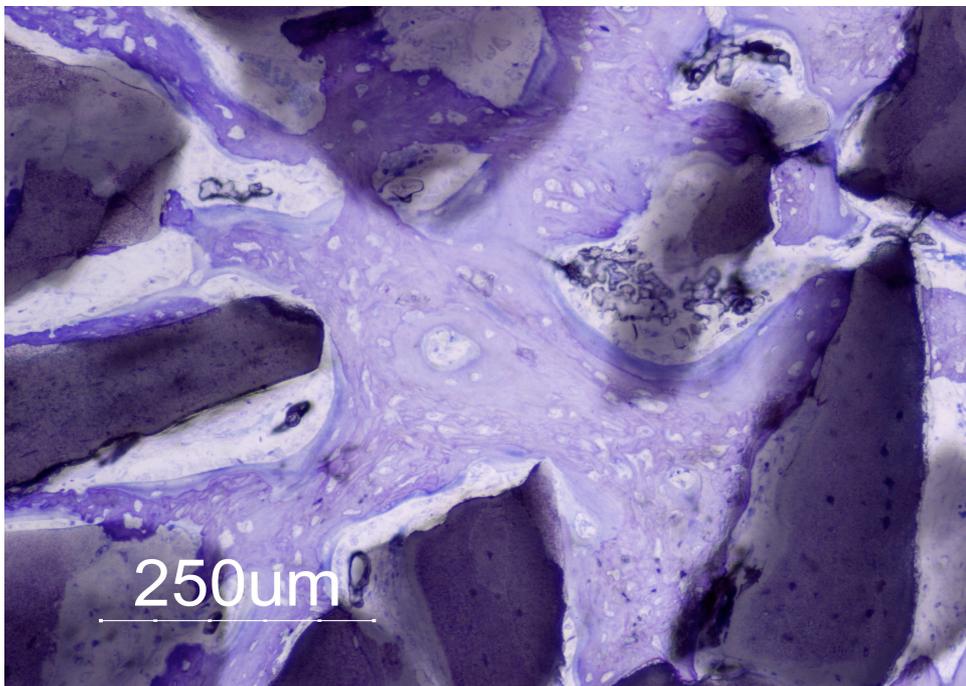


Figura 46. Trabéculas ósseas constituídas por grandes áreas de tecido imaturo revestido já por tecido lamelar com abundante osteóide e presença de osteoblastos.

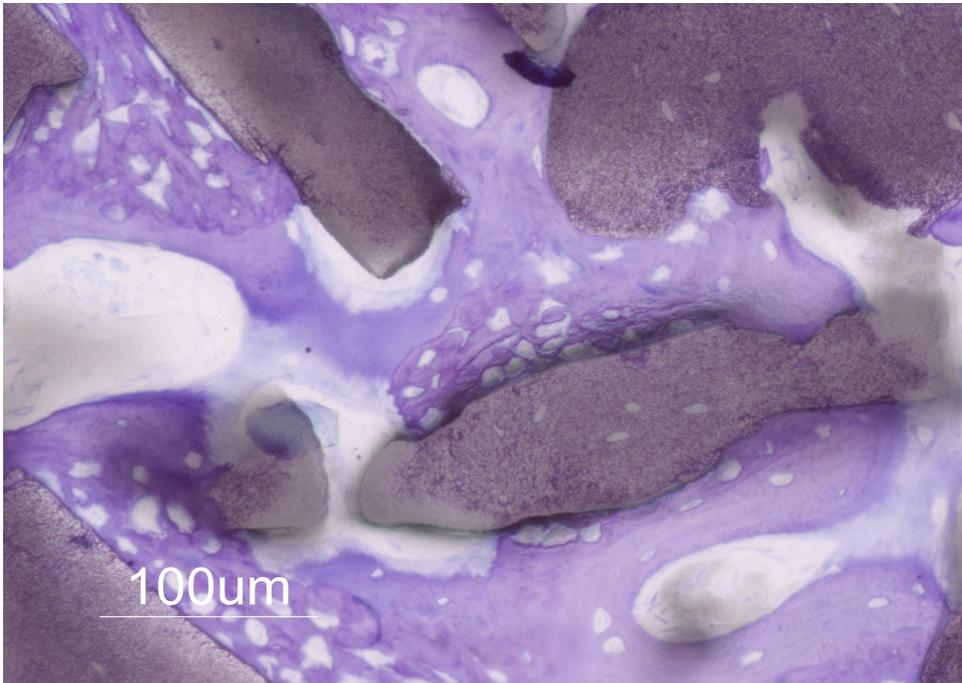


Figura 47. Aparecimento aos quinze dias de muitas zonas de tecido ósseo lamelar, ligando áreas de tecido imaturo e partículas. Começam já a esboçar-se alguns sistemas de Harvers.

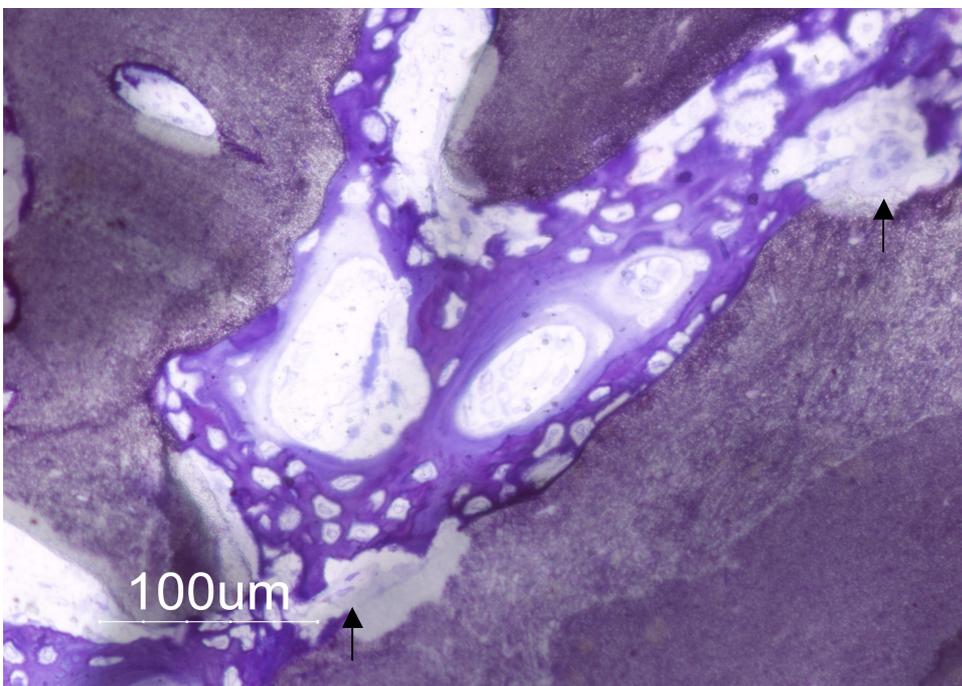


Figura 48. Sinais de reabsorção óssea, alguns ainda com a presença de osteoclastos (setas), observados, aos quinze dias, quer em zonas de tecido imaturo, quer nas próprias partículas em paralelo com áreas de formação óssea.

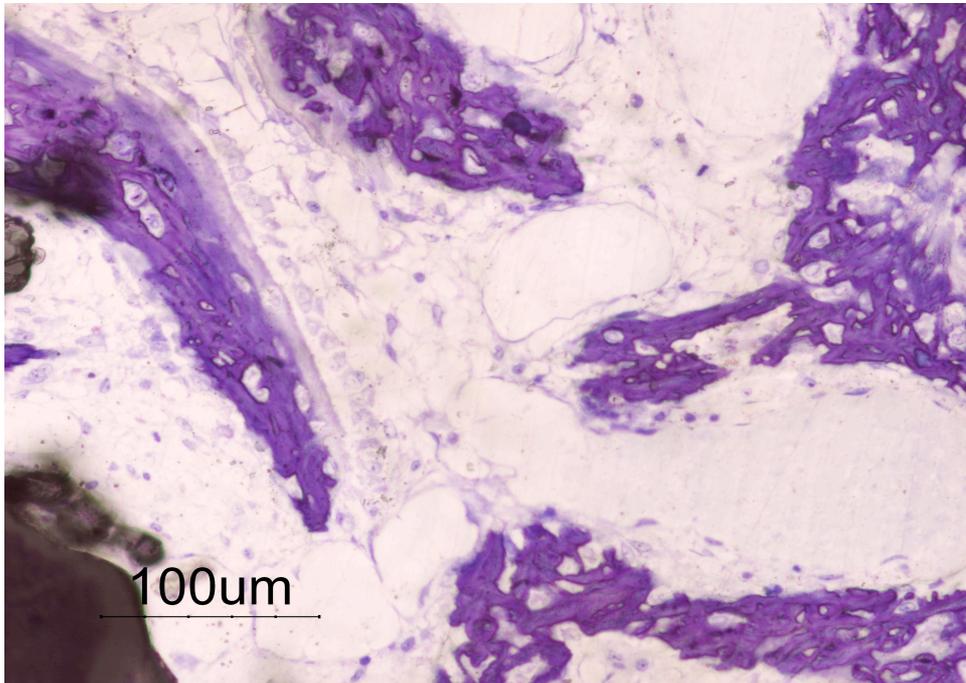


Figura 49. Imagem de um processo de ossificação intramembranosa, com formação de trabéculas de tecido ósseo imaturo, onde ainda é possível observar osteoblastos e osteóide, separadas por um tecido conjuntivo laxo muito vascularizado.

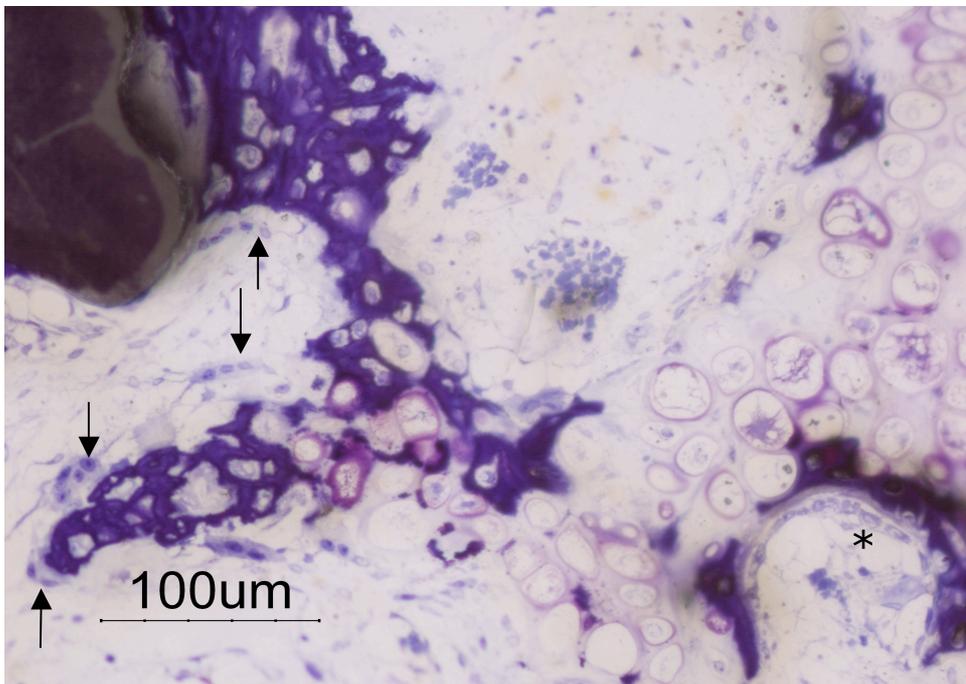


Figura 50. Aspecto de um nítido processo de ossificação endocondral, com condrócitos hipertrofiados e regiões de matriz cartilaginosa calcificada, em contínuo com trabéculas ósseas de origem intramembranosa. São também visíveis numerosos osteoclastos (setas) e áreas com um epitélio osteóide (*).

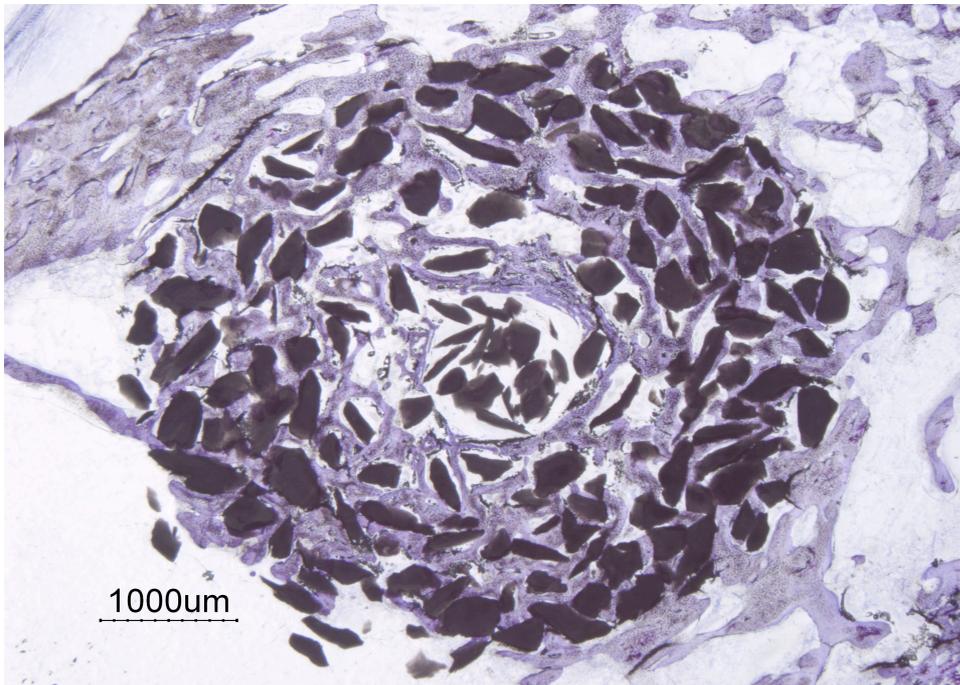


Figura 51. Defeito preenchido com ABM/P-15/Hy lio, aos trinta dias de evolução, mostrando a distribuição e localização das partículas e a disposição e alcance das trabéculas ósseas que as acompanham.

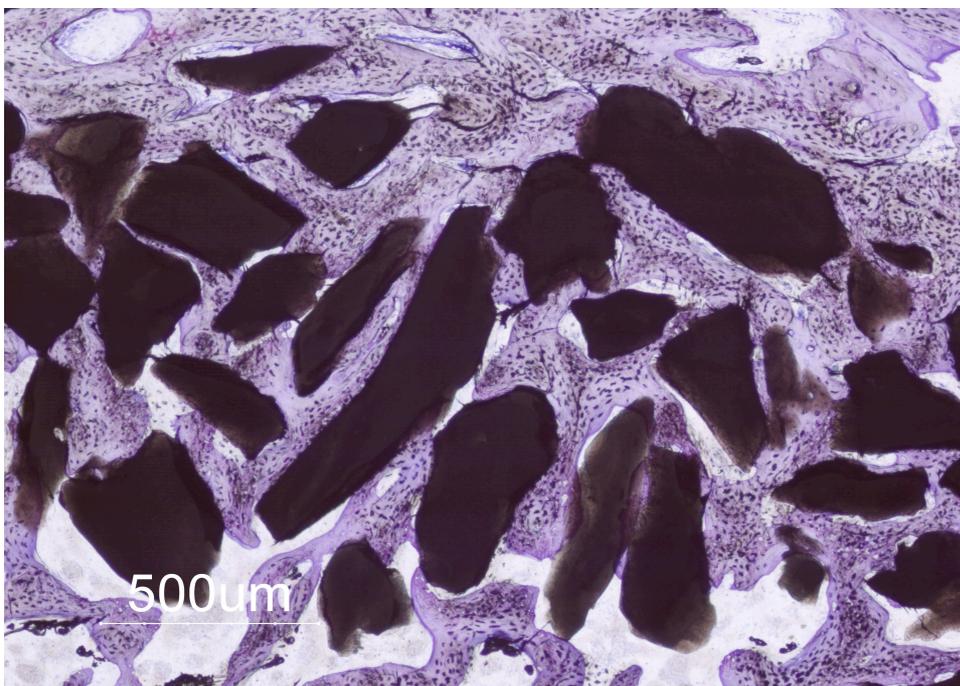


Figura 52. Aspecto da osteointegração das partículas de ABM/P-15/Hy lio, observadas aos trinta dias, formando uma forte unidade e coesão entre tecido ósseo e material. De notar ainda, uma redução dos espaços inter-trabéculares em relação aos quinze dias.

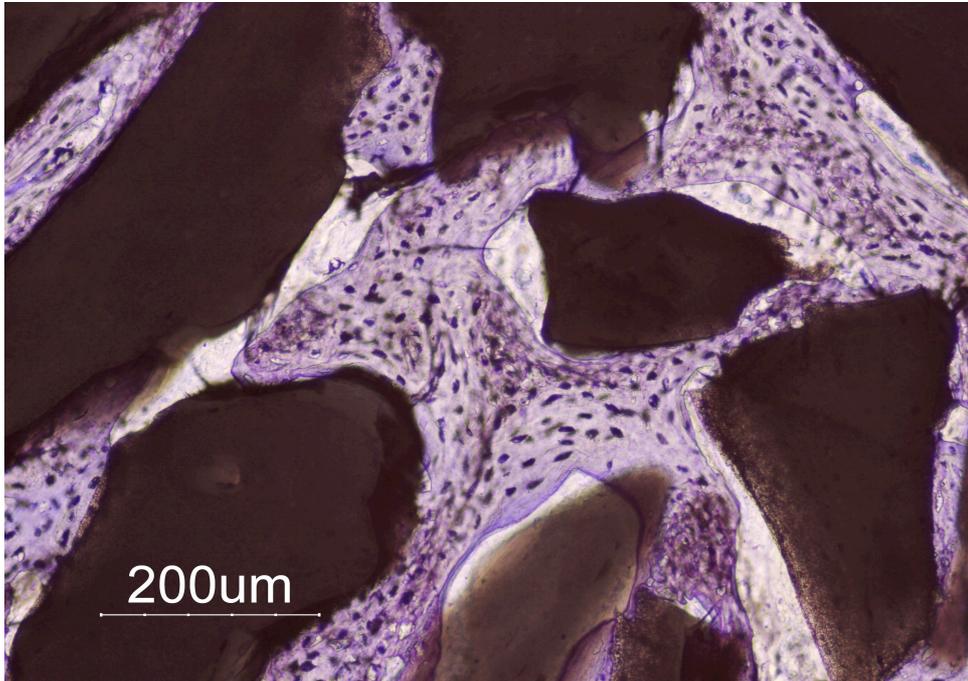


Figura 53. Maior ampliação da uma zona representada na zona anterior, pondo em evidência a constituição histológica das trabéculas ósseas, maioritariamente formadas por lamelas, com escassas áreas de tecido imaturo, aspecto muito semelhante a qualquer tecido ósseo esponjoso.

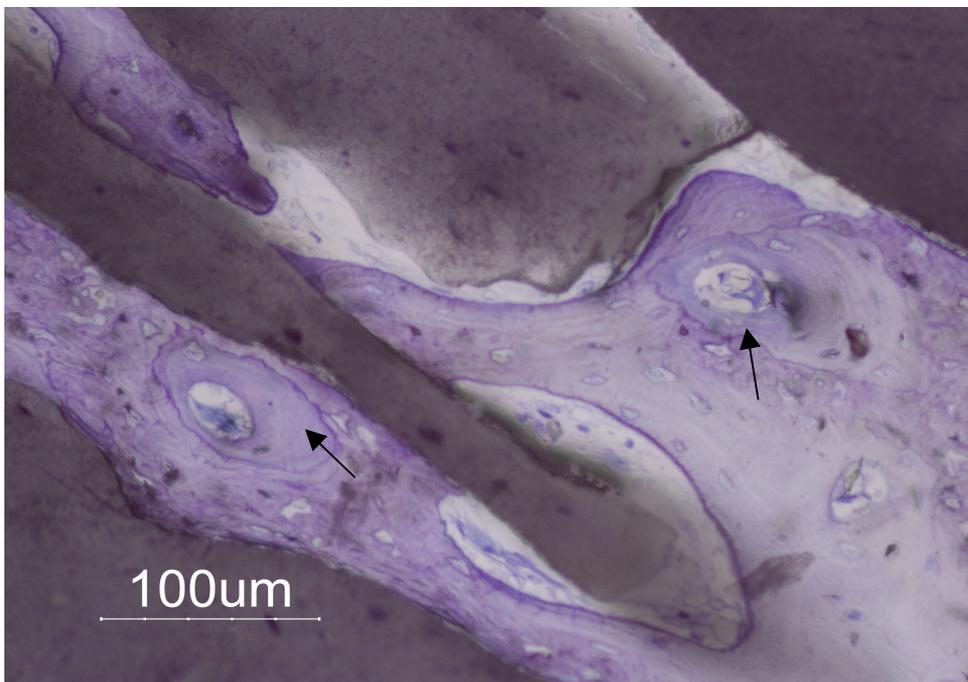


Figura 54. Imagens de intensa remodelação trabecular com reabsorção do tecido imaturo e sua substituição por tecido lamelar. De salientar, o aparecimento de sistemas de Havers (setas).

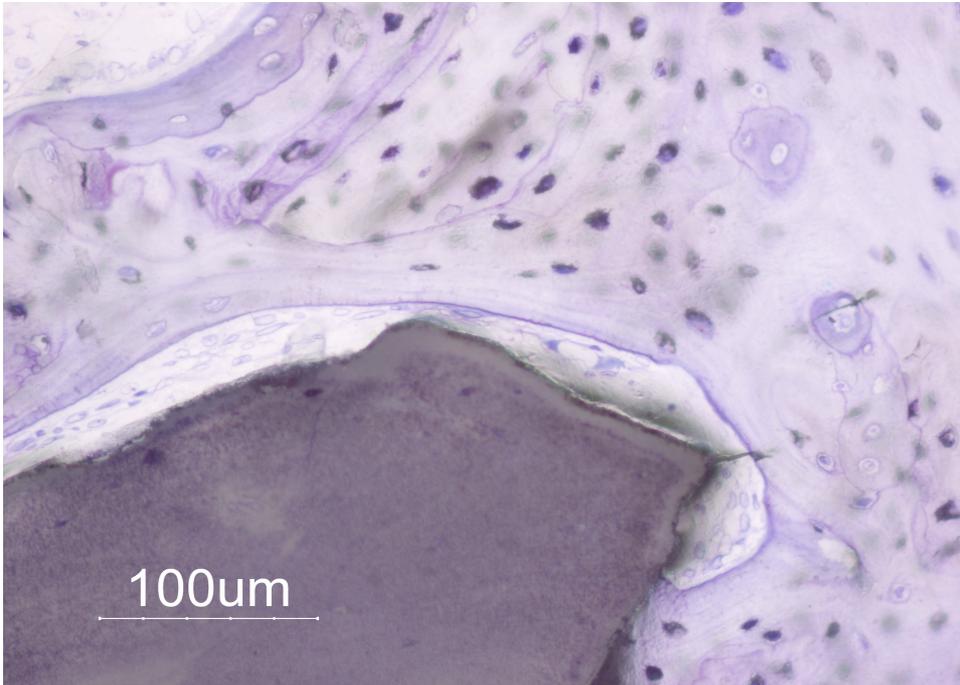


Figura 55. Aspecto de uma trabécula óssea em fase de remodelação contendo pequeníssimas áreas de tecido imaturo e típicas linhas de reversão. É ainda possível observar a presença de células da linha osteoclásticas e os osteoblásticas, numa área de tecido conjuntivo laxo, em redor de uma partícula.

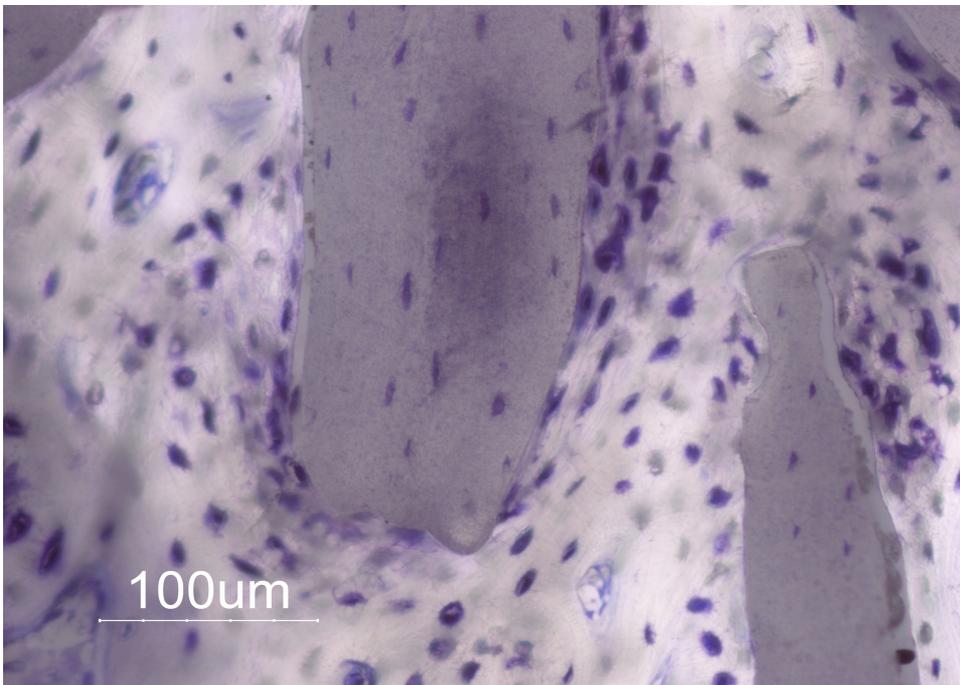


Figura 56. Imagem de grande parte do tecido ósseo, presente aos trinta dias, com um aspecto muito próximo da normal microarquitettura óssea uma perfeita osteointegração das partículas.

