AVALIAÇÃO DA RESPOSTA TECIDUAL A DOIS IMPLANTES DE HIDROXIAPATITA SINTÉTICA DURANTE O REPARO DE DEFEITO ÓSSEO DE TAMANHO CRÍTICO NA CALVÁRIA DE RATOS

Neusa Motta de Freitas Costa

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Aprovada por:

Prof.ª Glória Dulce de Almeida Soares, D. Sc.

Prof. José Mauro Granjeiro, D. Sc.

Prof. Luiz Carlos Pereira, D. Sc.

Prof^a. Carolina Spiegel, D. Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL FEVEREIRO DE 2008

COSTA, NEUSA MOTTA DE FREITAS

Avaliação da resposta tecidual a dois implantes de hidroxiapatita sintética durante o reparo de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de ratos [Rio de Janeiro] 2008

XVIII, 166 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ,

M.Sc., Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2008)

Dissertação - Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE

- 1. Hidroxiapatita
- 2. Teste in vivo
- 3. Histomorfometria
- 4. Reparo ósseo

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

Aos meus amados filhos Priscila e Marcelo, pelo muito que representam, me estimulando a busca constante para fundamentar um exemplo; Ao meu pai Aloysio que tanto vibrou com a minha entrada neste curso e que agora está no Céu iluminando meu caminho e minha mãe Alda que sempre está presente com seu carinho e dedicação. Eles que certamente sonharam com este momento feliz que ora vivo, me deram a vida e ensinaram a vivê-la.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Glória de Almeida Soares, por ter me acolhido através do professor Chevitarese e permitido o meu ingresso no mundo da pesquisa, que tanto tem me realizado. Agradeço por ter me orientado não só neste trabalho, como também em minha vida acadêmica. Seu apoio e incentivo foram fundamentais.

Ao professor Dr. José Mauro Granjeiro, por seu estímulo de buscar sempre o melhor e acreditar que com nosso trabalho e empenho conseguimos alcançar mais alto. Obrigada por sua lição constante, de mostrar que conhecimento deve ser passado integralmente e que isto fortalece e une o grupo no qual estamos inseridos; por suas palavras claras, objetivas e coerentes me ajudando não só em minha formação científica, como também pessoal.

Ao professor Dr. Orlando Chevitarese, quem primeiro me orientou no caminho científico, meus agradecimentos, respeito e admiração. Sua perda é um vazio que fica. Sua cultura, postura honesta e simples foram de grande importância para o meu aprendizado.

Aos meus filhos Priscila e Marcelo, agradeço a Deus todos os dias a felicidade de tê-los. Seus olhos me transmitem paz e segurança, me dão força para ter garra de lutar todos os dias e vencer.

Aos meus pais Aloysio e Alda, agradeço por terem me dado tudo que tenho e sou. Vocês formam meu alicerce e espero continuar a construir tudo que vocês sonharam.

Aos meus familiares, irmãos e irmãs, sobrinhos, tios, primos.. Cada um de vocês contribuiu para a minha vida.

Ao meu grupo de amigos da COPPE. Marisa e Tatiana pelas horas de estudo que passamos juntas, enfrentando todas as dificuldades das disciplinas, tão diferentes do que estávamos acostumadas. Dóris, Euler, Helena, Márcia e todos os outros do Laboratório que participaram desta caminhada.

Ao meu grupo de amigos da UFF. Bruno que participou comigo das longas horas no microscópio, adquirindo as imagens e se prontificando sempre a qualquer outra ajuda para o andamento do trabalho. Rosana que me ajudou muito no Laboratório de Imunohistoquímica, me ensinando a técnica e por sua valiosa amizade. Gustavo que foi tão prestativo a me ajudar, juntamente com Bruno e Rosana, na avaliação das áreas de tecido conjuntivo, osso e biomaterial. Ao Vagner que me ensinou a fazer a Segmentação de Imagem, utilizada neste trabalho. À Cristina Jardelino por ter me orientado em como fazer a contagem da densidade de microvasos. A todos os outros do grupo de estudo que certamente contribuíram para a formação deste trabalho.