3.6. Grupo VI- Defeitos preenchidos com partículas de osso alógeno desmineralizado numa matriz de hidrogel de Hialuronato de Sódio (DBM/Hy)

Este grupo experimental destaca-se bastante dos anteriores, uma vez que as partículas em causa são constituídas por osso alógeno desmineralizado. As imagens obtidas são, pois, distintas das apresentadas nos estudos anteriores o que já era previsível sendo porém muito surpreendentes. As partículas apresentam uma grande heterogeneidade na sua forma, dimensões e mesmo na sua própria constituição. De facto, para além de partículas totalmente desmineralizadas (Fig. 57), constatámos a presença de muitas partículas que estavam parcialmente desmineralizadas (Fig. 58), mostrando uma região periférica descalcificada e uma porção central não descalcificada, podendo ainda identificar-se muitas vezes uma área intermédia.

As partículas apresentavam-se muito frequentemente como fragmentos difíceis de delimitar, senão mesmo de identificar, com formas muito variadas e contornos mal definidos. Este aspecto foi particularmente evidente para as partículas totalmente desmineralizadas (Fig. 57), constituídas essencialmente por uma matriz colagénica que se encontrava num processo de desagregação e reabsorção.

a) Duas semanas

O aspecto mais saliente aos quinze dias foi a presença de fragmentos dispersos por todo o defeito (Fig. 59). A existência de tecido ósseo é também uma constante em quase toda a extensão do defeito, ou seja tanto na periferia como na região central (Fig. 59). Porém, a constituição histológica das trabéculas situadas na periferia é bastante diferente das regiões centrais.

Nas margens do defeito, para além de uma clara linha de demarcação (Fig. 60), observámos trabéculas de formação recente compostas por tecido ósseo imaturo e tecido ósseo lamelar (Figs. 60 e 61) semelhantes às encontradas com os materiais anteriormente descritos. No entanto, a maioria das trabéculas presentes incorporava na sua constituição grandes áreas de fragmentos de enxerto desmineralizado (Figs. 62 e 63) ou mesmo em processo de remineralização (Fig. 63). Na verdade, parecia haver um aproveitamento das matrizes colagénicas para um novo processo de deposição de mineral. O processo de remineralização progride da interface osso / enxerto para o centro e parece seguir o percurso das fibras de colagénio.

À superfície de muitas partículas, totalmente ou parcialmente desmineralizadas, é visível o aparecimento por aposição de zonas de tecido ósseo bastante imaturo, traduzindo áreas de osteogénese e mineralização da matriz (Figs. 58, 64 e 65). Estas áreas parecem constituir uma localização preferencial para o desencadear dos processos de mineralização. Do mesmo modo, foram observadas aspectos semelhantes, com intensa remineralização nas zonas correspondentes aos canais de Havers (Fig.58).

A medida que avançamos para as regiões centrais dos defeitos encontramos uma grande profusão de fragmentos de enxerto totalmente desmineralizados, em diversas fases de desagregação e reabsorção. Na realidade, foi nítida a desorganização da arquitectura histológica dos fragmentos de enxerto, caracterizada por uma desintegração da matriz colagénica dos sistemas de Havers e afastamento das lamelas.

Nos fragmentos que ocupavam uma posição mais interna, foi possível registar o aparecimento de uma população celular de natureza conjuntiva, muito sugestiva de células osteoprogenitoras, que se situavam estrategicamente na periferia do enxerto. Estas observações parecem representar uma etapa precoce da diferenciação osteoblástica, característica dos processos de ossificação intramembranosa. Porém, embora mais raramente, podemos encontrar áreas de cartilagem hialina com condrócitos hipertrofiadas indiciando uma ossificação endocondral (Fig. 65).

São também notórios e particularmente interessantes os fenómenos osteoclásticos observados nas partículas parcialmente desmineralizadas, caracterizados por um alargamento e reabsorção ao nível dos canais de Havers e de Volkman (Fig. 66), em simultâneo com a desorganização gradual da matriz colagénica adjacente.

b) Quatro semanas

Este período é caracterizado por uma intensa actividade reabsorção óssea, observada tanto nas partículas parcialmente desmineralizadas, como nas totalmente desmineralizadas.

A eficácia do processo de regeneração ósseo e a reposição da microarquitectura deste tecido, é bastante notória ao nível das margens do defeito (Fig. 67), não se detectando qualquer linha de demarcação (Fig. 68). Na verdade, nas regiões mais periféricas do defeito são visíveis trabéculas ósseas muito semelhantes às encontradas em qualquer tecido ósseo esponjoso. Nestas espículas podem encontrar-se fragmentos de DBM/Hy não

desmineralizados perfeitamente osteointegrados (Fig. 69). Por outro lado, também não é raro observar alguns fragmentos totalmente remineralizados ou em fase avançada de remineralização completa ou parcialmente integrados em trabéculas ósseas (Figs. 70 e 71).

A par do processo de desorganização, desintegração e reabsorção da maioria dos fragmentos desmineralizados, ainda existentes, verificou-se que muitas áreas de tecido ósseo imaturo, observadas aos quinze dias à superfície destes fragmentos, sofreram uma intensa reabsorção, não se registando a sua substituição por tecido lamelar. Este aspecto foi particularmente evidente nas regiões mais centrais do defeito.

Muitas das partículas não desmineralizadas, osteointegradas ou não, apresentavam uma notável actividade de remodelação e reabsorção óssea, podendo observar-se com frequência osteoclastos em lacunas de Howship (Figs. 72 e 73) e a presença de cones de reabsorção (Figs. 73 e 74), reflectindo um processo de reabsorção/remodelação óssea.

Em síntese, o conjunto de imagens apresentado começa com a formação de um tecido ósseo que rapidamente atinge na periferia do defeito uma maturação notável, aos quinze dias. Porém, com o decorrer do tempo, observa-se um cada vez maior grau de desorganização e reabsorção do enxerto, particularmente notório nas partículas completamente desmineralizadas e localizada no interior do defeito. Grande parte do tecido ósseo imaturo formado por aposição na superfície destas partículas, não foi no entanto, remodelado nem substituído por tecido lamelar, como era expectável aos trinta dias evolução. Este facto, poderá estar relacionado com a instabilidade das partículas, não permitindo uma progressão eficaz do processo de regeneração óssea que parecia inicialmente tão promissor. As partículas que estavam apenas parcialmente desmineralizadas apresentavam uma intensa reabsorção osteoclástica e uma melhor e mais rápida osteointegração.

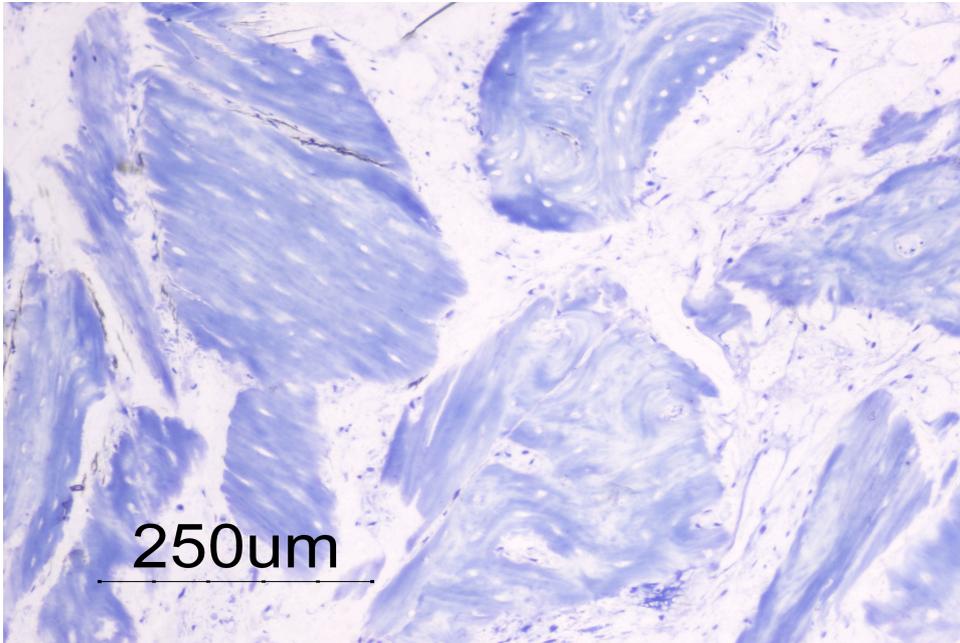


Figura 57. Imagem de partículas de DBM/Hy, totalmente desmineralizadas, apresentando-se como fragmentos de formas variadas e contorno mal definidos, constituídas essencialmente por uma matriz colagénica que se encontra num processo de desagregação e reabsorção.

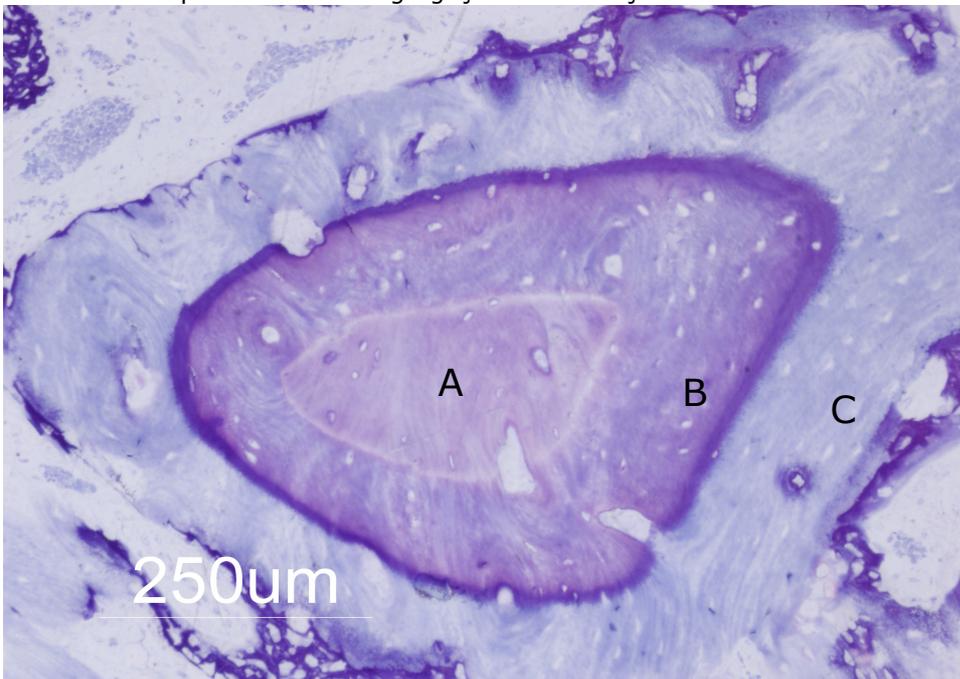


Figura 58. Aspecto de uma partícula parcialmente desmineralizada, mostrando uma porção central não descalcificada (A) e um região periférica descalcificada (C), podendo ainda identificar-se uma área intermédia (B). De notar ainda, a presença de tecido ósseo imaturo formado a superfície da partícula e em redor de alguns canais Havers, em paralelo com processo de reabsorção.

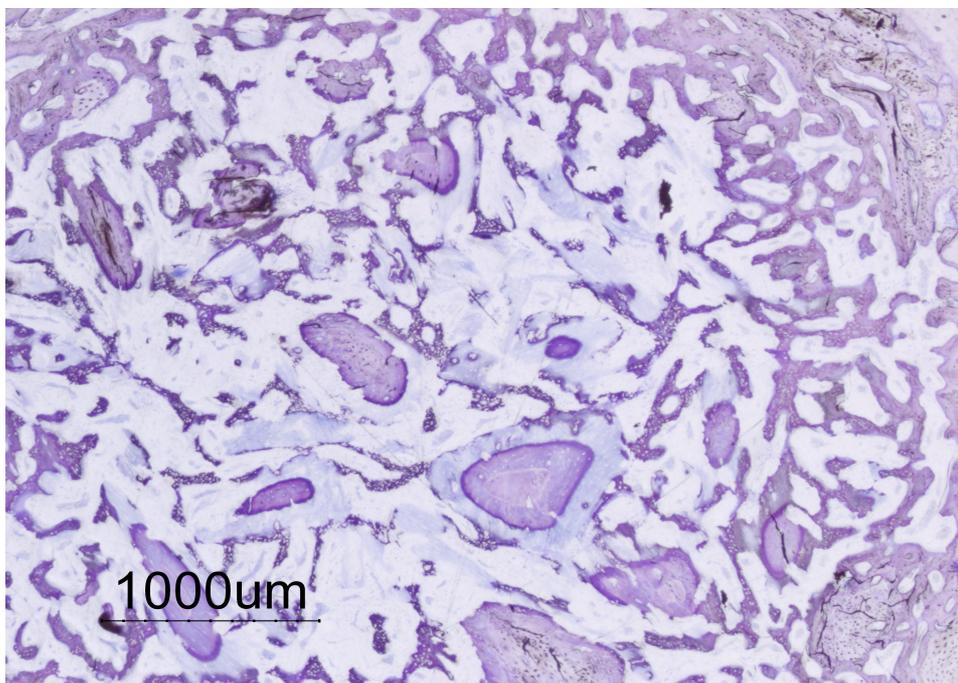


Figura 59. Defeito preenchido com DBX, aos quinze dias de evolução, mostrando a distribuição e localização das partículas e a sua grande heterogeneidade, bem como a presença de tecido ósseo em toda a extensão do defeito.

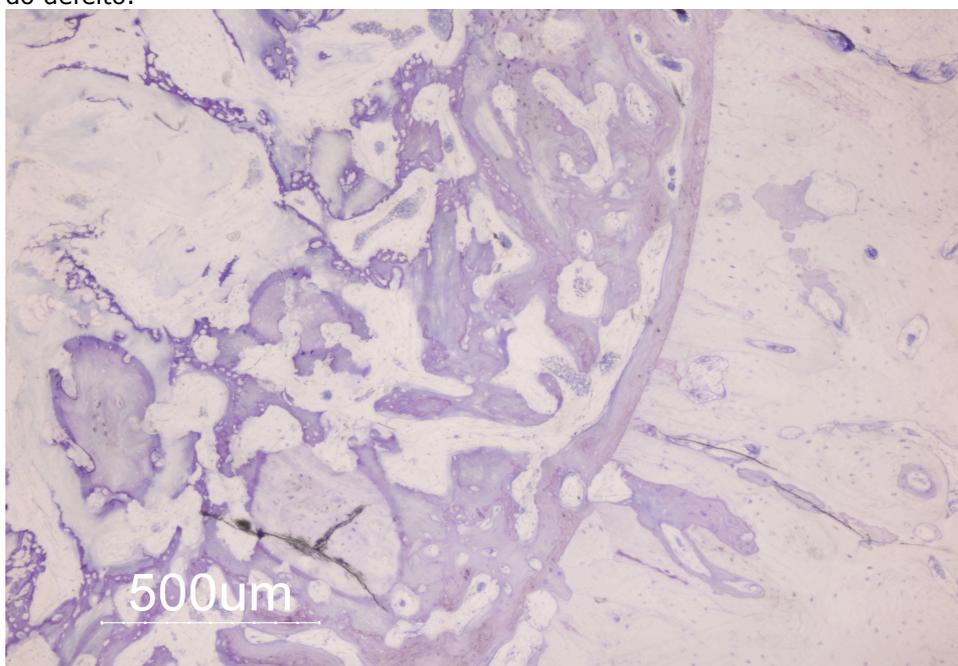


Figura 60. Margem de um defeito, com quinze dias, onde é visível uma clara linha de interface demarcando o osso maduro da parede do defeito e o tecido ósseo de formação recente. É também possível observar a presença de numerosas trabéculas, com uma orientação centrípeta e com diferentes graus de maturação.

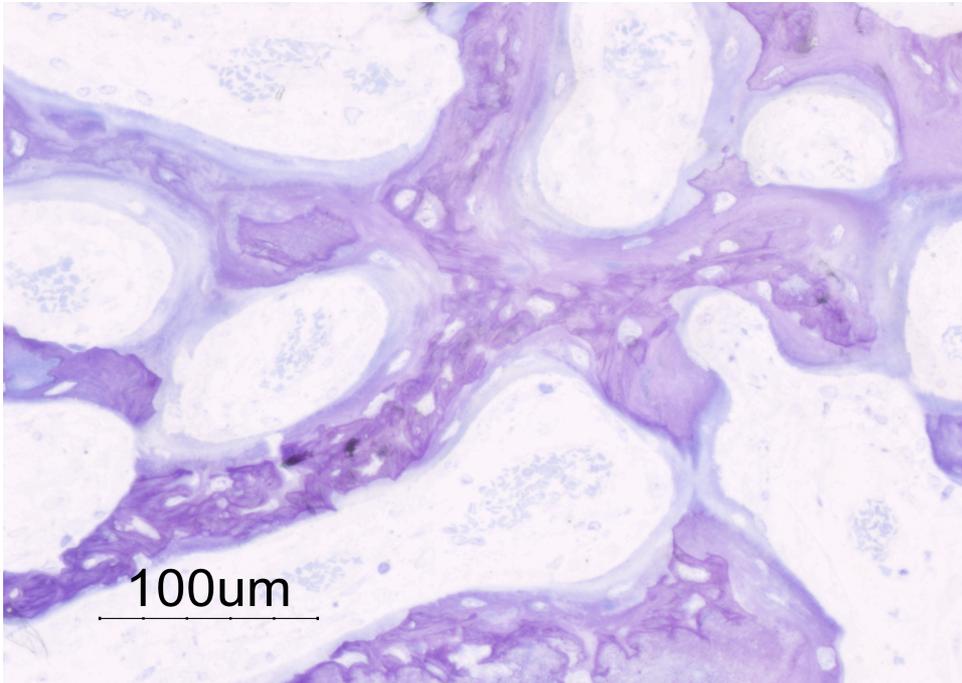


Figura 61. Trabéculas de formação recente situadas na periferia de um defeito, aos quinze dias, compostas por tecido ósseo imaturo e tecido lamelar.

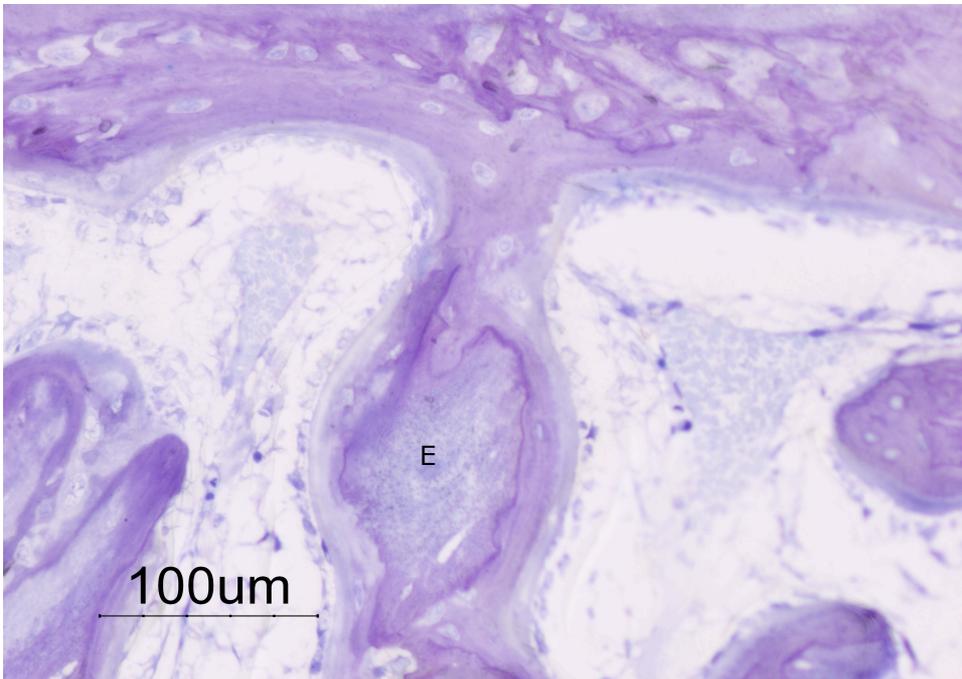


Figura 62. Trabécula óssea incorporando, na sua constituição fragmentos de enxerto desmineralizado (E), aos quinze dias.

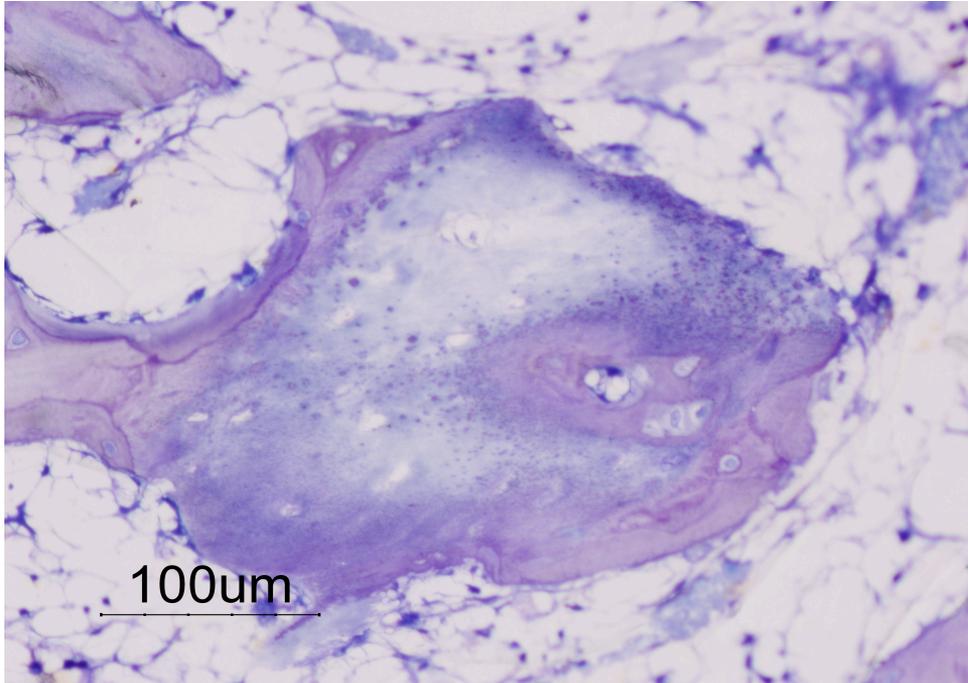


Figura 63. Processo de remineralização de um fragmento de enxerto desmineralizado, observado numa trabécula óssea aos quinze dias.

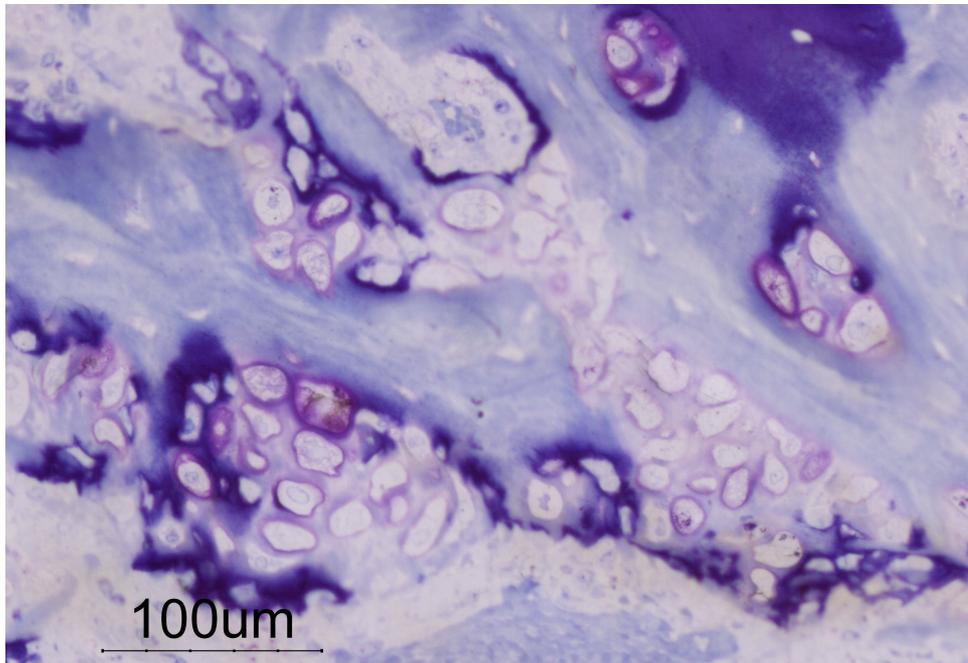


Figura 64. Presença de grandes áreas de tecido cartilágneo, aos quinze dias, com condrócitos hipertrofiados, num nítido processo de ossificação endocondral, em redor e no interior de algumas partículas descalcificadas e em fase de desagregação.

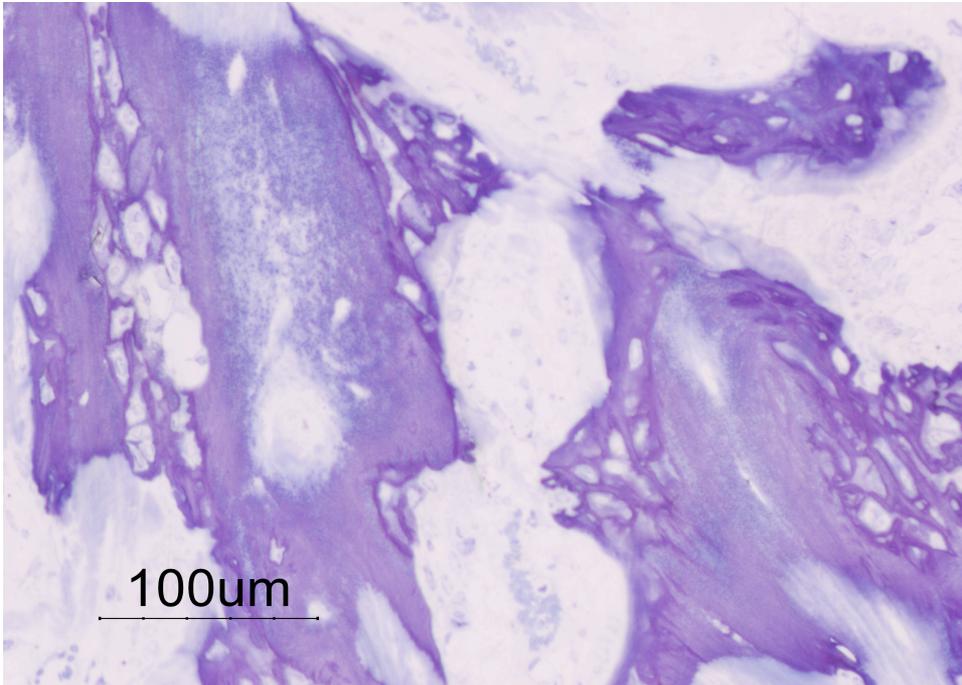


Figura 65. Aposição de tecido ósseo imaturo na superfície de um fragmento de DBX descalcificado, localizado numa zona central do defeito, com quinze dias, mostrando algumas áreas de remineralização.

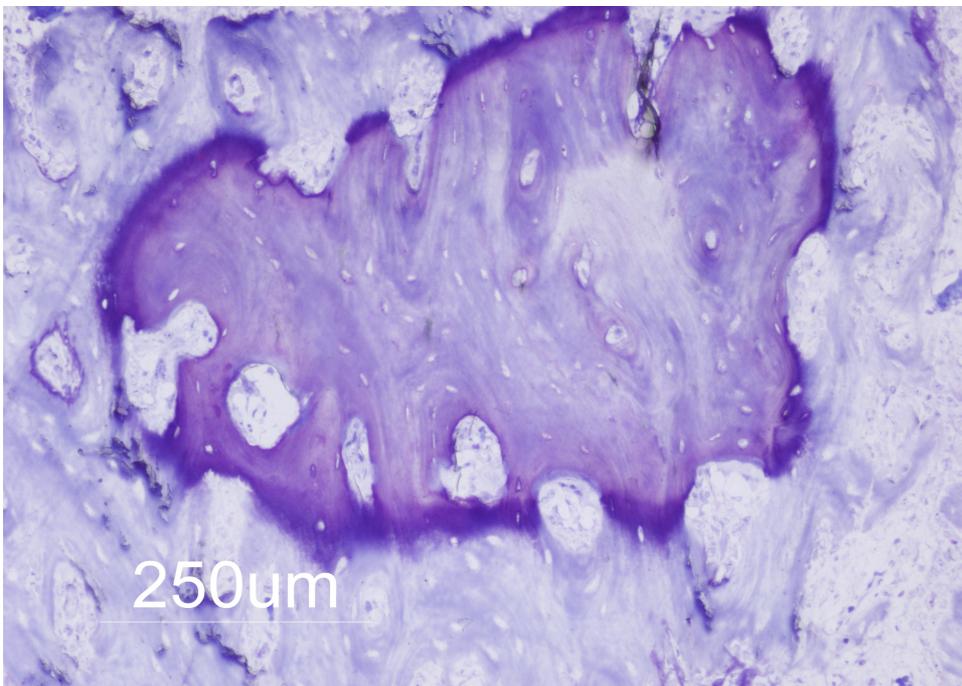


Figura 66. Intenso processo de reabsorção e desorganização de uma partícula de DBX, parcialmente descalcificada, visível tanto nas zonas totalmente descalcificadas como nas não descalcificadas, aos quinze dias.

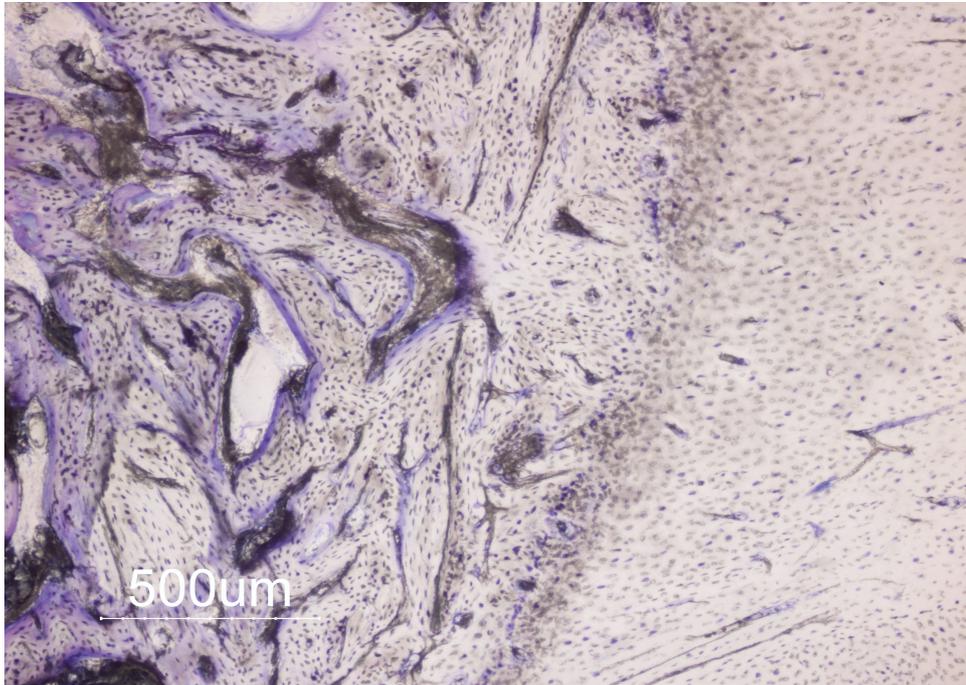


Figura 67. Aspecto da margem do defeito, aos trinta dias de evolução, mostrando uma perfeita continuidade e funcionalidade entre o tecido ósseo da parede e as trabéculas de formação recente.

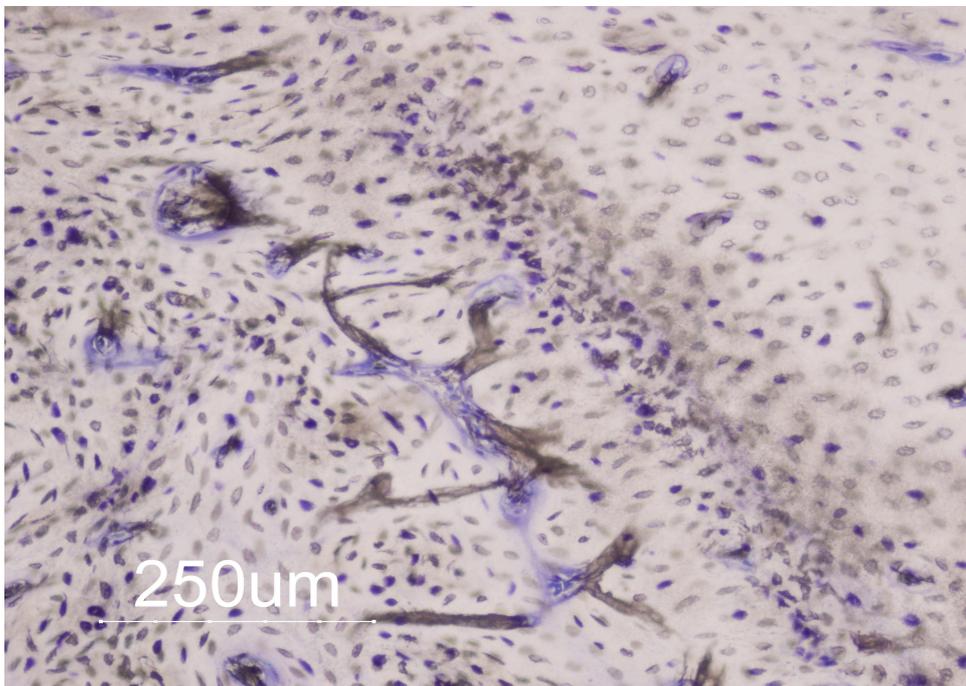


Figura 68. Maior ampliação de uma zona representada numa figura anterior, pondo em evidência a eficácia do processo de regeneração óssea e a reposição da arquitectura ao nível das margens do defeito. De notar apenas, uma certa celularidade na linha de interface.

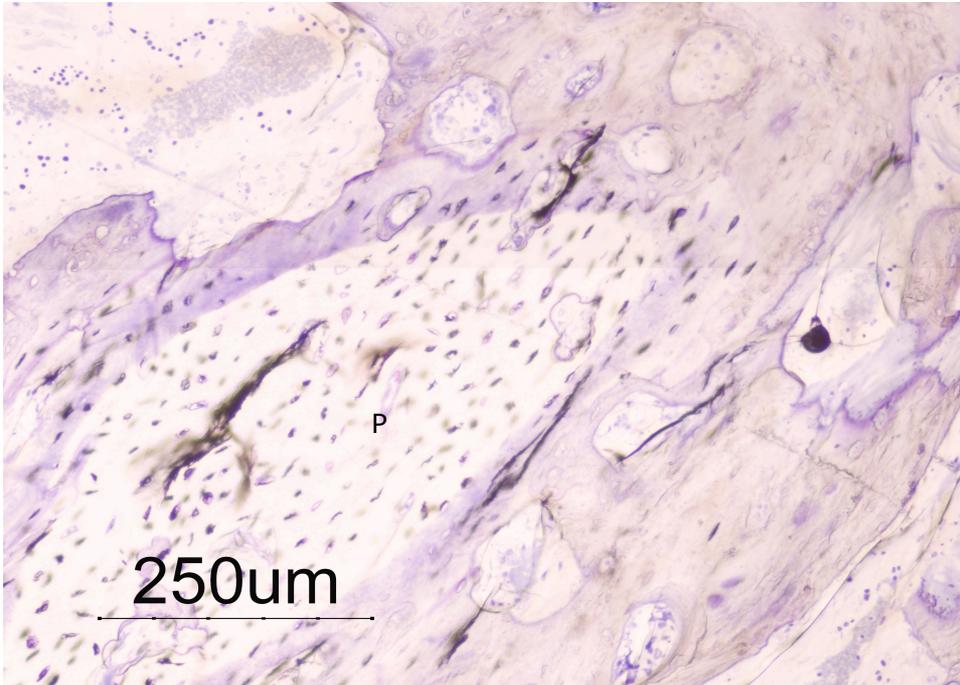


Figura 69. Partícula de DBX (P), parcialmente descalcificada e osteointegrada numa trabécula localizada nas margens do defeito com trinta dias de evolução.

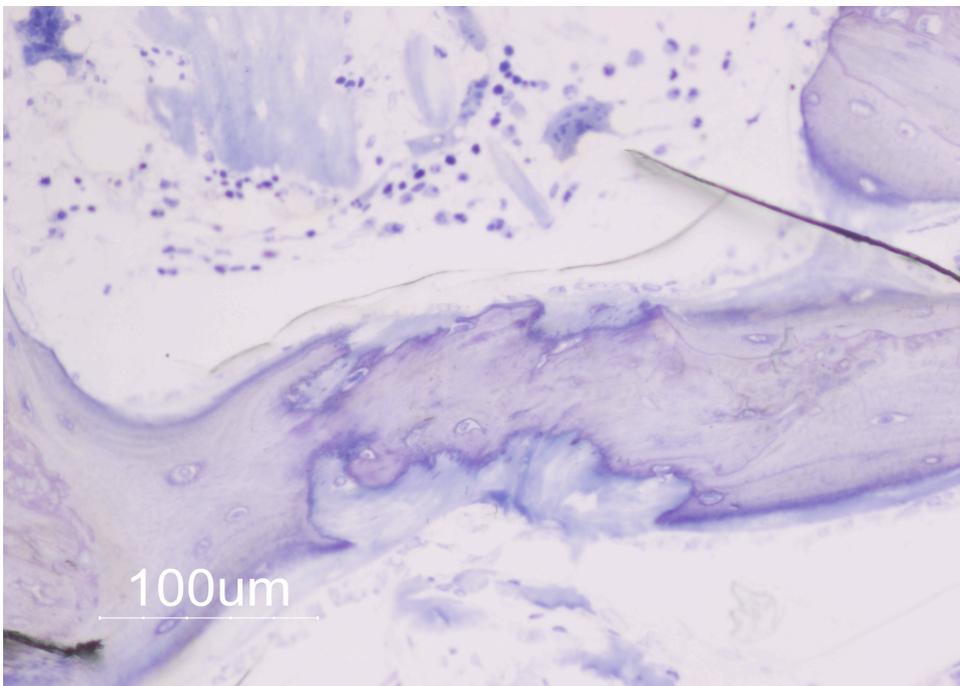


Figura 70. Trabécula óssea de formação recente mostrando na sua periferia alguns fragmentos de DBX, ainda não remineralizados. Para além da desintegração de vários outros fragmento de DBX é ainda visível o aparecimento de medula óssea (áreas de mielogénese), aos trinta dias.

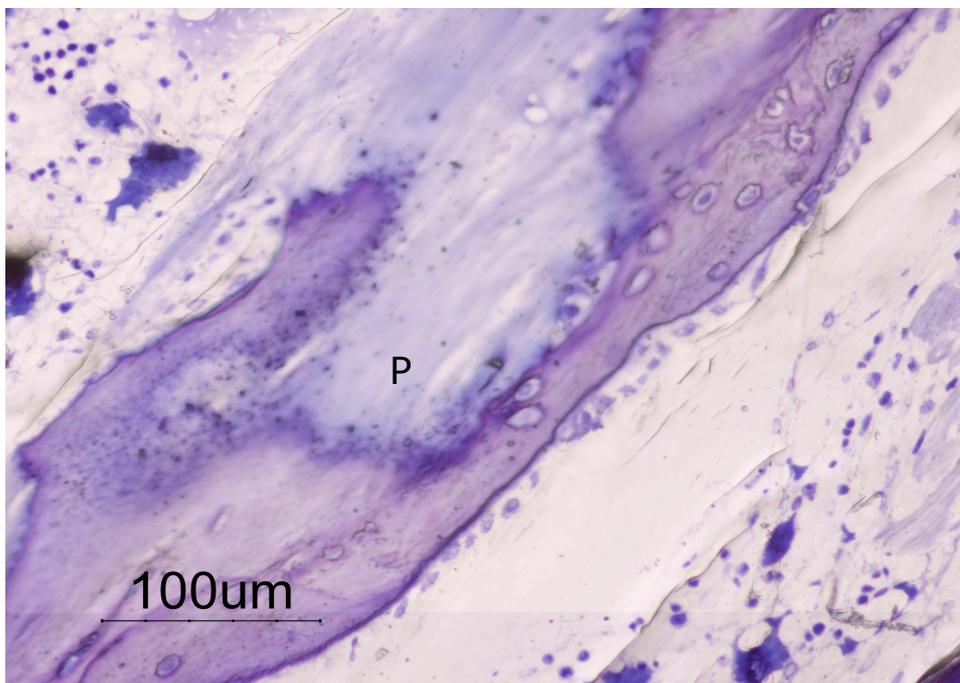


Figura 71. Aspecto aos trinta dias, de uma partícula de DBX (P) desmineralizada, em fase de remineralização, integrada numa trabécula óssea, que se apresenta ainda num processo de osteogénese, com osteoblastos activos.

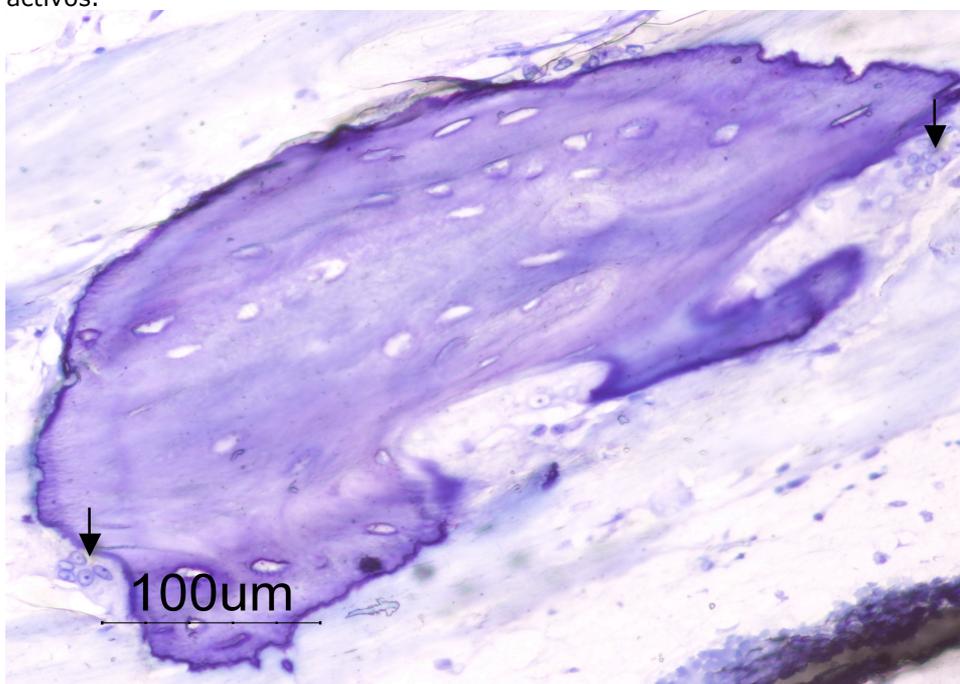


Figura 72. Intensa actividade de reabsorção óssea traduzida pela presença de osteoclastos (setas) em lacunas de Howship, junto da região central não desmineralizada de uma partícula de DBX. É ainda visível uma vasta área de matriz desmineralizada na periferia.

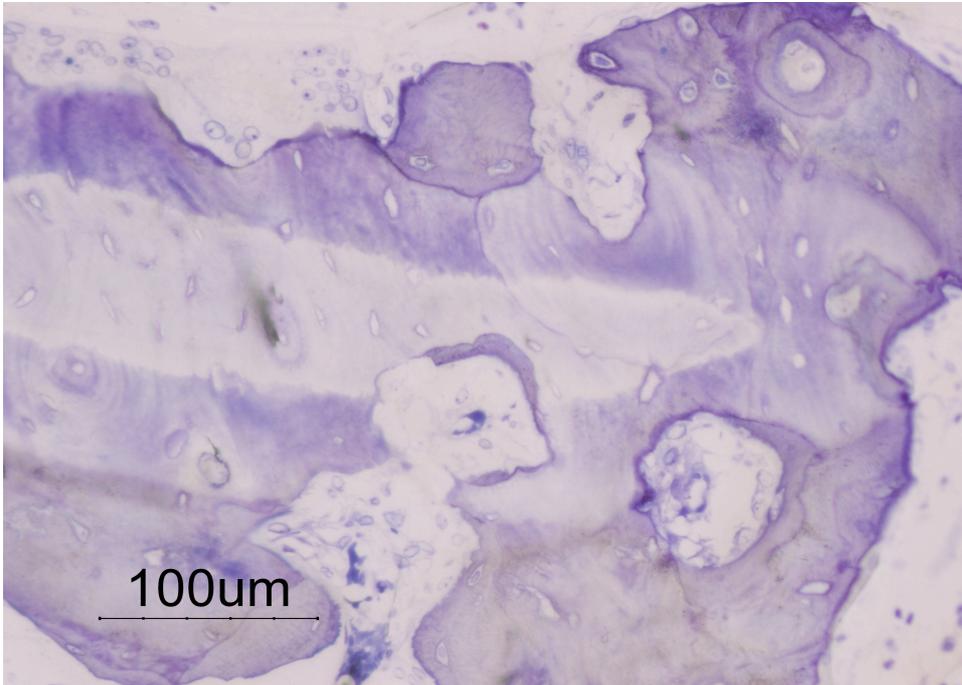


Figura 73. Activo processo de reabsorção óssea de uma partícula parcialmente desmineralizada e não osteointegrada, mostrando osteoclastos à superfície em lacunas de Howship e a presença de cones de reabsorção.

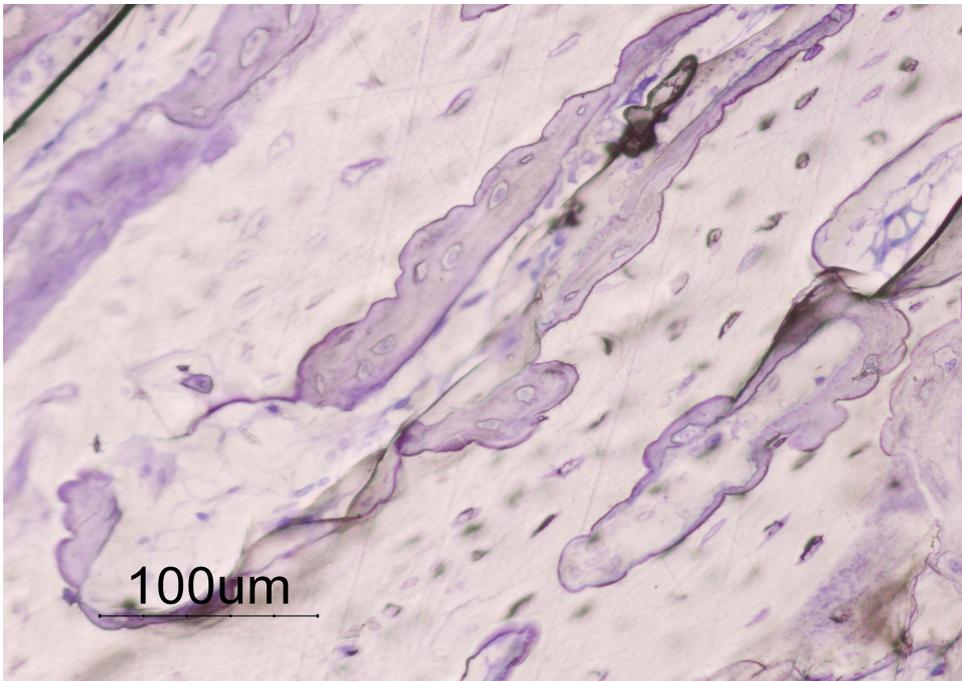


Figura 74. Cones de reabsorção presentes numa partícula osteointegrada aos trinta dias, reflectido um intenso processo de reabsorção / formação óssea.

4. Análise histológica quantitativa (Histomorfometria)

A análise histomorfométrica, baseada no programa informático de processamento de imagem Bioquant Nova[®], revelou-se bastante útil na avaliação quantitativa das imagens observada. em microscopia de luz. Na nesta análise foram avaliados os seguintes parâmetros:

- a) quantificação da percentagem de partículas
 - área ocupada pelas partículas/ área do defeito x 100%
- b) quantificação da percentagem de novo osso
 - % de novo osso = (área de novo osso / área do defeito) x 100%
- c) percentagem de novo osso versus partículas do enxerto
 - % novo osso / % partículas
- d) resolução do defeito
 - Preenchimento do defeito = % de novo osso + % de partículas/ área do total do defeito

Os parâmetros avaliados foram calculados como valores percentuais em relação à área total, para todos os grupos experimentais (Quadros 1, 2, 3 e 4).

A análise estatística estabeleceu uma comparação dos parâmetros de avaliação entre os vários grupos experimentais, e uma comparação intra grupos tendo por base o mesmo material, mas realizado em diferentes períodos de estudo. Os gráficos apresentam a comparação dos resultados histomorfométricos inter e intra-grupos (Gráficos 1, 2, 3 e 4).

Quadro 1. Percentagem de novo osso nos defeitos sem preenchimento (média ± SD).

Grupo I (Controlo negativo)	Duas semanas	Quatro semanas
Nb (%)	7,1 ± 2.4	4,14 ± 2.2

Part = percentagem das partículas do enxerto no defeito; Nb = percentagem de novo osso no defeito; Nb/Part = percentagem de novo osso relacionado com as partículas; (Nb+Part)/Total = resolução do defeito; SS = significância estatística ($p \leq 0,05$); NS = sem significado estatístico ($p > 0,05$).