À professora Eliene Carvalho da Fonseca, responsável pelo Laboratório de Imunohistoquímica do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Antônio Pedro (UFF, Niterói/RJ), pelo apoio, disponibilização do laboratório e informações que foram utilizadas para a execução da marcação de imunohistoquímica do material. Sua atenção e empenho em ter bons resultados foram fundamentais para a conclusão deste trabalho. Agradeço também a sua equipe de funcionários e alunos que também muito me ajudaram.

À Dra. Andréa Rodrigues Cordovil Pires, pelos esclarecimentos prestados nas identificações celulares e obtenção de melhores resultados nos protocolos de imunohistoquímica, disponibilizando também seu laboratório (Fonte Medicina Diagnóstica) para preparar as lâminas, cujos cortes histológicos foram analisados com os imunomarcadores.

Ao Márcio Baltazar Conz por ter cedido o material utilizado em sua tese de doutorado na COPPE e assim ter permitido a execução do meu trabalho.

Ao Antônio Carlos dos Santos do Departamento de Patologia (Serviço Técnico Histológico) do Hospital Universitário Antônio Pedro (UFF, Niterói/RJ), pelo preparo das lâminas analisadas com HE.

À equipe do Departamento de Ortodontia da Associação Brasileira de Odontologia/RJ, da qual participo. Por todos os momentos que tive que me ausentar para a conclusão deste curso, pois sei que o trabalho aumentou com minha ausência. Aos alunos que são o estímulo de qualquer professor a querer sempre se desenvolver. Em especial às minhas grandes amigas Débora e Maria Helena.. Por todos os momentos vividos nestes longos anos de convivência. Suas palavras de incentivo, força e carinho são muito importantes para a minha vida profissional e familiar. Muito obrigada!!!

Às minhas amigas e funcionárias Rosane e Ana, que dividem comigo todos os meus momentos de felicidade, vitória, angústias e realizações. À Renata que também faz parte desta equipe e é uma grande companheira.

Aos meus amigos, que me estimulam a continuar.

Enfim, a todos que, de um modo ou de outro, por suas atitudes e seus ensinamentos, incentivaram-me a concluir este curso.

A todos, muito obrigado.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M. Sc.)

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA TECIDUAL A DOIS IMPLANTES DE HIDROXIAPATITA SINTÉTICA DURANTE O REPARO DE DEFEITO ÓSSEO DE TAMANHO CRÍTICO NA CALVÁRIA DE RATOS

Neusa Motta de Freitas Costa

Fevereiro/2008

Orientadores: Glória de Almeida Soares José Mauro Granjeiro

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

O objetivo deste trabalho foi realizar a análise histomorfométrica das alterações celulares durante o reparo de defeitos críticos na calvária de ratos Wistar (Rattus norvegicus) tratados com duas hidroxiapatitas (HA) de diferentes características físicoquímicas. Foram observados cortes histológicos de 60 animais divididos em três grupos experimentas: grupo I (coágulo, controle), grupo II (HA-1, HA com 28% de cristalinidade) e grupo III (HA-2, HA com 70% de cristalinidade), os quais foram mortos com 1, 3, 6 e 9 meses após a implantação (n=5/grupo/período). A análise histomorfométrica envolveu a identificação e quantificação de células inflamatórias, especificamente polimorfonucleares, mastócitos, macrófagos (anti-lisozima), células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho, quantificação da densidade de microvasos (anti-Fator VIII) e a intensidade da proliferação celular (anti-PCNA). Foram determinadas, ainda, as áreas de tecido conjuntivo, osso e biomaterial. Os resultados mostram que não houve diferenças significativas quanto a qualidade e quantidade de células do infiltrado inflamatório entre os grupos experimentais. Observou-se um aumento progressivo da área de tecido conjuntivo ao longo dos períodos experimentais. A área máxima de osso (p<0,05) foi atingida no grupo HA1 (6 meses), diminuindo ao final do 9° mês, igualando-se aos outros grupos (p>0,05). Concluiu-se que as HA-1 e HA-2 são biocompatíveis, não absorvíveis e que a cristalinidade não afetou a resposta celular nem proporcionou aumento na área de osso neoformado em relação ao coágulo.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