Quadro 2. Comparação inter-grupos dos parâmetros histomorfométricos (média ± SD), às duas semanas.

Duas semanas	Part (%)	Nb (%)	Nb/Part (%)	(Nb+P)/Total (%)
Grupo II (ABM/P-15)	43.7±6.1	20.2± 3.0	47.5±12.5	63.9 ±4.9
Grupo III (ABM/P-15/CMC)	17.3±6.5	12.3 ±2.4	77.1±26.8	29.7±7.7
Grupo IV (ABM/P-15 Hy)	14.3±3.9	19.0±3.7	134.9±22.7	33.1±7.1
Grupo V (ABM/P-15/Hy lio)	26.6±3.2	25.0±3.7	97.0 ±14,5	51.1± 5.4
GrupoVI (DBM/Hy)	26.1±5.1	27.8± 3.9	112.2 ± 34	53.9 ±2.7
II vs III	SS	SS	<i>NS</i>	SS
II vs IV	SS	<i>NS</i>	SS	SS
II vs V	SS	<i>NS</i>	SS	SS
II vs VI	SS	<i>NS</i>	SS	SS
III vs IV	<i>NS</i>	<i>NS</i>	SS	<i>NS</i>
III vs V	SS	SS	<i>NS</i>	SS
III vs VI	SS	SS	<i>NS</i>	SS
IV vs V	SS	<i>NS</i>	<i>NS</i>	SS
IV vs VI	SS	SS	<i>NS</i>	SS
V vs VI	SS	<i>NS</i>	<i>NS</i>	<i>NS</i>

Part = percentagem das partículas do enxerto no defeito; Nb = percentagem de novo osso no defeito; Nb/Part = percentagem de novo osso relacionado com as partículas; (Nb+Part)/Total = resolução do defeito; SS = significância estatística ($p \leq 0,05$); NS = sem significado estatístico ($p > 0,05$).

Quadro 3. Comparação inter-grupos dos parâmetros histomorfométricos (média ± SD), às quatro semanas.

Quatro semanas	Part (%)	Nb (%)	Nb/Part (%)	Nb+P)/ Total(%)
Grupo II (ABM/P-15)	43.8 ±5.9	27.6± 3.1	64.0±11.6	69.4 ±4.5
Grupo III (ABM/P-15/CMC)	14.5 ±3.1	13.2 ± 4.5	90.5±26.6	27.7±7.0
Grupo IV (ABM/P-15 Hy)	18.2±4.3	23.0 ± 4.1	132.9±40.3	41.3±5.7
Grupo V (ABM/P-15/Hy lio)	28.8±3.3	33.1 ± 2.4	116.5±19,5	62.0± 3.0
GrupoVI (DBM/Hy)	14.8 ±2.9	26.9± 6.0	189.0±56.1	42.5 ±6.2
II vs III	SS	SS	<i>NS</i>	SS
II vs IV	SS	<i>NS</i>	SS	SS
II vs V	<i>NS</i>	<i>NS</i>	SS	<i>NS</i>
II vs VI	SS	<i>NS</i>	SS	SS
III vs IV	<i>NS</i>	SS	<i>NS</i>	SS
III vs V	SS	SS	<i>NS</i>	SS
III vs VI	<i>NS</i>	SS	SS	SS
IV vs V	SS	SS	<i>NS</i>	SS
IV vs VI	<i>NS</i>	SS	<i>NS</i>	<i>NS</i>
V vs VI	SS	<i>NS</i>	<i>NS</i>	SS

Part = porcentagem das partículas do enxerto no defeito; Nb = porcentagem de novo osso no defeito; Nb/Part = porcentagem de novo osso relacionado com as partículas; (Nb+Part)/Total = resolução do defeito; SS = significância estatística ($p \leq 0,05$); NS = sem significado estatístico ($p > 0,05$).

Quadro 4. Comparação intra-grupos dos parâmetros histomorfométricos (média \pm SD).

Grupo II (ABM/P-15)	Duas semanas (%)	Quatro semanas (%)	P
Part	43.7 \pm 6.1	43.8 \pm 5.9	<i>NS</i>
Nb	20.2 \pm 3.0	27.6 \pm 3.1	SS
Nb/Part	47.5 \pm 12.5	64.0 \pm 11.6	<i>NS</i>
(Nb+P)/Total	63.9 \pm 4.9	69.4 \pm 4.5	<i>NS</i>
Grupo III (ABM/P-15/CMC)			
Part	17.3 \pm 6.5	14.5 \pm 3.1	<i>NS</i>
Nb	12.3 \pm 2.4	13.2 \pm 4.5	<i>NS</i>
Nb/Part	77.1 \pm 26.8	90.5 \pm 26.6	<i>NS</i>
(Nb+P)/Total	29.7 \pm 7.7	27.7 \pm 7.0	<i>NS</i>
Grupo IV (ABM/P-15 /Hy)			
Part	14.3 \pm 3.9	18.2 \pm 4.3	<i>NS</i>
Nb	19.0 \pm 3.7	23.0 \pm 4.1	<i>NS</i>
Nb/Part	134.9 \pm 22.7	132.9 \pm 40.3	<i>NS</i>
(Nb+P)/Total	33.1 \pm 7.1	41.3 \pm 5.7	SS
Grupo V (ABM/P-15/Hy lio)			
Part	26.6 \pm 3.2	28.8 \pm 3.3	<i>NS</i>
Nb	25.0 \pm 3.7	33.1 \pm 2.4	SS
Nb/Part	97.0 \pm 14,5	116.5 \pm 19,5	<i>NS</i>
(Nb+P)/Total	51.1 \pm 5.4	62.0 \pm 3.0	SS
Grupo VI (DBM/Hy)			
Part	26.1 \pm 5.1	14.8 \pm 2.9	SS
Nb	27.8 \pm 3.9	26.9 \pm 6.0	<i>NS</i>
Nb/Part	112.2 \pm 34	189.0 \pm 56.1	SS
(Nb+P)/Total	53.9 \pm 2.7	42.5 \pm 6.2	SS

Part = percentagem das partículas do enxerto no defeito; Nb = percentagem de novo osso no defeito; Nb/Part = percentagem de novo osso relacionado com as partículas; (Nb+Part)/Total = resolução do defeito; SS = significância estatística ($p \leq 0,05$); NS = sem significado estatístico ($p > 0,05$).

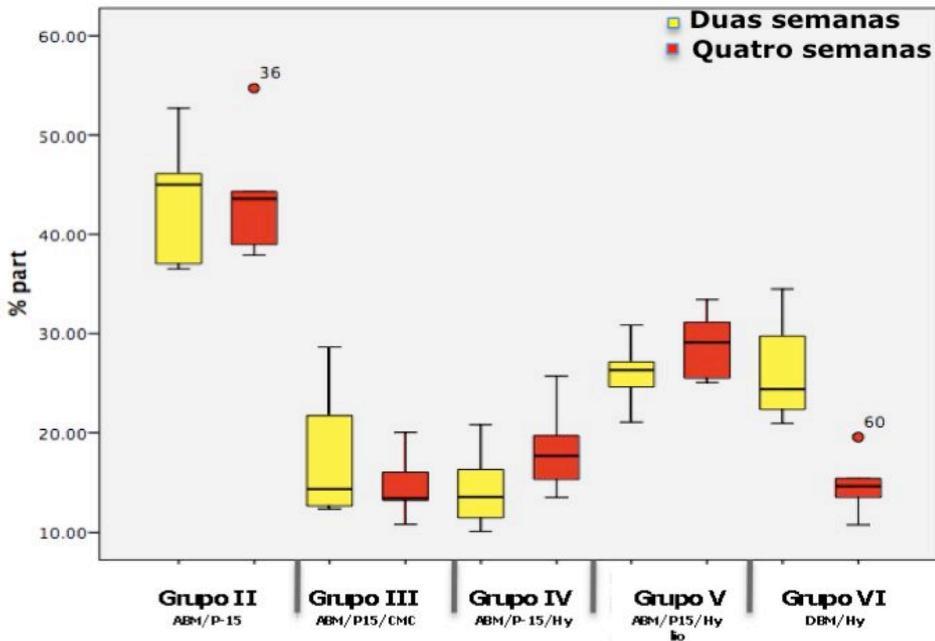


Gráfico 1. Comparação inter e intra-grupos em relação à porcentagem (%) de partículas.

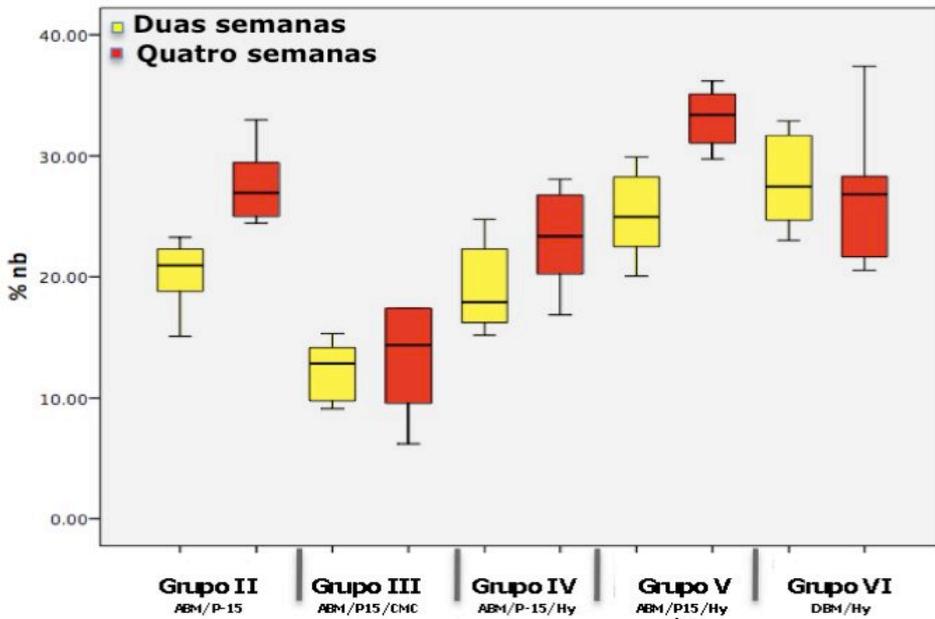


Gráfico 2. Comparação inter e intra-grupos em relação à porcentagem (%) de novo osso.

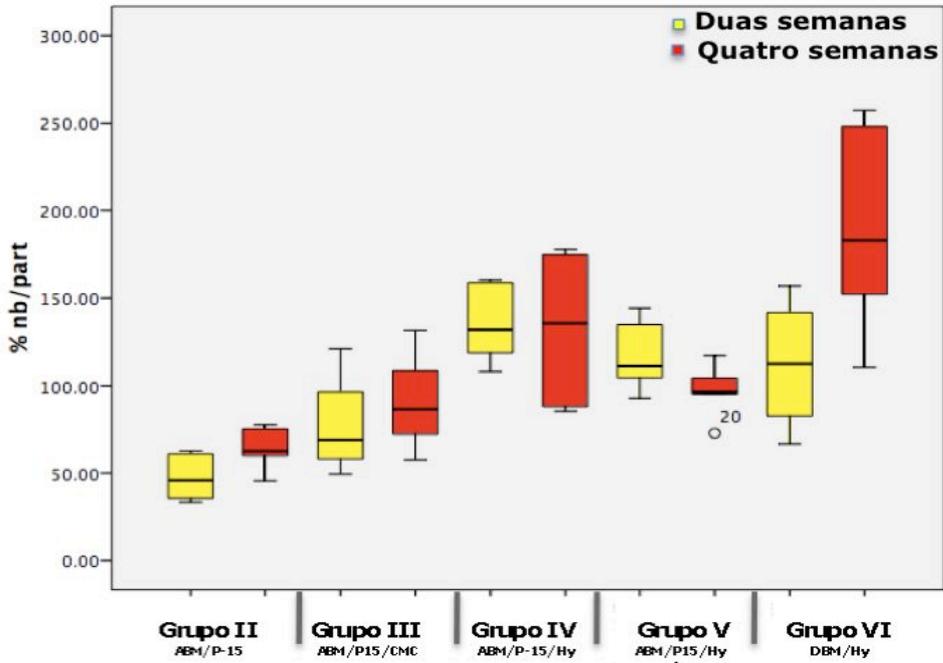


Gráfico 3. Comparação inter e intra-grupos da percentagem (%) de novo osso/partículas.

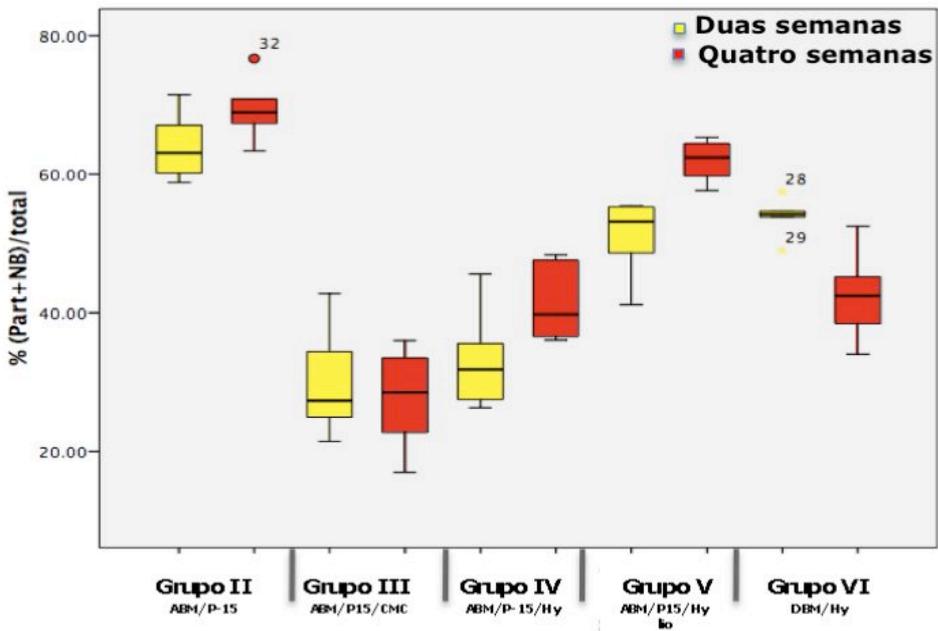


Gráfico 4. Comparação inter e intra-grupos da percentagem (%) de novo osso + partículas / Total (resolução do defeito).

4.1 Resultados histomorfométricos

Os defeitos sem preenchimento (Grupo I) apresentaram uma formação de novo osso de $7,1 \pm 2.4 \%$ e $4,14 \pm 2.2 \%$, para os 15, 30 dias respectivamente.

Aos 15 dias, verificou-se uma formação de novo osso de $20.2 \pm 3.0 \%$ para o Grupo II (AMB/P-15), de $12.3 \pm 2.4 \%$ para o Grupo III (AMB/P-15/CMC), de $19.0 \pm 3.7 \%$ para Grupo IV (AMB/P-15/Hy), de $25.0 \pm 3.7 \%$ para Grupo V (AMB/P-15/Hy lio) e de $27.8 \pm 3.9 \%$ para Grupo VI (DBM/Hy). Apresentaram uma área média ocupada por partículas, respectivamente, de $43.7 \pm 6.1 \%$ para Grupo II (AMB/P-15), de $17.3 \pm 6.5 \%$ para o Grupo III (AMB/P-15/CMC), de $14.3 \pm 3.9 \%$ para o Grupo IV (AMB/P-15/Hy), de $26.6 \pm 3.2 \%$ para o Grupo V (AMB/P-15/Hy lio) e $26.1 \pm 5.1 \%$ para o Grupo VI (DBM/Hy). Por sua vez, em relação a área média total de novo osso e partículas obteve-se uma resolução do defeito de $63.9 \pm 4.9\%$ para o Grupo II (AMB/P-15), de $29.7 \pm 7.7 \%$ para o Grupo III (AMB/P-15/CMC), de $33.1 \pm 7.1 \%$ para o Grupo IV (AMB/P-15/Hy), de $51.1 \pm 5.4 \%$ para o Grupo V (AMB/P-15/Hy lio) e de $53.9 \pm 2.7 \%$ para o Grupo VI (DBM/Hy).

Na análise entre grupos, na percentagem de novo osso formado, aos 15 dias, verificamos que o Grupo V (AMB/P-15/Hy lio) e o Grupo VI (DBM/Hy) apresentam os melhores resultados, apesar de não apresentarem diferenças estatísticas entre si. Por outro lado, o Grupo III (AMB/P-15/CMC) exibiu os valores percentuais mais baixos, com diferenças significativas em relação a maiorias dos grupos, excepto com o Grupo IV (AMB/P-15/Hy). Notamos ainda, que o Grupo VI (DBM/Hy) apresentou significância estatística em relação ao Grupo IV (AMB/P-15/Hy), para percentagem de novo tecido ósseo.

Na quantificação de tecido ósseo aos trinta dias verificaram-se diferenças entre os vários grupos: $27.6 \pm 3.1\%$ para o Grupo II (AMB/P-15), $13.2 \pm 4.5 \%$ para o Grupo III (AMB/P-15/CMC), $23.0 \pm 4.1 \%$ para o Grupo IV (AMB/P-15/Hy), $33.1 \pm 2.4 \%$ para o Grupo V (AMB/P-15/Hy lio) e de $26.9 \pm 6.0 \%$ para o Grupo VI (DBM/Hy). Na avaliação deste parâmetro, constatou-se que o Grupo V (AMB/P-15/Hy lio) apresentou os melhores resultados com diferenças estatisticamente significativas a todos os outros, excepto ao Grupo II (AMB/P-15) e ao Grupo VI (DBM/Hy). Por sua vez, o Grupo III (AMB/P-15/CMC), destacou-se mais uma vez pelos resultados inferiores ($13.2 \pm 4.5 \%$), havendo significância estatística em relação a todos os outros grupos.

Analisando os valores das percentagens de partículas presentes no defeito, aos 30 dias, foram respectivamente: 43.8 ± 5.9 % para o Grupo II (AMB/P-15), 14.5 ± 3.1 % para o Grupo III (AMB/P-15/CMC), 18.2 ± 4.3 % para o Grupo IV (AMB/P-15/Hy), 28.8 ± 3.3 % para o Grupo V (AMB/P-15/Hy lio) e 14.8 ± 2.9 % para o Grupo VI (DBM/Hy).

Em relação à área média total de novo osso e partículas, às quatro semanas, obteve-se uma resolução do defeito de 69.4 ± 4.5 % para o Grupo II (AMB/P-15), 27.7 ± 7.0 % para o Grupo III (AMB/P-15/CMC), 41.3 ± 5.7 % para o Grupo IV (AMB/P-15/Hy), 62.0 ± 3.0 % para o Grupo V (AMB/P-15/Hy lio) e 42.5 ± 6.2 % para o Grupo VI (DBM/Hy).

Na análise intra-grupos, relativamente aos grupos com partículas AMB/P-15 (Grupos II, III, IV e V), observou-se que a quantidade de partículas que persistiu nos defeitos ao longo do tempo não sofreu alterações significativas. O Grupo II (AMB/P-15), entre as duas e quatro semanas, apenas apresentava diferenças estatisticamente significativas para a percentagem de formação de novo osso, (20.2 ± 6.1 % e 27.6 ± 3.1 %). Os defeitos preenchidos com o Grupo III (AMB/P-15/CMC), nos dois períodos de avaliação não apresentavam significância estatística para os parâmetros avaliados. Por sua vez, o AMB/P-15/Hy apresentava unicamente diferenças estatísticas na resolução do defeito. No Grupo V (AMB/P-15/Hy lio) verificou-se um aumento significativo na neoformação óssea e na área total ocupada pelas partículas e novo osso. Por outro lado, Grupo VI (DBM/Hy) apresentava significância estatística entre os dois períodos de avaliação, 2 e 4 semanas, em relação percentagem de partículas (26.1 ± 5.1 % e 14 ± 2.9 %) e área de resolução do defeito (53.9 ± 2.7 % e 42.5 ± 6.2 %).

IV. Discussão

Regenerar o osso perdido ou reabsorvido, é uma das grandes preocupações do Médico Dentista, necessitando muitas vezes da aplicação de um Biomaterial que permita uma boa regeneração óssea e tecidual.

Os materiais de substituição óssea constituem uma das mais comuns e antigas formas de terapia regenerativa, sendo hoje rotineiramente utilizados em Medicina Dentária e Cirurgia Maxilo-Facial.

Os princípios da engenharia de tecidos inserem-se nesta perspectiva, pretendendo otimizar condições *in vivo* que induzam um adequado padrão de diferenciação fenotípica que promovam os fenómenos regenerativos, evitando as sequelas cicatriciais que derivam da maior parte dos processos de reparação. Uma das estratégias desta filosofia de tratamento passa, pela inserção de moduladores biológicos com o objectivo de promover o aparecimento de fenómenos regenerativos ^{100, 111, 112, 114, 129}.

Neste âmbito e com o intuito de criar matrizes biologicamente activas que promovam a regeneração óssea, diversas abordagens biomiméticas têm sido recentemente desenhadas com recurso a materiais análogos à matriz óssea, culminando com o desenvolvimento e aplicação de matriz mineral natural ^{109, 113, 118, 129, 186, 188}.

Com efeito, os enxertos xenógenos isolados ou constituídas por matrizes minerais enriquecidas com moduladores biológicos têm sido cada vez mais utilizados, demonstrando potencialidades muito interessantes e resultados clínicos benéficos ^{1, 120, 126, 127, 129, 141, 186, 189, 190}.

A selecção criteriosa e fundamentada de um determinado material, em detrimento dos demais e em situações clínicas específicas, não está ainda devidamente estabelecida ¹⁶¹.

O estudo experimental apresentado neste trabalho pretendeu dar um contributo para um melhor entendimento do processo regenerativo ósseo. Ao realizarmos os estudos *in vivo* com partículas de ABM/P-15 veiculadas por dois hidrogéis, fizemo-lo com o intuito de avaliar e comparar o comportamento biológico das modificações introduzidas, para uma opção fundamentada na resolução de diferentes soluções clínicas.

Modelo experimental

Este estudo experimental está integrado num grupo mais vasto de trabalhos sobre regeneração óssea, em execução no Departamento de

Medicina Dentária, Estomatologia e Cirurgia Maxilo-Facial da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra ^{120, 121, 127, 128, 186}. Deste modo, seguiu e aproveitou toda a metodologia já otimizada, utilizando o mesmo modelo animal de modo a dar continuidade aos estudos já realizados, permitindo, sem introdução de muitas variáveis, a comparação de resultados.

Modelo animal

Ainda que a resposta celular aos diferentes biomateriais tenha por base estudos *in vitro*, estes testes nunca podem ser representativos do que acontece *in vivo*. Deste modo, a aplicação de modelos de experimentação animal para o estudo de materiais de substituição óssea revelam-se auxiliares imprescindíveis. Estes modelos experimentais permitem, também, uma análise histológica qualitativa e quantitativa orientada e reprodutível, dos defeitos ósseos em bloco, sem os inconvenientes e limitações das biópsias. Deste modo é também possível uma avaliação mais rigorosa e controlada da eficácia e segurança das terapêuticas testadas.

A realização dos protocolos experimentais deve alicerçar-se e respeitar os princípios éticos para a salvaguarda do bem estar dos animais, garantindo, deste modo, a correcta instituição da metodologia. Os modelos animais utilizados em patologia experimental para avaliação dos processos de formação de tecido ósseo seguem critérios rigorosos para selecção do animal mais apropriado.

Para o escrutínio experimental rigoroso e preciso de um material é importante e frequente efectuar um plano preliminar nos pequenos animais de laboratório, como o rato e o coelho. Nos processo de cicatrização óssea o rato apresenta-se filogeneticamente mais afastado do humano, possuindo uma resposta espontânea muito superior, o que torna difíceis as extrapolações para o humano.

O coelho é um dos modelos animais mais frequentemente utilizado para pesquisas médicas, constituindo aproximadamente 35 % dos estudos de investigação do sistema musculoesquelético ¹⁹¹. É também o modelo mais comum para avaliar materiais de enxertos ósseo e materiais aplicados em cirurgia oral e maxilo-facial ^{192, 193}. Isto deve-se, em parte ao seu fácil manuseamento e à existência de um metabolismo ósseo similar a animais de bastante maior porte e mesmo à espécie humana ¹¹³.

Os coelhos são bastante tolerantes aos procedimentos cirúrgicos, apresentado uma rápida remodelação / regeneração óssea. A regeneração

óssea nestes animais ocorre numa proporção duas vezes superior à do cão e três vezes mais rápida do que nos humanos, sendo pois, um óptimo modelo experimental para estudos curta duração ¹⁹⁴. Por outro lado, os animais jovens, possuem um enorme potencial para reparar espontaneamente os defeitos ósseos criados, mesmo de dimensões apreciáveis, o que pode desvirtuar a interpretação dos resultados ^{195, 196}. De referir ainda, a necessidade de uma padronização quanto ao idade e sexo de forma a evitar possíveis interferências de carácter hormonal ¹⁹⁷.

Tendo em conta a experiência anterior e considerando as capacidades instrumentais e humanas ao nosso dispor, ao integrar o grupo de investigação do Laboratório de Tecidos Duros do Departamento de Medicina Dentária da FMUC, optámos pelo coelho para a realização do presente trabalho experimental.

Defeito de dimensão crítica

No presente modelo experimental foi seleccionado um defeito de dimensão crítica (5 mm de diâmetro por 10 profundidade). Este tipo de defeito representa a forma mais real de determinar a verdadeira contribuição dos materiais de enxerto para formação a de novo tecido ósseo ^{121, 127, 176, 198, 199}.

Local de intervenção

Tradicionalmente, o modelo de cicatrização na calote craniana tem sido considerado o que melhor avalia os materiais de enxerto delineados para Medicina Dentária, devido a características histofisiológicas e embriológicas comuns a estes locais anatómico ^{120, 121, 186, 197}. Porém, num estudo anteriormente realizado ¹²¹ para avaliação do processo de regeneração de tecido ósseo com materiais particulados e veiculados numa matriz de hidrogel, verificaram-se condições demasiado exigentes que induziram a migração anómala das partículas. Com efeito, devido à sua configuração o defeito ósseo craniano é um defeito de reduzida contenção física e é, por isso, considerado como o teste mais exigente para qualquer material de enxerto. Considerando toda esta problemática este investigador ¹²¹ recorreu a um modelo de defeito crítico no côndilo femoral do coelho, que comporta um defeito ósseo cilíndrico com uma maior contenção física ^{121, 177, 178, 200, 201}.

Com efeito, pareceu-nos, adequado manter neste estudo a utilização deste desenho do modelo de contenção física, no côndilo do fémur do coelho. Esta região é maioritariamente constituída por tecido ósseo esponjoso, sendo

muito mais irrigado que o osso da calote.

Este modelo possibilitou, também, a realização de dois defeitos por animal, permitindo o estudo de um controlo positivo em comparação com um controlo negativo, ou mesmo de dois tipos de materiais diferentes, reduzindo assim a variabilidade individual e os custos económicos ^{121, 186, 202}.

Como já foi referido, este trabalho segue em consonância com trabalhos anteriormente realizados no nosso Departamento, seguindo de perto os mesmos procedimentos cirúrgicos, preparação das amostras para análise histológica em microscopia de luz e quantificação por histomorfometria ^{121, 186}.

O processamento, com o sistema Exakt[®] de alta precisão, representa uma técnica de excelência para a preparação histológica de tecidos duros não descalcificados. Assim, possibilitou a aquisição de imagens histológicas com excelente qualidade, sem distorções morfológicas das estruturas a analisar e sem artefactos relevantes.

Avaliação histológica, histomorfometria e análise estatística das diversas formulações

Até ao presente não há nenhum material sintético que reúna as propriedades e capacidades do tecido ósseo. Considerando que para uma boa regeneração óssea é desejável que o material de substituição possua propriedades físicas, químicas e mecânicas semelhantes às do tecido a reparar, facilmente se compreende que o próprio tecido ósseo constitua uma solução tentadora e quase sempre a melhor. Nesta lógica os materiais autógenos, xenógenos e alógenos constituem uma boa alternativa como materiais de enxerto ósseo.

Por outro lado, a necessidade de uma estrutura porosa como base para qualquer material de enxerto ósseo é já incontestável e tem de ser respeitada ¹⁸⁸. Porém, como os materiais utilizados neste estudo, ainda que constituídos por osso cortical, foram aplicados sob a formula de grânulos, este problema não será tão pertinente. Com efeito, os espaços entre as partículas vão colmatar alguns "défices" de porosidade que se poderiam verificar aquando da utilização de materiais com uma estrutura de osso cortical em bloco ^{1, 97, 99, 203, 204}. De facto, quando se trabalha com materiais granulados reconhece-se desde logo a importância dos espaços inter-particulares, como sendo de primordial interesse para a colonização celular, representando um dos principais factores responsáveis pelo desempenho destes materiais ¹. Significa isto que, sempre que se aplica um material granulado, há que

atender não só as características das próprias partículas, mas também e sobretudo à sua adequada compactação. Por sua vez, este processo está directamente relacionado com o tamanho e forma das partículas, bem como com a habilidade e experiência do operador no manuseamento e acomodação das partículas no defeito cirúrgico.

Para além da sua adequada dimensão e correcta compactação no defeito, as partículas de ABM mantêm um arranjo mineral com uma disposição fibrilar dos cristais de hidroxiapatite, bastante semelhante a matriz colagénica, que lhe serviu de molde^{44, 205}. Esta arquitectura altamente estruturada possibilita fortes ligações inter-cristais, capazes de assegurar e manter a sua estrutura, mesmo depois de destruído o suporte proteico. Esta organização nunca se encontra nas hidroxiapatites sintéticas e deverá representar por si só, uma mais valia importante na performance biológica e mecânica das hidroxiapatites de origem natural^{48, 206, 207}.

Considerando os pressupostos descritos nos parágrafos anteriores, pode afirmar-se que as partículas de ABM utilizadas como material de base neste trabalho experimental representam, à partida, uma boa alternativa como materiais de enxerto ósseo.

Controlo negativo (grupo I)

Os defeitos sem preenchimento (controlo negativo) evidenciaram uma diminuta formação óssea, tal como era expectável para defeitos de dimensão crítica, apresentando uma percentagem de novo osso de $7,1 \pm 2.4$ % às duas semanas e de $4,1 \pm 2.2$ % às quatro semanas. Em termos globais verificou-se uma evolução no sentido de uma cicatrização e não de uma regeneração óssea. A fibrina deu lugar à fibrose e a formação de trabéculas ósseas foi muito diminuta. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores^{121, 127, 176, 199, 200}.

ABM/P-15(grupo II)

O grupo II constitui no presente trabalho o controlo positivo. O conjunto de imagens dos defeitos ósseos preenchidos com partículas de AMB/P-15 ilustra bem que estes defeitos foram sendo progressivamente ocupados por uma notável quantidade de tecido ósseo, seguindo um processo sequencial e centrípeto. A formação de tecido ósseo caracterizou-se por uma deposição óssea crescente à superfície das partículas e simultaneamente nos

espaços inter-particular, com aparecimento de trabéculas de tecido ósseo imaturo e lamelar, ligando as partículas entre si às paredes do defeito.

Os resultados da histomorfometria caminham no mesmo sentido, mostrando uma diferença significativa na quantidade de novo osso entre os quinze e os trinta dias (20.2 ± 3.0 e 27.6 ± 3.1). Nesta última fase, foi notória a presença de numerosos processos de reabsorção osteoclástica das trabéculas ósseas imaturas, bem como a degradação, desgaste e fragmentação de muitas partículas, traduzindo processos de remodelação em curso. Há que sublinhar, no entanto, a persistência de grandes áreas de tecido ósseo imaturo ainda não remodelado no final deste período experimental.

Pode afirmar-se, pois, que este material de enxerto funcionou como um excelente suporte osteocondutor, que possibilitou e promoveu a síntese de uma matriz mineralizada, constituída inicialmente por uma rede trabecular de osso imaturo, que evoluiu em alguns locais, para um tecido ósseo lamelar.

A este respeito, convém sublinhar que as partículas que não estavam envolvidas por tecido ósseo (menos protegidas), apresentavam-se bastante mais acessíveis ao "ataque" dos osteoclastos. Estas observações foram também descritas por Skoglund *et al.* ²⁰⁸ referindo que a capacidade de formação de novo osso em aposição directa nas partículas do enxerto previne/atrasa a sua reabsorção.

O ABM/P-15 continua a ser o único xenoenxerto ósseo com propriedades de biomimetismo reconhecidas e referenciadas na literatura ^{125-127, 136, 186, 209}. A assinalável formação de tecido ósseo obtida com este material está certamente ligada ao P-15 que, quando imobilizado numa matriz de ABM, estimula a migração, ligação e diferenciação das células com potencial osteogénico, através de um mecanismo de haptotaxia ^{3, 4, 141, 210, 211}.

Para além das capacidades biomiméticas, a grande área de superfície das partículas de ABM/P-15, relativamente ao seu volume (área específica), favorece a colonização celular e consequente osteointegração, também as características de superfície dos materiais de enxerto ósseo, podem afectar, de forma determinante, a sua bioactividade ^{50, 200, 212}. Com efeito, para um determinado tipo celular existe uma estrutura de superfície adequada. As células da linha osteoblástica, são muito sensíveis as características bioquímicas e estruturais dos seus substratos. A topografia das superfícies onde se encontram, pode condicionar o aparecimento de um fenótipo osteoblástico ou fibroblástico e, assim, a formação de um tecido ósseo ou de um tecido fibroso ^{50, 200, 212-214}.

Apresenta-se hoje cada vez mais evidente que a micro-arquitectura e sobretudo a microrrugosidade de certas superfícies podem modular a morfologia celular o que, por sua vez, irá influenciar a expressão génica, particularmente relacionada com a sua actividade de síntese de matriz ^{50, 161, 212-216}. A este respeito, há que assinalar a microrrugosidade muito acentuada das partículas de ABM/P-15 decorrente do processo de sinterização a que foram sujeitas.

Para além disso, a energia de superfície pode influenciar a adsorção e conformação de determinadas proteínas que, por sua vez, irão influenciar, de forma positiva ou negativa, na afinidade das células para o material ^{50, 112, 212, 217-220}.

Uma pequena nota final para recordar que os efeitos exercidos pelas características de superfície dos materiais de enxerto, ainda que particularmente notórias no desencadear dos eventos iniciais, estendem-se ao longo de todo o processo de formação e maturação do novo osso, sendo também fundamentais nos mecanismos de remodelação óssea. Este aspecto é particularmente interessante nos materiais sujeitos a processos de reabsorção. Neste contexto, é impossível deixar de referir a conformação das lacunas de Howship, lacunas de reabsorção provocadas pelos osteoclastos e que estão na base dos mecanismos de reabsorção óssea e dos processos de *creeping substitution* dos materiais de enxerto. Estas concavidades, uma vez formadas criam um micro-ambiente propício à diferenciação celular conducente a um fenótipo osteoblástico ^{16, 62}. De facto, parecem favorecer, ou mesmo contribuir, para uma sequestração de sais de cálcio, de BMPs ou outras proteínas com efeitos osteoindutores, estimulando ao mesmo tempo os processos de angiogénese, pré-requisito essencial para a osteogénese ⁶².

Em síntese, a composição química de uma matriz que se aproxima bastante da fase mineral do osso (ABM), juntamente com um biomodulador (P-15) e uma microestrutura de superfície com geometria e dimensões adequadas deverá favorecer e estimular a formação de tecido ósseo ^{109, 120, 122, 126, 136, 186, 188}.

As partículas de ABM/P-15 satisfazem estes requisitos, demonstrando neste estudo experimental uma boa capacidade osteocondutora e osteopromotora. De registar ainda, que é crucial que as superfícies dos grânulos de ABM/P-15 fiquem disponíveis para a colonização celular através de

um adequado espaçamento inter-partículas, que funcionará da mesma forma que um sistema aberto de intercomunicação de poros ^{97, 145, 157, 188, 203, 204, 221, 222}.

Importância dos veículos transportadores

Se houver uma compactação excessiva do material granulado, este funcionará como um bloco que não permite a invasão de tecidos nos seus interstícios devido à obstrução mecânica. Esta preocupação está na base da ideia de introduzir um veículo transportador (reabsorvível e inerte) que promova, de uma forma previsível, um adequado espaçamento entre as partículas.

As formulações em hidrogel contêm menos partículas minerais por unidade de volume e maiores espaços na sua matriz, podendo teoricamente facilitar ou mesmo estimular uma maior invasão dos componentes celulares e vasculares, através do maior espaçamento inter-partículas. Os hidrogéis poderiam fornecer, ainda uma melhor coesão e estabilidade dos materiais particulados nos fluidos tecidulares ^{116, 118, 120, 141, 223}.

Os resultados obtidos com estas formulações, que serão apresentados em alíneas posteriores, estão certamente relacionados com o conteúdo de partículas por unidade de volume e seu espaçamento, não sendo de excluir nunca, as propriedades específicas do veículo transportador.

ABM/P-15/CMC (grupo III)

O microambiente natural para a maioria das células presentes nos tecidos é a matriz extracelular, que é genericamente uma forma de hidrogel. Facilmente se compreende que os hidrogéis, ainda que sintéticos, constituam materiais com grande potencial em engenharia de tecidos ^{116, 118, 223}.

Este hidrogel inerte (carboximetilcelulose /glicerol) não parece apresentar efeitos adversos na performance do ABM/P-15, podendo inclusivamente proporcionar uma melhor distribuição tridimensional deste material. Porém, nos defeitos preenchidos com partículas de AMB/P-15 suspensas neste hidrogel foi evidente uma menor concentração de partículas (de 17.3 ± 6.1 e 14.5 ± 3.1 , às duas e quatro semanas, respectivamente), apresentando diferenças estatisticamente significativas em relação aos resultados obtidos apenas com as partículas AMB/P-15.

Esta formulação, ao permitir uma migração anómala das partículas determinou uma osteocondução imprevisível e comprometeu a formação e maturação de uma matriz mineralizada robusta. Este efeito migratório foi

particularmente visível, aos quinze dias, não se verificando um grande agravamento aos trinta dias. Este facto parece estar relacionado com fenómenos precoces de instabilidade. Na base desta migração pode estar a pressão sanguínea local, aquando da colocação deste material no defeito, levando em conjunto com a fluidez/viscosidade do hidrogel a alterações da estabilização do coágulo de fibrina^{98, 224}.

Esta formulação, mesmo quando estável, apresentou um comportamento fracamente positivo na formação óssea (12.3 ± 2.4 % e 13.2 ± 4.5 % de novo osso, às duas e quatro semanas) e também na sua maturação, acompanhado a distribuição heterogénea dos grânulos do material. Com efeito, a presença de tecido ósseo era predominante nas áreas em redor dos conjuntos de partículas e localizava-se sobretudo nas margens do defeito. Estas observações estão de acordo com os resultados descritos por outros autores^{121, 137}.

A migração das partículas observadas neste grupo experimental determinou uma dinâmica de instabilidade que teve certamente uma influência decisiva no comportamento deste material.

ABM/P-15/Hy (grupo IV)

Nos defeitos preenchidos com partículas de ABM/P-15, suspensas numa matriz de hidrogel de hialuronato de sódio, foi evidente a existência de uma fraca concentração de partículas, aliada a uma certa tendência para a sua migração (14.3 ± 6.1 % e 18.2 ± 4.3 %, aos quinze e trinta dias, respectivamente). Esta situação, foi muito semelhante à encontrada com o ABM/P-15/CMC, podendo estar certamente relacionada com as propriedades físicas destes veículos. A deposição de tecido ósseo seguiu e acompanhou a distribuição das partículas. As trabéculas ósseas que se apresentavam numa fase de maturação mais adiantada estavam geralmente associadas a áreas de maior concentração de partículas, estando também situadas mais periféricamente, tanto aos quinze como aos trinta dias.

A presença de tecido ósseo apresentava, às duas semanas, valores (19.0 ± 3.7 %) próximos dos obtidos para o ABM/P-15 particulado (20.2 ± 3.0 %), mas maiores do que os obtidos para o ABM/P-15/CMC (12.3 ± 2.4 %). Às quatro semanas a quantidade de tecido ósseo (23.0 ± 4.1 %) revela-se já com significância estatística em relação ao ABM/P-15/CMC (13.2 ± 4.5 %), mas sendo no entanto ligeiramente inferior quando comparada com o ABM/P-15 particulado (27.6 ± 3.1 %).

O grau de maturação das trabéculas ósseas, observado às quatro semanas, foi sempre maior para a formulação com hialuronato de sódio. Este facto poderá estar relacionado com as propriedades biológica intrínsecas do Hy, mas a instabilidade das partículas veio diminuir a eficácia global desta formulação.

ABM/P-15/Hy Liofilizado (grupo V)

Os defeitos preenchidos com ABM/P-15/Hy liofilizado demonstraram uma regeneração óssea mais completa do que qualquer dos grupos anteriores. Estes resultados poderão ficar a dever-se por um lado às características físicas desta formulação, associando um grande conteúdo de partículas por unidade de área ($26.6 \pm 3.2\%$ e $28.8 \pm 3.3\%$, às duas e quatro semanas respectivamente), a um adequado espaçamento e a uma maior estabilidade das partículas *in situ*. Neste contexto, será de considerar também a fixação precoce do enxerto em conjunto com a formação do coágulo de fibrina ⁹⁸.

Os estudos histológicos revelaram, aos quinze dias, a presença de uma grande densidade de trabéculas ósseas ($25.0 \pm 3.7\%$), maior do que qualquer das formulações com ABM/P-15, contendo já grandes áreas de tecido lamelar, aspecto pouco frequente neste período. Este aspecto, poderá estar relacionado com o Hy.

O Hy está envolvido em inúmeros processos de morfogénese, cicatrização e reparação de tecidos, ^{146, 151}, tendo, também uma importante acção na formação e regeneração do tecido ósseo. Este efeito parece ser levado a cabo pelas BMPs, principalmente a BMP-2, que induz a diferenciação das células mesenquimatosas em células osteoprogenitoras e osteoblastos ^{84, 126, 136}. Por outro lado, o Hy pode estimular, também, a síntese de colagénio pelos fibroblastos e osteoblastos e ainda a produção de outras proteínas da matriz óssea, relacionadas com os processos de mineralização ^{126, 225}.

Para além disso, é também conhecido a acção do Hy como indutor da angiogénese, sabendo-se que as cadeias de baixo peso molecular estimulam a migração e proliferação das células endoteliais. Uma vez que o processo de formação/regeneração do tecido ósseo está na dependência directa de uma prévia e eficaz vascularização, facilmente se compreende que à velocidade de regeneração esteja dependente da capacidade e velocidade angiogénica ^{147, 225-228}.

Estes dois factores (angiogénese e diferenciação das células osteoprogenitores) podem justificar a intensa e precoce actividade

osteogénica^{225, 226, 228, 229}. No entanto, para além duma acção directa sobre as células, estimulando a sua diferenciação, o Hy pode actuar de forma indirecta. As cadeias dos glicosaminoglicanos podem ainda ligar-se a moléculas biologicamente importantes aumentando a sua concentração em determinados locais, como acontece com certos factores de crescimento. De facto parece que o Hy desempenha um papel de relevo na manutenção / retenção de certos factores de crescimento, no micro ambiente em redor das células. Este aspecto parece associar-se às cadeias com maior peso molecular e estará certamente relacionado com as suas características físico-químicas.

Aos trinta dias, os defeitos ósseos apresentavam, para além de uma boa osteointegração das partículas, grandes áreas de tecido ósseo (33.1 ± 2.4 %), formando trabéculas mais espessas com maior grau de organização e maturação. Os valores obtidos para as áreas de novo osso são, neste período, estatisticamente significativos, tanto em relação aos quinze dias, como em comparação com as formulações de ABM/P-15/CMC e de ABM/P-15/Hy.

O tecido ósseo presente nas trabéculas apresentava sinais de um acentuado processo de remodelação, traduzido por inúmeras linhas de reversão. Esta intensa dinâmica funcional associada ao desaparecimento da maioria das áreas de tecido ósseo imaturo e a extensas zonas de reabsorção das partículas, pressupõem uma intensa actividade osteoclástica.

Estes resultados são certamente devidos ao aumento da expressão do RANKL e consequente activação dos osteoclastos^{14, 45, 71}. O RANKL está directamente relacionado com a formação / activação dos osteoclastos. Este processo é levado a cabo, pelo menos em parte pelo eixo CD44/Hy. O CD44, como já foi referido constitui um dos principais receptores celulares para o Hy e uma vez activado estimula uma cascata de eventos intracelulares que levam à expressão do RANKL.

Na sequência do processo de remodelação óssea a fase de reabsorção é muito mais rápida do que a fase de formação, deste modo se poderá explicar o facto de se encontrarem, no final do período experimental, algumas partículas rodeadas por zonas de tecido conjuntivo laxo, os locais onde se localizavam, normalmente aos quinze dias, as áreas de tecido ósseo imaturo. Estas zonas, quando observadas numa maior ampliação, mostram a presença de grande quantidade de células que no seu conjunto, podem constituir as unidades multicelulares básicas de remodelação (BMUs)^{35, 64, 230}.

Em síntese, a sinergia resultante da combinação do ABM com o P-15 e com Hy vai certamente potenciar uma mais fácil invasão, crescimento e

diferenciação das células da linha osteoblástica e osteoclástica, estimulando uma intensa formação e remodelação da matriz óssea, justificando os resultados obtidos com esta formulação.

Pode afirmar-se por último que, apesar desta formulação apresentar o mesmo veículo transportador (Hy) e a mesma constituição de partículas (ABM/P-15) do grupo anterior (ABM/P-15/Hy), a liofilização fez toda a diferença na *performance* deste material.

DBM/Hy (grupo VI)

O aspecto mais saliente dos defeitos preenchidos com partículas de osso alógeno desmineralizado suspensas numa matriz de hialuronato de sódio foi a presença, aos quinze dias, de inúmeros fragmentos dispersos por todo o defeito e a existência de áreas de tecido ósseo, também em quase toda a sua extensão.

Para além de partículas totalmente desmineralizadas, constatou-se a presença de muitas partículas que estavam, apenas, parcialmente desmineralizadas. As partículas apresentavam-se muito frequentemente como fragmentos difíceis de delimitar, senão mesmo de identificar, com formas muito variadas e contornos mal definidos. Este aspecto foi particularmente evidente para as partículas totalmente desmineralizadas, constituídas essencialmente por uma matriz colagénica que se encontrava, frequentemente, num processo de desagregação e reabsorção. Esta situação, como facilmente se compreenderá dificultou bastante as análises morfométricas. De qualquer modo obtiveram-se valores de 26.1 ± 5.1 % e de 14.8 ± 2.9 %, para as duas e quatro semanas, respectivamente. Esta diminuição no conteúdo de partículas dever-se-á essencialmente a processos de desorganização, desintegração e reabsorção da maioria dos fragmentos desmineralizados.

Os estudos histológicos começaram por mostrar a formação de trabéculas ósseas, que rapidamente atingem na periferia do defeito uma maturação notável, aos quinze dias. O tecido ósseo formado, nesta fase apresentou em relação às demais formulações os melhores resultados (27.8 ± 3.9 %). Estes valores estão certamente relacionados com a presença de grande quantidade de colagénio e sua influência na formação do coágulo, com a eventual preservação e/ou activação das proteínas osteoindutoras, presentes na matriz e ainda com a actividade biológica do Hy, particularmente importante nos fenómenos de motilidade, migração e proliferação celular.

Todos estes factores, podem explicar a intensa actividade osteogénica verificada neste período precoce. Convém salientar aqui, que a maior parte das proteínas osteoindutoras presentes na matriz óssea, neste caso descalcificada, pertencem como é do conhecimento geral, à família da TGF- β , sendo a BMP-2, 4 e 7 as proteínas mais estudadas, e às quais se atribuem maior potencialidades terapêuticas ^{162, 231, 232}.

Com o decorrer do tempo, observa-se nestes defeitos, um cada vez maior grau de desorganização e reabsorção do enxerto, particularmente notório nas partículas completamente desmineralizadas e localizadas no interior do defeito. Assim, aos trinta dias, os valores encontrados para o tecido ósseo não apresentaram praticamente nenhuma evolução quantitativa ($26.9 \pm 6.0\%$), como seriam expectável. De facto, grande parte do tecido ósseo imaturo formado por aposição à superfície das partículas desmineralizadas, não foi remodelado nem substituído por tecido lamelar. Este facto, poderá estar relacionado com a instabilidade das partículas, decorrente da sua rápida reabsorção e constante modificação da sua superfície, não permitindo uma progressão eficaz do processo de regeneração óssea, que parecia inicialmente tão promissor.

A maioria das trabéculas presentes incorporava na sua constituição grandes áreas de fragmentos de enxerto desmineralizado ou mesmo em processo de remineralização. Na verdade, parecia haver um aproveitamento das matrizes colagénicas para um novo processo de deposição de mineral.

É impossível deixar de referir este interessante processo de remineralização da matriz colagénica, sublinhando ainda o facto de parecer tratar-se de um mecanismo de calcificação que se desenvolve de forma independente da actividade osteoblástica ^{47, 233-235}. Esta deposição mineral é devida à precipitação de cristais de fosfato de cálcio numa matriz óssea desmineralizada, por um processo que se designa por "nucleação heterogénea". É compreensível que o mecanismo subjacente ao aparecimento destes depósitos minerais seja diferente do tradicional processo de mineralização da matriz óssea, levado a cabo pelos osteoblastos, através da formação de vesículas de matriz.

A acumulação de cristais minerais numa matriz previamente desmineralizada parece estar dependente, à partida da sua microarquitectura, estando possivelmente relacionada com a conservação estrutural e topográfica das moléculas de tropocolagénio, das suas *cross-links* e sobretudo da manutenção dos espaços inter-moleculares. Para além das características

físicas da própria matriz, podem também estar conservadas certas proteínas associadas especificamente a fenómenos de mineralização. Estas proteínas, interagindo com o colagénio, formam complexos que facilitam a “nucleação heterogénea” dos cristais minerais.

Linden ²³⁶, refere que estas calcificações seriam determinantes para o processo de osteoindução, normalmente, associado a este tipo de biomaterial. No entanto, Urist *et al.* ^{237, 238} não consideraram este aspecto como essencial para o processo de formação óssea. Ainda neste contexto, Yamashita *et al* ^{47, 235} são de opinião que esta deposição mineral acelular ocorre de forma independente dos fenómenos de osteoindução, mas tem algum significado e/ou participação nos mecanismos de formação óssea induzidos por esta variedade de matriz descalcificada. Estes estudos ^{47, 233, 235} que descrevem com pormenor os processos de remineralização /recalcificação da matriz óssea desmineralizada apresentam dois pontos divergentes. Yamashita ⁴⁷ refere que estes núcleos de calcificação são observados entre o 5º e 7º dia pós-cirúrgico precedendo, sempre, a formação de novo osso. Para Buser ²³³ a remineralização tem início, apenas, nas áreas de matriz descalcificada adjacentes a superfícies previamente recobertas por matriz óssea de formação recente, sendo referida às quatro semanas. Esta disparidade de observações resulta, certamente dos diferentes períodos experimentais adoptados pelos vários investigadores. A este respeito somos de opinião que este mecanismo tem um início precoce e mantém-se durante bastante tempo, eventualmente, para além das quatro semanas. O plasma e fluídos extracelulares contêm grandes quantidades de cálcio e fosfato (supersaturados), fornecendo a matéria prima para a formação de uma fase sólida de fosfato de cálcio (que rapidamente se convertem em hidroxiapatite ou hidroxiapatite carbonatada), estando este fenómeno mais dependente da arquitectura da base colagénica em questão, do que propriamente das condições bioquímicas.

Às quatro semanas, registou-se neste grupo uma acentuada actividade de reabsorção óssea. De facto, muitas das partículas não desmineralizadas, osteointegradas ou não, apresentavam um notável actividade de remodelação e reabsorção óssea, podendo observar-se com frequência osteoclastos em lacunas de Howship e a presença de cones de reabsorção, reflectindo um processo de reabsorção /remodelação óssea.

Por outro lado, também as partículas que estavam, apenas, parcialmente desmineralizadas apresentavam uma melhor e mais rápida osteointegração.

Em modelos animais, um conteúdo mineral entre os 23 % e 40 %, parece não interferir com as propriedades osteoindutoras, tendo ainda, a vantagem de conservar alguma das capacidades de suporte estrutural ²³⁹. Os enxertos parcialmente descalcificados demonstram, inclusivamente, um potencial osteoindutor superior ao dos enxertos totalmente descalcificados ²⁴⁰⁻²⁴². Este parece também ser o caso presente.

A actividade osteoclástica dominante na fase final deste período experimental pode, entre outros factores, resultar ao contrário do que até aqui se poderia supor duma acção mediada pela BMPs presentes na matriz. Esta multifuncional família de factores de crescimento parece estar envolvida, não só nos processos de osteogénese, mas também nos mecanismos de reabsorção óssea, por uma acção directa sobre a formação e activação dos osteoclastos. Há estudos recentes ^{84, 232, 243, 244} que apontam para a existência nos osteoclastos de receptores para as BMPs, particularmente para as BMP-2 e para o seu efeito estimulador na osteoclastogénese.

O papel regulador dos factores de crescimento e citocinas nas células ósseas apresenta-se, pois, bastante complexo, sendo muitas vezes difícil definir com rigor a acção de um determinado factor no processo de formação ou reabsorção óssea. Certos factores de crescimento / citocinas têm efeitos diferentes segundo o estado de diferenciação das células alvo sabendo-se que um mesmo factor de crescimento/citocina pode estimular tanto osteoblastos como osteoclastos ^{5, 24, 245}. Dependendo da concentração, o mesmo factor pode exercer efeitos contrários numa mesma célula ^{22, 24, 152}. Estes conceitos, vêm ao encontro da complexidade de muitos factores de crescimento / citocinas, alertando, neste caso, para os efeitos do TGF- β , das BMPs, nas várias etapas da remodelação óssea ²³².

Um pequena nota, também, para sublinhar a existência de um outro estudo ⁴³ que refere que os osteoclastos produzem um factor que estimula, por si só, a formação óssea. Esta factor não deriva da actividade osteoclástica de reabsorção da matriz óssea, mas actua directamente e de forma anabólica nos pré-osteoblastos.

Foi importante mais uma vez observar a íntima associação e cooperação no tempo e no espaço entre osteoblastos e osteoclastos, realizando duas actividades opostas, mas complementares, essenciais aos processos de formação / reabsorção óssea. Estes fenómenos parecem conduzir gradualmente à substituição deste enxerto alógeno por novo tecido ósseo, justificando a sua eficácia terapêutica.

A formulação utilizada neste grupo experimental integra um conjunto de variáveis (matriz óssea descalcificada, colagénio e ácido hialurónico), que isoladamente têm reconhecida actividade osteoindutora e osteopromotora, apresentando certamente a sua associação propriedades reforçadas, que podem ser potencializadas e optimizadas.

Perspectivas futuras

Uma dissertação de mestrado é sempre, como qualquer outro trabalho científico, algo limitado e finito. Pareceu-nos pois que, como nota final, que deveríamos projectar algumas hipóteses de trabalho futuro que no presente constituem questões em aberto, aguardando novos contributos.

Com efeito, os resultados apresentados lançam novas interrogações e abrem novas perspectivas de estudo, em relação a possíveis factores e mecanismos moleculares responsáveis pelo diferente comportamento das várias formulações em análise.

Os trabalhos realizados e os resultados obtidos em microscopia de luz podem ser confirmados e complementados em microscopia electrónica de transmissão e de varrimento. Estes, estudos estão ao nosso alcance e poderiam ser perfeitamente exequíveis, logo numa primeira fase, visando a identificação e análise ultra-estrutural das células envolvidas nos processos de regeneração óssea.

Considerando a enorme diversidade de estruturas celulares e extracelulares envolvidas e de acordo com as capacidades instrumentais de que dispomos, pretendemos numa segunda fase dar continuidade aos trabalhos anteriormente realizados, recorrendo a métodos imunohistoquímicos, imunocitoquímicos e de hibridação molecular.

No presente trabalho, o conjunto dos estudos realizados e os resultados alcançados abrem novas perspectivas para o desenvolvimento de outros trabalhos de investigação clínica e experimental.

Para terminar, pretendemos recordar que o objectivo final dos estudos experimentais apresentados neste trabalho pretendeu dar uma contribuição para um melhor entendimento dos processos de regeneração óssea.

V. Conclusões

Dos estudos realizados e dos resultados obtidos relativamente às formulações testadas e apresentadas neste trabalho experimental foi possível tirar as seguintes conclusões:

1. Todas as formulações utilizadas mostraram uma adequada biocompatibilidade, comprovada pela ausência de reacções adversas ou quaisquer alterações anatomo-patológicas dos tecidos envolventes.

2. Os defeitos ósseos preenchidos com os diferentes materiais de enxerto apresentaram muito maior quantidade de novo osso comparativamente com os defeitos sem preenchimento (**controlo negativo**).

3. O processo de osteogénese de origem intramembranosa foi o mecanismo de ossificação mais frequentemente encontrado em todos os grupos estudados. Porém, em alguns casos foi possível verificar a presença de tecido cartilaginoso num nítido processo ossificação endocondral.

4. O Material **ABM/P-15** granulado funcionou como um excelente suporte osteocondutor e osteopromotor. Os defeitos ósseos preenchidos com partículas de AMB/P-15 foram sendo progressivamente ocupados por uma notável quantidade de tecido ósseo, seguindo uma processo sequencial e centrípeto. Este material de enxerto promoveu a síntese de uma matriz óssea mineralizada, constituída inicialmente por uma rede trabecular de tecido imaturo, que evoluiu para um tecido ósseo mais organizado e funcionalmente mais activo, ligando as partículas entre si às paredes do defeito.

Os estudos histológicos comparativos revelaram que o tecido ósseo formado com base apenas nas partículas de ABM/P-15, não conseguiu atingir em quantidade e quantidade a eficácia observada com outras formulações. Este facto foi particularmente evidente e significativo em relação ao ABM/P-15/Hy liofilizado.

5. A formulação de **ABM/P-15/CMC** (partículas de ABM/P-15 suspensas em hidrogel de carboximetilcelulose) ao permitir uma migração anómala das partículas comprometeu a formação e maturação de uma matriz mineralizada robusta. A instabilidade deste veículo provocou uma distribuição aleatória das partículas e determinou, uma osteocondução imprevisível e, conseqüentemente, uma menor quantidade e qualidade do tecido ósseo desenvolvido.

6. As formulações com hialuronato de sódio forneceram os melhores resultados. De facto o tecido ósseo formado apresentava uma maior celeridade no processo de maturação atingindo rapidamente um aspecto histológico e uma dinâmica bastante semelhante ao observado no tecido ósseo esponjoso.

7. Os ensaios realizados com partículas de ABM/P-15 suspensas numa matriz de hialuronato de sódio - **ABM/P-15/Hy** - mostraram uma fraca concentração de partículas, aliada a uma certa tendência para a sua migração. Esta situação, certamente relacionada com as características físicas do veículo, permitiu, ainda assim, uma formação de tecido ósseo bastante satisfatória, particularmente evidente nas áreas de maior concentração de partículas e situadas na zona periférica e intermédia do defeito.

8. Os estudos realizados com partículas de ABM/P-15 suspensas numa matriz de hialuronato de sódio liofilizado - **ABM/P-15/Hy lio** - apresentaram o melhor desempenho biológico, considerado numa perspectiva de quantidade e de qualidade de tecido ósseo formado e da sua remodelação, associado a uma perfeita osteointegração das partículas. Esta formulação apresentou uma maior facilidade na colocação e estabilização das partículas de ABM/P-15 no defeito ósseo.

9. Apesar do processo de sinterização a que foram sujeitas as partículas de ABM/P-15, tornando a hidroxiapatite óssea mais cristalina, foi notável uma intensa actividade de reabsorção, desmineralização e fragmentação das partículas. Este processo foi naturalmente levado a cabo por osteoclastos, ainda visíveis em lacunas de Howship e esteve presente em todas as formulações associadas a partículas de ABM/P-15.

10. Os defeitos preenchidos com partículas osso alógeno desmineralizado numa matriz hialuronato de sódio - **DBM/Hy** - apresentavam muitas das partículas parcialmente e não totalmente descalcificadas. Este facto levou a comportamentos biológicos variáveis.

As partículas totalmente desmineralizadas sofreram com frequência processos de desorganização e reabsorção, observando-se muitas vezes com frequência uma remineralização da matriz colagénica. A grande parte do tecido ósseo imaturo formado por aposição na superfície destas partículas, não foi, remodelado nem substituído por tecido lamelar.

As partículas parcialmente desmineralizadas apresentavam uma intensa reabsorção osteoclástica e uma melhor e mais rápida osteointegração.

O processo de regeneração óssea que parecia inicialmente tão promissor com esta formulação, não seguiu uma progressão tão eficaz como era de esperar, parecendo no entanto um bom material de reforço.

11. Os resultados obtidos, demonstram a influência das diferentes formulações, como sistemas ostecondutores e osteopromotores capazes de promover ou facilitar a migração de células e a retenção e manutenção de factores moduladores que podem exercer a sua acção ao nível das várias etapas da cascata da regeneração óssea.

A concentração, espaçamento e distribuição tridimensional das partículas e sua estabilidade foi também determinante na formação de novo tecido ósseo, muito especialmente nos períodos mais precoces do processo de osteogénese.

12. A capacidade de otimizar o espaçamento, a manutenção e distribuição tridimensional das partículas, proporcionada pelos veículos transportadores parece potenciar, guiar e suportar uma melhor e mais precoce invasão de celular e angiogénica, necessárias ao desenvolvimento da actividade osteoblástica e osteoclástica.

VI. Resumo

Regenerar o osso perdido ou reabsorvido, é uma das grandes preocupações e desafios do Médico Dentista, necessitando muitas vezes da aplicação de um Biomaterial que permita uma boa regeneração óssea e tecidual.

Com o objectivo de promover modalidades biológicas que possam estimular a regeneração óssea, têm vindo a ser desenhadas várias estratégias biomiméticas recorrendo à utilização de materiais o mais análogos possíveis à matriz óssea, culminando com o desenvolvimento de matrizes minerais naturais, enriquecidas com moduladores biológicos. Nesta perspectiva e deste esforço de optimização, surgiu um material particulado que representa a combinação de uma matriz mineral anorgânica de origem bovina (ABM) à qual está ligado, irreversivelmente, um peptídeo sintético (P-15). Este peptídeo é um análogo da sequência existente no colagénio tipo I, $^{766}\text{GTPGPQGIAGQRGVV}^{780}$, especificamente envolvido na estimulação da migração, adesão e proliferação celular de osteoblastos e fibroblastos, ou seja, no domínio da ligação celular.

Recentemente e numa tentativa de melhorar o manuseamento clínico dos materiais, ou controlar a migração daqueles em partículas optimizando optimizar a sua eficácia clínica, foram desenvolvidas novas formulações deste material, recorrendo a veículos transportadores das partículas de ABM/P-15. A possibilidade de injectar o produto no defeito, mantendo-o no local desejado, sem necessidade de hidratação e compactação, representa um salto qualitativo importante nas propriedades de manuseamento deste material de enxerto ósseo. Porém, estas formulações apresentam um nível de evidência científica reduzido relativamente à avaliação das suas potencialidades regenerativas, assentando sobretudo em estudos *in vitro*.

Deste modo, o trabalho experimental apresentado neste estudo foi concebido com o objectivo de analisar o processo de osteointegração e o potencial de regeneração óssea do ABM/P-15, num defeito ósseo de contenção física, comparando a formulação convencional de partículas isoladas, sem qualquer veículo de transporte, com novas formulações contendo diferentes sistemas de transporte e diferentes concentrações de partículas. Neste contexto, foram utilizados como veículos um hidrogel de carboximetilcelulose e glicerol, um hidrogel de hialuronato de sódio e ainda uma forma liofilizada deste último. Em paralelo, foi ainda utilizada uma formulação de osso cortical granulado e desmineralizado suspensa, também, numa matriz de hialuronato de sódio, obtida de animais da mesma espécie do modelo experimental,

funcionando, pois, como um aloenxerto.

Na realização deste trabalho experimental foi utilizada uma amostra constituída por trinta e dois coelhos (*Oryctolagus cuniculus* da estirpe "New Zealand White", jovens machos adultos com um peso em redor de $3,8 \pm 0,4$ kg), divididos em períodos de avaliação às duas e quatro semanas.

O côndilo do fémur foi a região anatómica escolhida para a realização dos defeitos e colocação das diferentes formulações do material em estudo. Seleccionou-se um modelo de cicatrização óssea de dimensão crítica, com defeitos de contenção física (5 mm de diâmetro por 10 profundidade). Este tipo de defeito representa uma forma adequada de determinar a verdadeira contribuição dos materiais de enxerto para formação de novo tecido ósseo.

A avaliação dos processos de cicatrização óssea assentou essencialmente em estudos de índole histomorfológica, realizados em microscopia de luz e em análises histomorfométricas das lâminas histológicas, com o respectivo tratamento estatístico.

O processamento histológico do material foi realizado no Laboratório de Tecidos Duros, do Departamento de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina Dentária, Estomatologia e Cirurgia Maxilo-Facial da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. As amostras foram preparadas seguindo um protocolo para material não descalcificado recorrendo ao sistema Exakt®. O processamento, com sistema Exakt® de alta precisão, representa uma técnica de excelência para a preparação histológica de tecidos duros não descalcificados. Assim, foi possível a aquisição de imagens histológicas com excelente qualidade, sem distorções morfológicas das estruturas a analisar e sem artefactos relevantes.

Na análise histomorfométrica foram avaliados os seguintes parâmetros: a) quantificação da percentagem de partículas, b) quantificação da percentagem de novo osso, c) percentagem de novo osso versus partículas do enxerto e c) resolução do defeito.

Na análise estatística utilizou-se o teste de *Kruskal Wallis* para a comparação entre os diferentes grupos (inter grupos) e o teste não paramétrico de *Mann-Whitney* para a avaliação intra grupos. Estas análises foram feitas com um nível de significância de 95% ($p \leq 0.05$).

Todas as formulações utilizadas mostraram uma adequada biocompatibilidade comprovada pela ausência de reacções adversas ou quaisquer alterações anatomo-patológicas dos tecidos envolventes. Os defeitos ósseos preenchidos com os diferentes materiais de enxerto apresentaram

muito maior quantidade de novo osso comparativamente com os defeitos sem preenchimento (controlo negativo). De facto, nos defeitos ósseos sem preenchimento, ainda que no início se observe uma evolução no sentido da cicatrização óssea, não se registou em nenhum dos casos estudados um adequado encerramento do defeito, ficando muito longe disso. Com efeito, verificou-se sempre a presença de grande quantidade de tecido fibroso, justificando a sua denominação de defeito de dimensão crítica.

Os defeitos ósseos preenchidos apenas com partículas de AMB/P-15 foram sendo progressivamente ocupados por uma notável quantidade de tecido ósseo, seguindo um processo sequencial e centrípeto. Este material de enxerto promoveu a síntese de uma matriz óssea mineralizada, constituída inicialmente por uma rede trabecular de tecido imaturo, que evoluiu para um tecido ósseo mais organizado e funcionalmente mais activo, ligando as partículas entre se às paredes do defeito. Há que sublinhar, no entanto, a persistência de grandes áreas de tecido ósseo imaturo ainda não remodelado no final do período experimental. Este material de enxerto funcionou como um excelente suporte osteocondutor, que possibilitou e promoveu a síntese de uma matriz mineralizada, constituída inicialmente por uma rede trabecular de osso imaturo, que evoluiu em alguns locais, para um tecido ósseo lamelar.

A composição química de uma matriz que se aproxima bastante da fase mineral do osso (ABM), juntamente com um biomodulador (P-15) e uma microestrutura de superfície com geometria e dimensões adequadas deverá favorecer e estimular a formação de tecido ósseo. As partículas de ABM/P-15 satisfazem estes requisitos, demonstrando neste estudo experimental uma boa capacidade osteocondutora e osteopromotora.

A formulação de partículas de ABM/P-15 suspensas em hidrogel de carboximetilcelulose (ABM/P-15/CMC) ao permitir uma migração anómala das partículas determinou uma osteocondução imprevisível e comprometeu a formação e maturação de uma matriz mineralizada robusta. Apresentando significância estatística em relação aos outros grupos ($p < 0.05$) para formação do novo tecido ósseo. Este efeito migratório foi particularmente visível, aos quinze dias. Esta formulação, mesmo quando estável, apresentou um comportamento fracamente positivo na formação óssea. A migração das partículas observadas neste grupo experimental determinou uma dinâmica de instabilidade que teve certamente uma influência decisiva no comportamento deste material.

Os ensaios realizados com partículas de ABM/P-15 suspensas numa matriz de hialuronato de sódio ABM/P-15/Hy mostraram uma baixa

concentração de partículas, aliada a uma certa tendência para a sua migração. A deposição de tecido ósseo seguiu e acompanhou a distribuição das partículas. As trabéculas ósseas que se apresentavam numa fase de maturação mais adiantada estavam geralmente associadas a áreas de maior concentração de partículas, estando também situadas mais periféricamente.

Os estudos realizados com partículas de ABM/P-15 suspensas numa matriz de hialuronato de sódio liofilizado (ABM/P-15/Hy lio) apresentaram o melhor desempenho biológico, considerado numa perspectiva de quantidade e de qualidade de tecido ósseo formado e da sua remodelação, associado a uma perfeita osteointegração das partículas. A sinergia resultante da combinação do ABM com o P-15 e com Hy irá certamente potenciar uma mais fácil invasão, crescimento e diferenciação das células da linha osteoblástica e osteoclástica, estimulando uma intensa formação e remodelação da matriz óssea, justificando os resultados obtidos com esta formulação. Pode afirmar-se por último que, apesar desta formulação apresentar o mesmo veículo transportador (Hy) e a mesma constituição de partículas (ABM/P-15) do grupo anterior (ABM/P-15/Hy), a liofilização fez toda a diferença na *performance* deste material.

Os defeitos preenchidos com partículas de osso alógeno desmineralizado numa matriz de hialuronato de sódio (DBM/Hy) apresentavam muitas das partículas parcialmente e não totalmente descalcificadas. Este facto levou a comportamentos biológicos diferentes.

O conjunto de estudos apresentados começa com a formação de um tecido ósseo que rapidamente atinge na periferia do defeito uma maturação notável, aos quinze dias. Porém, com o decorrer do tempo, observa-se um cada vez maior grau de desorganização e reabsorção do enxerto, particularmente notório nas partículas completamente desmineralizadas e localizadas no interior do defeito. Grande parte do tecido ósseo imaturo formado por aposição na superfície destas partículas não foi, no entanto, remodelado nem substituído por tecido lamelar, como era expectável aos trinta dias evolução. Este facto poderá estar relacionado com a instabilidade das partículas, não permitindo uma progressão eficaz do processo de regeneração óssea que parecia inicialmente tão promissor. A formulação utilizada neste grupo experimental integra um conjunto de variáveis (matriz óssea descalcificada, colagénio e ácido hialurónico), que isoladamente têm reconhecida actividade osteoindutora e osteopromotora, apresentando certamente a sua associação propriedades reforçadas, que podem ser potencializadas e optimizadas.

A capacidade de otimizar o espaçamento, a manutenção e distribuição tridimensional das partículas, proporcionada pelos veículos transportadores parece potenciar, guiar e suportar uma melhor e mais precoce invasão celular e angiogénica, necessárias ao desenvolvimento das actividades osteoblástica e osteoclástica.

Para terminar, pretendemos recordar que o objectivo final dos estudos experimentais apresentado neste trabalho pretendeu dar uma contribuição para um melhor entendimento dos processo de regeneração óssea.

VII. Summary

The regeneration of lost or resorbed bone tissue is one of the major concerns and challenges of the oral health professional, which requires most often the application of a biomaterial graft to fulfill that clinical aim.

With the objective to promote biological modalities that can stimulate bone regeneration, several biomimetic strategies have been designed using bone matrix analogous materials enriched with biological modulators. According to this optimized perspective, a particulate material has been developed which resulted in the combination of an anorganic bovine-derived matrix (ABM) with the irreversibly linked synthetic peptide (P-15), ⁷⁶⁶GTPGPQGIAGQRGVV⁷⁸⁰. This peptide has an analogous sequence in type I collagen molecule that represents a binding cellular domain, specifically involved in the migration, adhesion, and proliferation of osteoblasts and fibroblasts.

Recently, in an attempt to improve clinical handling of this graft material and control the migration of particles, new formulations have been developed through the association of carriers. The possibility of preserving the graft material with a better tridimensional distribution in the osseous defect, therefore maintaining space, through a direct injectable application, without the need of hydration and compactation, represents a qualitative step in the clinical manipulation of this bone graft. Nevertheless, these formulations have a limited level of scientific evidence regarding regenerative potentialities.

Therefore, the experimental study of this research project was conceived with the aim of evaluating the process of bone cicatrisation, particularly regeneration and osseointegration, of the ABM/P-15 graft in a contained bone defect, comparing the particle formulation without carrier with new formulations with different carriers and particle concentrations. Three carrier formulations were used: an hydrogel of carboxymethylcellulose and glycerol (CMC), sodium hyaluronate hydrogel (Hy) and a lyophilized sodium hyaluronate hydrogel (Hy lio). It was also used an allograft consisting of demineralized rabbit cortical bone with particles suspended in a sodium hyaluronate carrier (DBM/Hy).

This pre-clinical study used a bone regeneration animal model, with the experimental protocol approved by the National Authorities - DGV (Direcção Geral de Veterinária). The animals were housed and manipulated according to the National Legislation (Portaria nº 1005/92 de 23 de Outubro; Portaria nº 1131/97 de 7 de Novembro). The sample size consisted of 32 rabbits, New

Zealand White, male adults with a medium weight of $3.8 \pm 0.4\text{Kg}$, divided in two groups. Each group was composed by 16 animals, which were sacrificed at 2 and 4 weeks postoperative.

A critical size defect model was established through bilateral femoral condylar defects (5mm diameter by 10 mm depth). This type of experimental model represents a suitable way of evaluating the contribution of graft materials to bone regeneration.

The histological tissue processing was prepared according to a non-decalcified technique, using the Exakt[®] system, which allows high quality slide sections with residual morphological distortions and artefacts. This protocol was executed on the Hard Tissue Laboratory of the Dentistry Department of the Faculty of Medicine of the University of Coimbra.

A histological evaluation was performed regarding qualitative morphologic and quantitative morphometric analysis using light microscopy slides. The histomorphometric analysis evaluated the following parameters: a) percentage of new bone formation; b) percentage of graft particles; c) percentage of new bone related to the graft particles d) and defect resolution (new bone plus graft). Statistical analysis used the Kruskal Wallis test for intergroup comparison and the Mann-Whitney test for intragroup comparison at a 95% level of significance ($P \leq 0.05$).

All the implanted material formulations showed good biocompatibility due to the absence of adverse tissue reactions and anatomo-morphological alterations of adjacent tissues. Bone defects filled with the graft materials evidenced greater amount of new bone formation compared with unfilled defects (negative control). In these last cases, there was an early tendency for bone cicatrisation but the late periods of evaluation showed a residual amount of new bone with a repairing pattern of cicatrisation characterized by a predominant presence of fibrous tissue, which was consistent with the critical size of the defect.

The defects filled with the ABM/P-15 particles without carrier evolved to a considerable deposition of bone tissue, progressively from the periphery to the center of the defect. This graft material promoted the formation of a robust mineralized matrix, initially characterized by an immature network of trabecular bone tissue that progressed into a more organized and functional bone tissue interconnecting graft particles. Nevertheless, during the last evaluation period the persistence of areas composed by immature bone could still be observed. This graft material behaved as an excellent osteoconductive

scaffold, promoting the synthesis of a mineralized matrix, which developed to lamellar mature tissue on particular sites.

The chemical composition of a matrix similar to a bone mineral phase (ABM), associated with the biomodulator (P-15), and a surface microstructure with proper dimensions and geometry should stimulate the formation of bone tissue. The ABM/P-15 particles fulfil these requirements demonstrating an osteoconductive and osteopromotive abilities.

The ABM/P-15/CMC presented an anomalous particle migration, which determined an unpredictable osteoconduction, compromising the formation and maturation of a robust mineralized matrix.

The ABM/P-15/Hy showed a low particle concentration associated with a tendency for particle migration. New bone deposition followed particle pattern distribution. Bone trabeculae in a more advanced maturation stage were generally associated with higher particle concentration areas in the periphery of the defect.

On the other hand, ABM/P-15/Hy lio showed the best biological performance, regarding new bone quantity and quality. The process of bone maturation and remodelling was well established associated with a higher particle osseointegration. This formulation promoted a greater tissue invasion, allowing an early growth and differentiation of cells from the osteoblastic and osteoclastic lineage and, consequently, stimulating the formation and remodelling of a mineralized bone matrix. Concerning this particular formulation graft, one can conclude that, despite the same particle and carrier constitution as the above mentioned formulation, the lyophilized form made all the difference allowing for a more suitable particle distribution.

Finally, the DBM/Hy presented a substantial amount of particles partially decalcified, which produced an unpredictable and variable biological behaviour. In the early periods, the defects filled with this graft achieved a notable maturation of bone tissue at its periphery, nevertheless, during the latter evaluation time frame, bone surrounding particles didn't develop into a more mature tissue as expected. This might be related to particle instability, due to an increased progressive desorganization and resorption, which influenced bone cicatrisation evolution.

Based on the results from the experimental animal model, it can be concluded that carriers, as delivery systems of grafts, can influence spacing, tridimensional distribution and location of particles. Therefore, a suitable carrier can enhance a guiding tissue cicatrisation by stimulating an early cellular and angiogenic ingrowth that are paramount for the development of

subsequent osteoblastic and osteoclastic activities, that are major determinants for regeneration and remodeling of a functional mineralized bone matrix.

parte C

BIBLIOGRAFIA

C. BIBLIOGRAFIA

1. McAllister BS, Haghghat K. Bone augmentation techniques. *J Periodontol* 2007;78(3):377-96.
2. Kao ST, Scott DD. A review of bone substitutes. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 2007;19(4):513-21, vi.
3. Bhatnagar RS, Qian JJ, Gough CA. The role in cell binding of a beta-bend within the triple helical region in collagen alpha 1 (I) chain: structural and biological evidence for conformational tautomerism on fiber surface. *J Biomol Struct Dyn* 1997;14(5):547-60.
4. Qian JJ, Bhatnagar RS. Enhanced cell attachment to anorganic bone mineral in the presence of a synthetic peptide related to collagen. *J Biomed Mater Res* 1996;31(4):545-54.
5. Garant PR. *Oral Cells and Tissues*: Quintessence Publishing (IL) 2003.p. 195-238.
6. Standring S. *Gray's Anatomy, 40th Edition - The Anatomical Basis of Clinical Practice*, Expert Consult Churchill Livingstone 2009. p. 27-59.
7. Junqueira LCCJ. Tecido ósseo. In: Koogan G, editor. *Histologia Básica*. 11ª edição ed; 2008. p. 108-26.
8. Kierszenbaum AL. *Histologia e Biologia Celular*. In: Kierszenbaum AL, Editor. Tradução da 2ª Edição ed: Mosby-Elsevier; 2008. p. 136-59.
9. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol* 2008;61(5):577-87.
10. Geddes AC. The Origin of the Osteoblast and of the Osteoclast. *J Anat Physiol* 1913;47(Pt 2):159-76.
11. Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15(1):49-60.
12. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965;150(698):893-9.
13. Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* 2008;42(4):606-15.
14. Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19(5):444-51.
15. Schmitt JM, Buck DC, Joh SP, Lynch SE, Hollinger JO. Comparison of porous bone mineral and biologically active glass in critical-sized defects. *J Periodontol* 1997;68(11):1043-53.
16. Roberts WE, Jeffery AR, Bruce NE, David BB, James KH. Remodeling of Mineralized Tissues, Part I: The Frost Legacy. *Seminars in orthodontics* 2006;12(4):216-37.
17. Fawcett DW, Jensch RP. *Bloom & Fawcett's Concise Histology*. London: Arnold publishers; 2002.
18. Cohen MM, Jr. The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am J Med Genet A* 2006;140(23):2646-706.
19. Rodan GA. Introduction to bone biology. *Bone* 1992;13 Suppl 1:S3-6.
20. Telser A, Young J, Baldwin K. *Elsevier's Integrated Histology*; ed: MOSBY; 2007. p.47-62.
21. Deng ZL, Sharff KA, Tang N, Song WX, Luo J, Luo X, et al. Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development. *Front Biosci* 2008;13:2001-21.
22. Nanci A, Ten Cate AR. *Ten Cate's - Oral Histology - Development, Structure, and Function* In: Nanci A, editor. Sixth Edition ed; 2003. p.34-49.
23. Anderson HC. Mechanism of mineral formation in bone. *Lab Invest* 1989;60(3):320-30.
24. Lemaire V, Tobin FL, Greller LD, Cho CR, Suva LJ. Modeling the interactions between osteoblast and osteoclast activities in bone remodeling. *J Theor Biol* 2004;229(3):293-309.
25. Katchburian E, Arana V. *Conceitos de Biomineralização*. In: Katchburian E, Arana V, editors. *Histologia e Embriologia Oral ,Texto-Atlas-Correlações Clínicas*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA; 2004. p. pag.22-35.
26. Robey PG, Fedarko NS, Hefferan TE, Bianco P, Vetter UK, Grzesik W, et al. Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *J Bone Miner Res* 1993;8 Suppl 2:S483-7.
27. Gay CV, Gilman VR, Sugiyama T. Perspectives on osteoblast and osteoclast function. *Poult Sci* 2000;79(7):1005-8.
28. Xing L, Boyce BF. Regulation of apoptosis in osteoclasts and osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328(3):709-20.
29. Noble B. Bone microdamage and cell apoptosis. *Eur Cell Mater* 2003;6:46-55; discussion 55.
30. Seeman E. Osteocytes--martyrs for integrity of bone strength. *Osteoporos Int* 2006;17(10):1443-8.
31. Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1116:281-90.
32. Bonewald L. Osteocytes as multifunctional cells. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2006;6(4):331-3.
33. Bonivitch AR, Bonewald LF, Nicoletta DP. Tissue strain amplification at the osteocyte lacuna: a microstructural finite element analysis. *J Biomech* 2007;40(10):2199-206.
34. Turner CH, Pavalko FM. Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. *J Orthop Sci* 1998;3(6):346-55.
35. Seeman E. Structural basis of growth-related gain and age-related loss of bone strength. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47 Suppl 4:iv2-8.

36. Noble BS, Reeve J. Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance. *Mol Cell Endocrinol* 2000;159(1-2):7-13.
37. Martin TJ, Ng KW, Nicholson GC. Cell biology of bone. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1988;2(1):1-29.
38. Gardner CR. Comparison of morphological effects of PGE2 and TGFbeta on osteoclastogenesis induced by RANKL in mouse bone marrow cell cultures. *Cell Tissue Res* 2007;330(1):111-21.
39. Rodan SB, Rodan GA. Integrin function in osteoclasts. *J Endocrinol* 1997;154 Suppl:S47-56.
40. Schneider A, Taboas JM, McCauley LK, Krebsbach PH. Skeletal homeostasis in tissue-engineered bone. *J Orthop Res* 2003;21(5):859-64.
41. Li H, Miyahara T, Tezuka Y, Namba T, Suzuki T, Dowaki R, et al. The effect of kampo formulae on bone resorption in vitro and in vivo. II. Detailed study of berberine. *Biol Pharm Bull* 1999;22(4):391-6.
42. Rusu T. [Apoptosis--basic regulatory mechanism of bone remodeling]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2002;106(4):674-9.
43. Karsdal MA, Neutsky-Wulff AV, Dziegiel MH, Christiansen C, Henriksen K. Osteoclasts secrete non-bone derived signals that induce bone formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;366(2):483-8.
44. Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med Eng Phys* 1998;20(2):92-102.
45. Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis* 2002;8(3):147-59.
46. Galliera E, Locati M, Mantovani A, Corsi MM. Chemokines and bone remodeling. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2008;21(3):485-91.
47. Yamashita K, Takagi T. Calcification preceding new bone formation induced by demineralized bone matrix gelatin. *Arch Histol Cytol* 1992;55(1):31-43.
48. Posner AS. Crystal chemistry of bone mineral. *Physiol Rev* 1969;49(4):760-92.
49. Posner AS. The mineral of bone. *Clin Orthop Relat Res* 1985(200):87-99.
50. Kokubo T, Kim HM, Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials* 2003;24(13):2161-75.
51. Kohler DM, Crenshaw MA, Arsenault AL. Three-dimensional analysis of mineralizing turkey leg tendon: matrix vesicle-collagen relationships. *Matrix Biol* 1995;14(7):543-52.
52. 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 [Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro; 2004.
53. Anderson HC. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop Relat Res* 1995(314):266-80.
54. Kirsch T, Wang W, Pfander D. Functional differences between growth plate apoptotic bodies and matrix vesicles. *J Bone Miner Res* 2003;18(10):1872-81.
55. Thouverey C, Strzelecka-Kiliszek A, Balcerzak M, Buchet R, Pikula S. Matrix vesicles originate from apical membrane microvilli of mineralizing osteoblast-like Saos-2 cells. *J Cell Biochem* 2009;106(1):127-38.
56. Kirsch T. Determinants of pathologic mineralization. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2008;18(1):1-9.
57. Sela J, Schwartz Z, Amir D, Swain LD, Boyan BD. The effect of bone injury on extracellular matrix vesicle proliferation and mineral formation. *Bone Miner* 1992;17(2):163-7.
58. Anderson HC, Garimella R, Tague SE. The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Front Biosci* 2005;10:822-37.
59. Kirsch T, Nah HD, Shapiro IM, Pacifici M. Regulated production of mineralization-competent matrix vesicles in hypertrophic chondrocytes. *J Cell Biol* 1997;137(5):1149-60.
60. Parfitt AM. Bone remodeling, normal and abnormal: a biological basis for the understanding of cancer-related bone disease and its treatment. *Can J Oncol* 1995;5 Suppl 1:1-10.
61. Doblare M, Garcia JM. Anisotropic bone remodelling model based on a continuum damage-repair theory. *J Biomech* 2002;35(1):1-17.
62. Roberts WE, Bruce NE, David BB, James KH, Jeffery AR. Remodeling of Mineralized Tissues, Part II: Control and Pathophysiology. *Seminars in orthodontics* 2006;12(4):238-53.
63. Mensah KA, Li J, Schwarz EM. The emerging field of osteoimmunology. *Immunol Res* 2009.
64. Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* 1994;55(3):273-86.
65. Turner CH. Three rules for bone adaptation to mechanical stimuli. *Bone* 1998;23(5):399-407.
66. Frost HM. From Wolff's law to the Utah paradigm: insights about bone physiology and its clinical applications. *Anat Rec* 2001;262(4):398-419.
67. Roberts WE, Simmons KE, Garetto LP, DeCastro RA. Bone physiology and metabolism in dental implantology: risk factors for osteoporosis and other metabolic bone diseases. *Implant Dent* 1992;1(1):11-21.
68. Kiechl S, Werner P, Knoflach M, Furtner M, Willeit J, Schett G. The osteoprotegerin /RANK/RANKL system: a bone key to vascular disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2006;4(6):801-11.

69. Baud'huin M, Lamoureux F, Duplomb L, Redini F, Heymann D. RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. *Cell Mol Life Sci* 2007;64(18):2334-50.
70. Lee SH, Kim TS, Choi Y, Lorenzo J. Osteoimmunology: cytokines and the skeletal system. *BMB Rep* 2008;41(7):495-510.
71. J CL, H C, J EF. Osteoimmunology--the hidden immune regulation of bone. *Autoimmun Rev* 2009;8(3):250-5.
72. Targonska M, Kochanowska I, Ostrowski K, Gorski A. [Osteoimmunology: new area of research on the associations between the immune and bone systems]. *Pol Arch Med Wewn* 2001;105(5):435-40.
73. David JP. Osteoimmunology: a view from the bone. *Adv Immunol* 2007;95:149-65.
74. Rauner M, Sipos W, Pietschmann P. Osteoimmunology. *Int Arch Allergy Immunol* 2007;143(1):31-48.
75. Basak S, Hoffmann A. Crosstalk via the NF-kappaB signaling system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008;19(3-4):187-97.
76. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 2007;7(4):292-304.
77. Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys* 2008;473(2):201-9.
78. Martin T, Gooi JH, Sims NA. Molecular mechanisms in coupling of bone formation to resorption. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2009;19(1):73-88.
79. Kirsch T. Determinants of pathological mineralization. *Curr Opin Rheumatol* 2006;18(2):174-80.
80. Heymann MF, Riet A, Le Goff B, Battaglia S, Paineau J, Heymann D. OPG, RANK and RANK ligand expression in thyroid lesions. *Regul Pept* 2008;148(1-3):46-53.
81. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15(6):457-75.
82. Tyrovola JB, Spyropoulos MN, Makou M, Perrea D. Root resorption and the OPG/RANKL/RANK system: a mini review. *J Oral Sci* 2008;50(4):367-76.
83. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 2008;473(2):139-46.
84. Susperregui AR, Vinals F, Ho PW, Gillespie MT, Martin TJ, Ventura F. BMP-2 regulation of PTHrP and osteoclastogenic factors during osteoblast differentiation of C2C12 cells. *J Cell Physiol* 2008;216(1):144-52.
85. Theoleyre S, Wittrant Y, Couillaud S, Vusio P, Berreur M, Dunstan C, et al. Cellular activity and signaling induced by osteoprotegerin in osteoclasts: involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and MAPK. *Biochim Biophys Acta* 2004;1644(1):1-7.
86. Ukai T, Yumoto H, Gibson FC, 3rd, Genco CA. Macrophage-elicited osteoclastogenesis in response to bacterial stimulation requires Toll-like receptor 2-dependent tumor necrosis factor-alpha production. *Infect Immun* 2008;76(2):812-9.
87. Lu HK, Chen YL, Chang HC, Li CL, Kuo MY. Identification of the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic periodontitis. *J Periodontol Res* 2006;41(4):354-60.
88. Roberts WE. Bone physiology of tooth movement, ankylosis, and osseointegration. *Seminars in orthodontics* 2000;6(3):173-82.
89. Nowzari H, Botero JE, DeGiacomo M, Villacres MC, Rich SK. Microbiology and cytokine levels around healthy dental implants and teeth. *Clin Implant Dent Relat Res* 2008;10(3):166-73.
90. Tat SK, Pelletier JP, Lajeunesse D, Fahmi H, Duval N, Martel-Pelletier J. Differential modulation of RANKL isoforms by human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts: influence of osteotropic factors. *Bone* 2008;43(2):284-91.
91. Yamashita T, Takahashi N, Yang S, Sato N, Udagawa N. [Bone destruction caused by osteoclasts]. *Clin Calcium* 2006;16(2):234-40.
92. Takata T. Oral wound healing concepts in periodontology. *Curr Opin Periodontol* 1994:119-27.
93. Takata T, Katauchi K, Akagawa Y, Nikai H. New periodontal ligament formation on a synthetic hydroxyapatite surface. *Clin Oral Implants Res* 1993;4(3):130-6.
94. Takata T, Katauchi K, Akagawa Y, Nikai H. New connective tissue attachment formation on various biomaterials implanted in roots. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994;9(1):77-84.
95. Blumenthal NM, Alves ME, Al-Huwais S, Hofbauer AM, Koperski RD. Defect-determined regenerative options for treating periodontal intrabony defects in baboons. *J Periodontol* 2003;74(1):10-24.
96. Wikesjo UM, Selvig KA. Periodontal wound healing and regeneration. *Periodontol* 2000 1999;19:21-39.
97. Polimeni G, Susin C, Wikesjo UM. Regenerative potential and healing dynamics of the periodontium: a critical-size supra-alveolar periodontal defect study. *J Clin Periodontol* 2009;36(3):258-64.
98. Wikesjo UM, Nilveus RE, Selvig KA. Significance of early healing events on periodontal repair: a review. *J Periodontol* 1992;63(3):158-65.

99. Koo KT, Polimeni G, Qahash M, Kim CK, Wikesjo UM. Periodontal repair in dogs: guided tissue regeneration enhances bone formation in sites implanted with a coral-derived calcium carbonate biomaterial. *J Clin Periodontol* 2005;32(1):104-10.
100. Mikos AG, Herring SW, Ochareon P, Elisseeff J, Lu HH, Kandel R, et al. Engineering complex tissues. *Tissue Eng* 2006;12(12):3307-39.
101. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci* 2004;4(8):743-65.
102. Oreffo RO, Triffitt JT. Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics. *Bone* 1999;25(2 Suppl):5S-9S.
103. 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.
104. Hoexter DL. Bone regeneration graft materials. *J Oral Implantol* 2002;28(6):290-4.
105. Frohlich M, Grayson WL, Wan LQ, Marolt D, Drobic M, Vunjak-Novakovic G. Tissue engineered bone grafts: biological requirements, tissue culture and clinical relevance. *Curr Stem Cell Res Ther* 2008;3(4):254-64.
106. Giannoudis PV, Einhorn TA, Schmidmaier G, Marsh D. The diamond concept--open questions. *Injury* 2008;39 Suppl 2:S5-8.
107. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury* 2007;38 Suppl 4:S3-6.
108. Schmidmaier G, Schwabe P, Strobel C, Wildemann B. Carrier systems and application of growth factors in orthopaedics. *Injury* 2008;39 Suppl 2:S37-43.
109. Slavkin HC. Biomimetics: replacing body parts is no longer science fiction. *J Am Dent Assoc* 1996;127(8):1254-7.
110. Zuk PA. Tissue engineering craniofacial defects with adult stem cells? Are we ready yet? *Pediatr Res* 2008.
111. Gurtner GC, Callaghan MJ, Longaker MT. Progress and potential for regenerative medicine. *Annu Rev Med* 2007;58:299-312.
112. Hing KA. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 2004;362(1825):2821-50.
113. Holy CE, Fialkov JA, Davies JE, Shoichet MS. Use of a biomimetic strategy to engineer bone. *J Biomed Mater Res A* 2003;65(4):447-53.
114. Kaigler D, Mooney D. Tissue engineering's impact on dentistry. *J Dent Educ* 2001;65(5):456-62.
115. Earthman JC, Sheets CG, Paquette JM, Kaminishi RM, Nordland WP, Keim RG, et al. Tissue engineering in dentistry. *Clin Plast Surg* 2003;30(4):621-39.
116. Chung EH, Gilbert M, Virdi AS, Sena K, Sumner DR, Healy KE. Biomimetic artificial ECMs stimulate bone regeneration. *J Biomed Mater Res A* 2006;79(4):815-26.
117. Chai Y, Slavkin HC. Prospects for tooth regeneration in the 21st century: a perspective. *Microsc Res Tech* 2003;60(5):469-79.
118. Fedorovich NE, Alblas J, de Wijn JR, Hennink WE, Verbout AJ, Dhert WJ. Hydrogels as extracellular matrices for skeletal tissue engineering: state-of-the-art and novel application in organ printing. *Tissue Eng* 2007;13(8):1905-25.
119. Borojevic R. Medicina Regenerativa: Terapias Celulares, Bioengenaharia e Biomimética. *Parcerias Estratégicas* 2005;20:1640-47.
120. Matos SM, Guerra FA, Krauser J, Marques F, Ermida JM, Sanz M. Clinical evaluation of the combination of anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix/cell-binding peptide (P-15) in particulate and hydrogel form as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects: 6-month reentry controlled clinical study. *J Periodontol* 2007;78(10):1855-63.
121. Matos SM. Regeneração Periodontal - Aplicação de matrizes enriquecidas com Modeladores Biológicos [Coimbra: Universidade de Coimbra; 2008.
122. Bhongade ML, Tiwari IR. A comparative evaluation of the effectiveness of an anorganic bone matrix/cell binding peptide with an open flap debridement in human infrabony defects: a clinical and radiographic study. *J Contemp Dent Pract* 2007;8(6):25-34.
123. Kasaj A, Rohrig B, Reichert C, Willershausen B. Clinical evaluation of anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix/cell-binding peptide (P-15) in the treatment of human infrabony defects. *Clin Oral Investig* 2008.
124. Barboza EP, de Souza RO, Caula AL, Neto LG, Caula Fde O, Duarte ME. Bone regeneration of localized chronic alveolar defects utilizing cell binding peptide associated with anorganic bovine-derived bone mineral: a clinical and histological study. *J Periodontol* 2002;73(10):1153-9.
125. Bhatnagar RS, Qian JJ, Wedrychowska A, Sadeghi M, Wu YM, Smith N. Design of biomimetic habitats for tissue engineering with P-15, a synthetic peptide analogue of collagen. *Tissue Eng* 1999;5(1):53-65.

126. Emecen P, Akman AC, Hakki SS, Hakki EE, Demiralp B, Tiv̇dzv̇m TF, et al. ABM/P-15 modulates proliferation and mRNA synthesis of growth factors of periodontal ligament cells. *Acta Odontologica Scandinavica* 2009;67(2):65 - 73.
127. Guerra FA, Krauser JT CA, Matos SM, Marcelino JP, Brites CC. . Small Peptide (P-15) bone substitute efficacy in a rabbit cancellous bone model. . 51 st Annual Meeting of Orthopaedic Research Society.: Paper # 0212; 2005.
128. Henriques JC. Caracterização de Biomateriais de Substituição Óssea Utilizados em Medicina Dentária [Tese de Mestrado em Patologia Experimental]. Coimbra: Universidade de Coimbra; 2005.
129. Bhatnagar R, Li S. Biomimetic scaffolds for tissue engineering. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2004;7:5021-3.
130. Neiva RF, Tsao YP, Eber R, Shotwell J, Billy E, Wang HL. Effects of a Putty-Form Hydroxyapatite Matrix Combined With the Synthetic Cell-Binding Peptide P-15 on Alveolar Ridge Preservation. *J Periodontol* 2008;79(2):291-99.
131. Neiva RF, Tsao YP, Eber R, Shotwell J, Billy E, Wang HL. Effects of a putty-form hydroxyapatite matrix combined with the synthetic cell-binding peptide P-15 on alveolar ridge preservation. *J Periodontol* 2008;79(2):291-9.
132. Yukna RA, Krauser JT, Callan DP, Evans GH, Cruz R, Martin M. Thirty-six month follow-up of 25 patients treated with combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell-binding peptide (P-15) bone replacement grafts in human infrabony defects. I. Clinical findings. *J Periodontol* 2002;73(1):123-8.
133. Yukna RA, Krauser JT, Callan DP, Evans GH, Cruz R, Martin M. Multi-center clinical comparison of combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell binding peptide (P-15) and ABM in human periodontal osseous defects. 6-month results. *J Periodontol* 2000;71(11):1671-9.
134. Yukna RA, Callan DP, Krauser JT, Evans GH, Aichelmann-Reidy ME, Moore K, et al. Multi-center clinical evaluation of combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell binding peptide (P-15) as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects. 6-month results. *J Periodontol* 1998;69(6):655-63.
135. Yukna R, Salinas TJ, Carr RF. Periodontal regeneration following use of ABM/P-1 5: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002;22(2):146-55.
136. Yang XB, Bhatnagar RS, Li S, Oreffo RO. Biomimetic collagen scaffolds for human bone cell growth and differentiation. *Tissue Eng* 2004;10(7-8):1148-59.
137. Scarano A, Iezzi G, Petrone G, Orsini G, Degidi M, Strocchi R, et al. Cortical bone regeneration with a synthetic cell-binding peptide: a histologic and histomorphometric pilot study. *Implant Dent* 2003;12(4):318-24.
138. Barros RR, Novaes AB, Jr., Roriz VM, Oliveira RR, Grisi MF, Souza SL, et al. Anorganic bovine matrix/p-15 "flow" in the treatment of periodontal defects: case series with 12 months of follow-up. *J Periodontol* 2006;77(7):1280-7.
139. Sarahrudi K, Mousavi M, Grossschmidt K, Sela N, König F, Vecsei V, et al. Combination of anorganic bovine-derived hydroxyapatite with binding peptide does not enhance bone healing in a critical-size defect in a rabbit model. *J Orthop Res* 2008.
140. Radhakrishnan S, Anusuya CN. Comparative clinical evaluation of combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell binding peptide (P-15) and open flap debridement (DEBR) in human periodontal osseous defects: a 6 month pilot study. *J Int Acad Periodontol* 2004;6(3):101-7.
141. Nguyen H, Qian JJ, Bhatnagar RS, Li S. Enhanced cell attachment and osteoblastic activity by P-15 peptide-coated matrix in hydrogels. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311(1):179-86.
142. Hole BB, Schwarz JA, Gilbert JL, Atkinson BL. A study of biologically active peptide sequences (P-15) on the surface of an ABM scaffold (PepGen P-15) using AFM and FTIR. *J Biomed Mater Res A* 2005;74(4):712-21.
143. Hanks T, Atkinson BL. Comparison of cell viability on anorganic bone matrix with or without P-15 cell binding peptide. *Biomaterials* 2004;25(19):4831-6.
144. FDA. Center for devices and radiological health. Tripartite subcommittee on medical devices, Toxicology subgrp. Tripartite biocompatibility guidance for medical devices. . In: health M-USFaDaCfdar, editor: Rockvill; 1986.
145. Habibovic P, Gbureck U, Doillon CJ, Bassett DC, van Blitterswijk CA, Barralet JE. Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants. *Biomaterials* 2008;29(7):944-53.
146. Liao YH, Jones SA, Forbes B, Martin GP, Brown MB. Hyaluronan: pharmaceutical characterization and drug delivery. *Drug Deliv* 2005;12(6):327-42.
147. Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007;23:435-61.
148. Watanabe K, Yamaguchi Y. Molecular identification of a putative human hyaluronan synthase. *J Biol Chem* 1996;271(38):22945-8.

149. Krasinski R, Tchorzewski H. [Hyaluronan-mediated regulation of inflammation]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2007;61:683-9.
150. Fujishiro T, Bauer TW, Kobayashi N, Kobayashi H, Sunwoo MH, Seim HB, 3rd, et al. Histological evaluation of an impacted bone graft substitute composed of a combination of mineralized and demineralized allograft in a sheep vertebral bone defect. *J Biomed Mater Res A* 2007;82(3):538-44.
151. Liao E, Yaszemski M, Krebsbach P, Hollister S. Tissue-engineered cartilage constructs using composite hyaluronic acid/collagen I hydrogels and designed poly(propylene fumarate) scaffolds. *Tissue Eng* 2007;13(3):537-50.
152. Brekke JH, Toth JM. Principles of tissue engineering applied to programmable osteogenesis. *J Biomed Mater Res* 1998;43(4):380-98.
153. Yamawaki H, Hirohata S, Miyoshi T, Takahashi K, Ogawa H, Shinohata R, et al. Hyaluronan receptors involved in cytokine induction in monocytes. *Glycobiology* 2009;19(1):83-92.
154. Kim J, Park Y, Tae G, Lee KB, Hwang CM, Hwang SJ, et al. Characterization of low-molecular-weight hyaluronic acid-based hydrogel and differential stem cell responses in the hydrogel microenvironments. *J Biomed Mater Res A* 2009;88(4):967-75.
155. Huang L, Cheng YY, Koo PL, Lee KM, Qin L, Cheng JC, et al. The effect of hyaluronan on osteoblast proliferation and differentiation in rat calvarial-derived cell cultures. *J Biomed Mater Res A* 2003;66(4):880-4.
156. Schimizzi AL, Massie JB, Murphy M, Perry A, Kim CW, Garfin SR, et al. High-molecular-weight hyaluronan inhibits macrophage proliferation and cytokine release in the early wound of a preclinical postlaminectomy rat model. *Spine J* 2006;6(5):550-6.
157. Habibovic P, de Groot K. Osteoinductive biomaterials--properties and relevance in bone repair. *J Tissue Eng Regen Med* 2007;1(1):25-32.
158. Taylor KR, Yamasaki K, Radek KA, Di Nardo A, Goodarzi H, Golenbock D, et al. Recognition of hyaluronan released in sterile injury involves a unique receptor complex dependent on Toll-like receptor 4, CD44, and MD-2. *J Biol Chem* 2007;282(25):18265-75.
159. Becker W, Schenk R, Higuchi K, Lekholm U, Becker BE. Variations in bone regeneration adjacent to implants augmented with barrier membranes alone or with demineralized freeze-dried bone or autologous grafts: a study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1995;10(2):143-54.
160. Schwartz Z, Somers A, Mellonig JT, Carnes DL, Jr., Dean DD, Cochran DL, et al. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation is dependent on donor age but not gender. *J Periodontol* 1998;69(4):470-8.
161. Boyan B, McMillan J, Lohmann CH, Ranly DM, Schwartz Z. Bone graft substitutes: Basic information for successful clinical use with special focus on synthetic graft substitutes. *Bone Grafts Substitutes* 2003; ed. Laurencin CT; ASTM International; Chapter 13: 231-259; 2003.
162. Schwartz Z, Somers A, Mellonig JT, Carnes DL, Jr., Wozney JM, Dean DD, et al. Addition of human recombinant bone morphogenetic protein-2 to inactive commercial human demineralized freeze-dried bone allograft makes an effective composite bone inductive implant material. *J Periodontol* 1998;69(12):1337-45.
163. Glowacki J, Mulliken JB. Demineralized bone implants. *Clin Plast Surg* 1985;12(2):233-41.
164. Shih HN, Shih LY, Sung TH, Chang YC. Restoration of bone defect and enhancement of bone ingrowth using partially demineralized bone matrix and marrow stromal cells. *J Orthop Res* 2005;23(6):1293-9.
165. Cook SD, Salkeld SL, Patron LP, Barrack RL. The effect of demineralized bone matrix gel on bone ingrowth and fixation of porous implants. *J Arthroplasty* 2002;17(4):402-8.
166. Becker W, Becker BE, Caffesse R. A comparison of demineralized freeze-dried bone and autologous bone to induce bone formation in human extraction sockets. *J Periodontol* 1994;65(12):1128-33.
167. Wildemann B, Kadow-Romacker A, Pruss A, Haas NP, Schmidmaier G. Quantification of growth factors in allogenic bone grafts extracted with three different methods. *Cell Tissue Bank* 2007;8(2):107-14.
168. Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL, Gunsolley JC. The efficacy of bone replacement grafts in the treatment of periodontal osseous defects. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003;8(1):227-65.
169. AAP AAoP. Position Paper; Tissue Banking of Bone Allografts Used in Periodontal Regeneration. *J Periodontol* 2001;72(6):834-38.
170. Boyan BD, Ranly DM, McMillan J, Sunwoo M, Roche K, Schwartz Z. Osteoinductive ability of human allograft formulations. *J Periodontol* 2006;77(9):1555-63.
171. Wang JC, Alanay A, Mark D, Kanim LE, Campbell PA, Dawson EG, et al. A comparison of commercially available demineralized bone matrix for spinal fusion. *Eur Spine J* 2007;16(8):1233-40.
172. Portaria n. Portaria nº1005/92 de 23 de Outubro. Ministério da Agricultura, Educação, Saúde e Comercio e Turismo. Portugal; 1992. p. Diário da República Portuguesa- I -Série -B; nº 245: 4930-42, 23/10/92.

173. Portaria n. Portaria nº 466/95, de 17 de Maio de 1995: Ministério da Agricultura, Educação, Saúde e Comercio e Turismo. Diário da República Portuguesa I -Série -B; nº 245; 1995.
174. Portaria n. Portaria nº1131/97 de 7 de Novembro: Diário da República Portuguesa I -Série -B; nº 258: 6112-13,7/11/97; 1997.
175. Judas F, Figueiredo MH, Cabrita AM, Proenca A. Incorporation of impacted morselized bone allografts in rabbits. *Transplant Proc* 2005;37(6):2802-4.
176. Oonishi H, Hench LL, Wilson J, Sugihara F, Tsuji E, Matsuura M, et al. Quantitative comparison of bone growth behavior in granules of Bioglass, A-W glass-ceramic, and hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 2000;51(1):37-46.
177. Chan C, Thompson I, Robinson P, Wilson J, Hench L. Evaluation of Bioglass/dextran composite as a bone graft substitute. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002;31(1):73-7.
178. Oonishi H KSea. Bone growth into spaces between 45S5 bioglass granules. In: Andersson OH Y-UA, editor. *Bioceramics*; 1994. p. 139-44.
179. Anderson RS EA. *Practical animal handling*. Oxford; 1991.
180. Tuffrey A, editor. *Laboratory animals: an introduction for new experimenters*. Chichester; 1987. Ltd JWaS, editor.
181. Cooley B, editor. *A laboratory manual for microvascular and microtubular surgery*. Norwell: Look, Inc.; 1994.
182. Lumley JSP GC, Lear P, Angell-James JE editor. *Essentials of Experimental Surgery*. London: Butterworths & Co; 1990.
183. Donath K. The diagnostic value of the new method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissue (Sage-Schliff (sawing and grinding) technique). *Pathol Res Pract* 1985;179(6):631-3.
184. Donath K. Bone Sectioning Using the Exakt System. In: Yuehuei H. An K, editor. *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*: L. MartinHumana Press; 2003. p. 243-52.
185. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 1982;11(4):318-26.
186. Guerra F. *Biomimética Formulações haptotáticas para aplicação em regeneração óssea*. Coimbra: Universidade de Coimbra; 2003.
187. Klinge B, Alberius P, Isaksson S, Jonsson J. Osseous response to implanted natural bone mineral and synthetic hydroxylapatite ceramic in the repair of experimental skull bone defects. *J Oral Maxillofac Surg* 1992;50(3):241-9.
188. Kong L, Ao Q, Wang A, Gong K, Wang X, Lu G, et al. Preparation and characterization of a multilayer biomimetic scaffold for bone tissue engineering. *J Biomater Appl* 2007;22(3):223-39.
189. Aichelmann-Reidy ME, Yukna RA. Bone replacement grafts. The bone substitutes. *Dent Clin North Am* 1998;42(3):491-503.
190. Kubler A, Neugebauer J, Oh JH, Scheer M, Zoller JE. Growth and proliferation of human osteoblasts on different bone graft substitutes: an in vitro study. *Implant Dent* 2004;13(2):171-9.
191. Neyt JG, Buckwalter JA, Carroll NC. Use of animal models in musculoskeletal research. *Iowa Orthop J* 1998;18:118-23.
192. Fialkov JA, Holy CE, Shoichet MS, Davies JE. In vivo bone engineering in a rabbit femur. *J Craniofac Surg* 2003;14(3):324-32.
193. Clokie CM, Moghadam H, Jackson MT, Sandor GK. Closure of critical sized defects with allogenic and alloplastic bone substitutes. *J Craniofac Surg* 2002;13(1):111-21; discussion 22-3.
194. Sirola K. Regeneration of defects in the calvaria. An experimental study. *Ann Med Exp Biol Fenn* 1960;38(Suppl 2):1-87.
195. Dodde R, 2nd, Yavuzer R, Bier UC, Alkadri A, Jackson IT. Spontaneous bone healing in the rabbit. *J Craniofac Surg* 2000;11(4):346-9.
196. Takagi K, Urist MR. The role of bone marrow in bone morphogenetic protein-induced repair of femoral massive diaphyseal defects. *Clin Orthop Relat Res* 1982(171):224-31.
197. Thaller SR, Hoyt J, Borjeson K, Dart A, Tesluk H. Reconstruction of calvarial defects with anorganic bovine bone mineral (Bio-Oss) in a rabbit model. *J Craniofac Surg* 1993;4(2):79-84.
198. Oonishi H, Kushitani S, Yasukawa E, Iwaki H, Hench LL, Wilson J, et al. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. *Clin Orthop Relat Res* 1997(334):316-25.
199. Oonishi H, Hench LL, Wilson J, Sugihara F, Tsuji E, Kushitani S, et al. Comparative bone growth behavior in granules of bioceramic materials of various sizes. *J Biomed Mater Res* 1999;44(1):31-43.
200. Rimondini L, Nicoli-Aldini N, Fini M, Guzzardella G, Tschon M, Giardino R. In vivo experimental study on bone regeneration in critical bone defects using an injectable biodegradable PLA/PGA copolymer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99(2):148-54.
201. Aaboe M, Pinholt EM, Hjorting-Hansen E. Unicortical critical size defect of rabbit tibia is larger than 8 mm. *J Craniofac Surg* 1994;5(3):201-3.
202. Caiazza S, Colangelo P, Bedini R, Formisano G, De Angelis G, Barrucci S. Evaluation of guided bone regeneration in rabbit femur using collagen membranes. *Implant Dent* 2000;9(3):219-25.

203. Polimeni G, Koo KT, Qahash M, Xiropaidis AV, Albandar JM, Wikesjo UM. Prognostic factors for alveolar regeneration: bone formation at teeth and titanium implants. *J Clin Periodontol* 2004;31(11):927-32.
204. Sigurdsson TJ, Tatakis DN, Lee MB, Wikesjo UM. Periodontal regenerative potential of space-providing expanded polytetrafluoroethylene membranes and recombinant human bone morphogenetic proteins. *J Periodontol* 1995;66(6):511-21.
205. Rosen VB, Hobbs LW, Spector M. The ultrastructure of anorganic bovine bone and selected synthetic hydroxyapatites used as bone graft substitute materials. *Biomaterials* 2002;23(3):921-8.
206. Posner AS. The structure of bone apatite surfaces. *J Biomed Mater Res* 1985;19(3):241-50.
207. Du C, Meijer GJ, van de Valk C, Haan RE, Bezemer JM, Hesselting SC, et al. Bone growth in biomimetic apatite coated porous Polyactive 1000PEGT70PBT30 implants. *Biomaterials* 2002;23(23):4649-56.
208. Skoglund A, Hising P, Young C. A clinical and histologic examination in humans of the osseous response to implanted natural bone mineral. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997;12(2):194-9.
209. Hahn J, Rohrer MD, Tofe AJ. Clinical, radiographic, histologic, and histomorphometric comparison of PepGen P-15 particulate and PepGen P-15 flow in extraction sockets: a same-mouth case study. *Implant Dent* 2003;12(2):170-4.
210. Trasatti C, Spears R, Gutmann JL, Opperman LA. Increased Tgf-beta1 production by rat osteoblasts in the presence of PepGen P-15 in vitro. *J Endod* 2004;30(4):213-7.
211. Hennessy KM, Pollot BE, Clem WC, Phipps MC, Sawyer AA, Culpepper BK, et al. The effect of collagen I mimetic peptides on mesenchymal stem cell adhesion and differentiation, and on bone formation at hydroxyapatite surfaces. *Biomaterials* 2009;30(10):1898-909.
212. Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 2006;27(15):2907-15.
213. Dos Santos EA, Farina M, Soares GA, Anselme K. Chemical and topographical influence of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate surfaces on human osteoblastic cell behavior. *J Biomed Mater Res A* 2008.
214. Bigerelle M, Anselme K, Noel B, Ruderman I, Hardouin P, Iost A. Improvement in the morphology of Ti-based surfaces: a new process to increase in vitro human osteoblast response. *Biomaterials* 2002;23(7):1563-77.
215. Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Dufresne E, Judas D, Iost A, et al. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. *J Biomed Mater Res* 2000;49(2):155-66.
216. Rouahi M, Champion E, Hardouin P, Anselme K. Quantitative kinetic analysis of gene expression during human osteoblastic adhesion on orthopaedic materials. *Biomaterials* 2006;27(14):2829-44.
217. Anselme K, Bigerelle M. Statistical demonstration of the relative effect of surface chemistry and roughness on human osteoblast short-term adhesion. *J Mater Sci Mater Med* 2006;17(5):471-9.
218. Anselme K, Bigerelle M. Modelling approach in cell/material interactions studies. *Biomaterials* 2006;27(8):1187-99.
219. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 2000;21(7):667-81.
220. dos Santos EA, Farina M, Soares GA, Anselme K. Surface energy of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate ceramics driving serum protein adsorption and osteoblast adhesion. *J Mater Sci Mater Med* 2008;19(6):2307-16.
221. Dickson G, Buchanan F, Marsh D, Harkin-Jones E, Little U, McCaigue M. Orthopaedic tissue engineering and bone regeneration. *Technol Health Care* 2007;15(1):57-67.
222. Wikesjo UM, Lim WH, Razi SS, Sigurdsson TJ, Lee MB, Tatakis DN, et al. Periodontal repair in dogs: a bioabsorbable calcium carbonate coral implant enhances space provision for alveolar bone regeneration in conjunction with guided tissue regeneration. *J Periodontol* 2003;74(7):957-64.
223. Pratt AB, Weber FE, Schmoekel HG, Muller R, Hubbell JA. Synthetic extracellular matrices for in situ tissue engineering. *Biotechnol Bioeng* 2004;86(1):27-36.
224. Wikesjo UM, Nilveus R. Periodontal repair in dogs: effect of wound stabilization on healing. *J Periodontol* 1990;61(12):719-24.
225. Yoshikawa M, Tsuji N, Toda T, Ohgushi H. Osteogenic effect of hyaluronic acid sodium salt in the pores of a hydroxyapatite scaffold. *Materials Science and Engineering: C* 2007;27(2):220-26.
226. Favia G, Mariggio MA, Maiorano F, Cassano A, Capodiferro S, Ribatti D. Accelerated wound healing of oral soft tissues and angiogenic effect induced by a pool of aminoacids combined to sodium hyaluronate (AMINOGAM). *J Biol Regul Homeost Agents* 2008;22(2):109-16.
227. Camenisch TD, McDonald JA. Hyaluronan: is bigger better? *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23(4):431-3.
228. Giavaresi G, Torricelli P, Fornasari PM, Giardino R, Barbucci R, Leone G. Blood vessel formation after soft-tissue implantation of hyaluronan-based hydrogel supplemented with copper ions. *Biomaterials* 2005;26(16):3001-8.

229. Falconi D, Aubin JE. LIF inhibits osteoblast differentiation at least in part by regulation of HAS2 and its product hyaluronan. *J Bone Miner Res* 2007;22(8):1289-300.
230. Pivonka P, Zimak J, Smith DW, Gardiner BS, Dunstan CR, Sims NA, et al. Model structure and control of bone remodeling: a theoretical study. *Bone* 2008;43(2):249-63.
231. Schwartz Z, Weesner T, van Dijk S, Cochran DL, Mellonig JT, Lohmann CH, et al. Ability of deproteinized cancellous bovine bone to induce new bone formation. *J Periodontol* 2000;71(8):1258-69.
232. Itoh K, Udagawa N, Katagiri T, Iemura S, Ueno N, Yasuda H, et al. Bone morphogenetic protein 2 stimulates osteoclast differentiation and survival supported by receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand. *Endocrinology* 2001;142(8):3656-62.
233. Buser D, Hoffmann B, Bernard JP, Lussi A, Mettler D, Schenk RK. Evaluation of filling materials in membrane-protected bone defects. A comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs. *Clin Oral Implants Res* 1998;9(3):137-50.
234. Yamashita K, Takagi T. Ultrastructural observation of calcification preceding new bone formation induced by demineralized bone matrix gelatin. *Acta Anat (Basel)* 1992;143(4):261-7.
235. Yamashita K, Horisaka Y, Okamoto Y, Yoshimura Y, Matsumoto N, Kawada J, et al. Architecture of implanted bone matrix gelatin influences heterotopic calcification and new bone formation. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991;197(3):342-7.
236. Linden GJ. Bone induction in implants of decalcified bone and dentine. *J Anat* 1975;119(Pt 2):359-67.
237. Urist MR, Iwata H, Ceccotti PL, Dorfman RL, Boyd SD, McDowell RM, et al. Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973;70(12):3511-5.
238. Urist MR, Mikulski AJ, Nakagawa M, Yen K. A bone matrix calcification-initiator noncollagenous protein. *Am J Physiol* 1977;232(3):C115-27.
239. Guo MZ, Xia ZS, Lin LB. The mechanical and biological properties of demineralised cortical bone allografts in animals. *J Bone Joint Surg Br* 1991;73(5):791-4.
240. Delloye C, Cnockaert N, Cornu O. Bone substitutes in 2003: an overview. *Acta Orthop Belg* 2003;69(1):1-8.
241. Delloye C, Cornu O, Druetz V, Barbier O. Bone allografts: What they can offer and what they cannot. *J Bone Joint Surg Br* 2007;89(5):574-9.
242. Judas F. Contribution to the study of Morselized Bone Allografts and Biomaterials. [PhD Thesis.]. Coimbra: Coimbra University; 2002.
243. Giannoudis PV, Kanakaris NK, Einhorn TA. Interaction of bone morphogenetic proteins with cells of the osteoclast lineage: review of the existing evidence. *Osteoporos Int* 2007;18(12):1565-81.
244. Kaneko H, Arakawa T, Mano H, Kaneda T, Ogasawara A, Nakagawa M, et al. Direct stimulation of osteoclastic bone resorption by bone morphogenetic protein (BMP)-2 and expression of BMP receptors in mature osteoclasts. *Bone* 2000;27(4):479-86.
245. Siddhanti SR, Quarles LD. Molecular to pharmacologic control of osteoblast proliferation and differentiation. *J Cell Biochem* 1994;55(3):310-20.

Índice geral

Agradecimentos	7
Sumário	9
<i>A.</i> INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS	11
1. Introdução	17
2. Células do tecido ósseo	18
2.1. Células da linha osteoblástica	18
2.2. Osteoclastos	22
3. Matriz extracelular	25
3.1. Fase orgânica	25
3.2. Fase inorgânica	27
4. Mineralização da matriz	28
5. Dinâmica do tecido ósseo	31
6. Remodelação Óssea	32
7. Sistema de citocinas RANKL/RANK/ OPG	35
8. Alguns princípios de regeneração óssea	39
<i>B.</i> ESTUDO EXPERIMENTAL EM MODELO ANIMAL	41
I. Objectivos	43
II. Material e métodos	45
1. Materiais de enxerto ósseo	45
1.1. Mineral Anorgânico derivado de Bovino com P-15 (ABM/P-15)	45
1.2. Partículas de ABM/P-15 num hidrogel de carboximetilcelulose e glicerol (ABM/P-15/CMC)	47
1.3. Partículas de ABM/P-15 num hidrogel de hialuronato de sódio (ABM/P-15/ Hy)	49
1.4. Partículas de ABM/P-15 num hidrogel de hialuronato de sódio liofilizado (ABM/P-15/ Hy lio)	49
1.5. Partículas de osso alógeno desmineralizado num hidrogel de hialuronato de sódio (DBM/Hy)	50
2. Estudo in vivo	51
2.1. Amostra	51

2.2. Manutenção, manipulação e bem estar animal	51
2.3. Protocolos experimentais	52
2.3.1. Defeito ósseo experimental	52
2.3.2. Grupos experimentais	53
2.3.4. Volume do material colocado.....	55
2.4. Medidas pré-anestésicas.....	55
2.5. Anestesia	56
2.6. Preparação do local cirúrgico e posicionamento do animal	56
2.7. Cirurgia.....	57
2.8. Medicação e manipulação pós-operatória	58
2.9. Eutanásia e necropsia dos animais	59
2.10. Colheita do material	59
2.11. Processamento histológico das amostras	59
2.11.1. Fixação e Lavagem.....	60
2.11.2. Desidratação e infiltração	60
2.11.3. Inclusão / polimerização	60
2.11.4. Cortes iniciais dos blocos	60
2.11.5. Montagem dos blocos	61
2.11.6. Preparação da sanduíche	61
2.11.7. Preparação da lâmina final	61
2.11.8. Coloração	62
2.12. Métodos de análise.....	62
2.12.1. Análise histológica qualitativa	62
2.12.2. Análise histológica quantitativa	62
III. Resultados	67
1. Observação geral dos animais	67
2. Análise macroscópica	67
3. Análise histológica – Microscopia de Luz.....	67
3.1. Grupo I - Defeito ósseo sem preenchimento (controlo negativo)	68
a) Duas semanas	68
b) Quatro semanas	69

3.2. Grupo II - Defeitos preenchidos com partículas de mineral anorgânico bovino-derivado (ABM/P-15)	72
a) Duas semanas	72
b) Quatro semanas	72
3.3. Grupo III - Defeitos preenchidos com partículas de mineral anorgânico bovino-derivado numa matriz de hidrogel de carboximetilcelulose /glicerol (ABM/P-15/CMC).....	79
a) Duas semanas.....	79
b) Quatro semanas	79
3.4. Grupo IV - Defeitos preenchidos com partículas de mineral anorgânico bovino-derivado numa matriz de hidrogel de Hialuronato de Sódio (ABM/P-15/Hy)	84
a) Duas semanas.....	84
b) Quatro semanas	84
3.5. Grupo V - Defeitos preenchidos com partículas de mineral anorgânico bovino - derivado numa matriz de hidrogel de Hialuronato de Sódio liofilizado (ABM/P-15/Hy lio)	89
a) Duas semanas.....	89
b) Quatro semanas	89
3.6. Grupo VI- Defeitos preenchidos com partículas de osso alógeno desmineralizado numa matriz de hidrogel de Hialuronato de Sódio (DBM/Hy).....	97
a) Duas semanas.....	97
b) Quatro semanas	98
4. Análise histológica quantitativa (Histomorfometria)	109
4.1 Resultados histomorfométricos	115
IV. Discussão	117
V. Conclusões	133
VI. Resumo.....	136
VII. Summary	141
C. BIBLIOGRAFIA.....	145
Índice geral.....	156