EVALUATION OF TISSUE RESPONSE TO TWO SINTETIC HYDROXYAPATITE IMPLANTS DURING CRITICAL SIZE BONE DEFECT HEALING ON RAT CALVARIA

Neusa Motta de Freitas Costa

February/2008

Advisors: Glória de Almeida Soares José Mauro Granjeiro

Department: Metallurgical and Materials Engineering

The aim of this work was to realize histomorfometrical analysis of cellular response during the healing of critical size bone defect in calvaria of Wistar (Rattus norvegicus) rats treated with two hydroxyapatites (HA) with different physical and chemical characteristics. It was analyzed histological sections of 60 animals which were divided into three experimental groups: group I (clot, control), group II (HA-1, HA with 28% of crystallinity) e group III (HA-2, HA with 70% of crystallinity) and killed 1, 3, 6 and 9 months after implantation (n=5/group/period). The histomorfometrical analysis involved the identification and quantification of inflammatory cells, especially polimorphonuclears, mast cells, macrophages (anti-lisozima), foreign body multinucleated giant cells, quantification of micro vessel density (anti-factor VIII) and cell proliferation intensity (anti-PCNA). In addition, connective tissue, bone and biomaterial areas were determined. The results show not significant difference whatever the quality and quantity of infiltrated inflammatory cells between the experimental groups. It was observed a progressive increase of connective tissue area during experimental periods. The greater bone area (p<0.05) was obtained on group HA1 (6 months), decreasing at the end of 9^{th} month, similar to others groups (p>0.05). In conclusion, HA-1 and HA-2 were biocompatible and not absorbable; crystallinity has no influence on cell response and has not increased new bone formation in comparison to clot.

SUMÁRIO

LIS	STA DE FIGURAS	ix
LIS	STA DE TABELAS	xiv
GL	LOSSÁRIO	XV
LIS	STA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xviii
1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DA LITERATURA	4
	2.1 – Tecido ósseo - considerações gerais	4
	2.2 – Materiais osteo-substitutos	7
	2.3 – Reparo ósseo e reação tipo corpo estranho	14
	2.4 - Principais funções das células inflamatórias e marcadores b	iológicos no
	presente estudo	19
3.	PROPOSIÇÃO	30
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	31
	4.1 – Materiais	31
	4.2 – Métodos	32
5.	RESULTADOS	46
	5.1 – Análise histológica descritiva	46
	5.2 – Análise histomorfométrica	65
6.	DISCUSSÃO	90
	6.1 – Modelo experimental utilizado	90
	6.2 – Análise histológica da resposta biológica	93
	6.3 – Reparo tecidual	100
7.	CONCLUSÃO	103
8.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	104
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
10.	. APÊNDICE	119
	10.1 – Produção de grânulos de HA, procedimento cirúrgico e pr	ocessamento
	histológico	119
	10.2 – Imunohistoquímica – anticorpos	123
	10.3 – Protocolo utilizado nas reações de imunomarcações	126
	10.4 – Protocolos utilizados nas análises histomorfométricas	135

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido tumoral	20
Figura 2.2 – Esquema identificando as principais etapas para a produção e utilização	de
anticorpos primários para imunohistoquímica2	21
Figura 2.3 – Representação esquemática do eosinófilo	22
Figura 2.4 – Representação esquemática do neutrófilo	23
Figura 2.5 – Representação esquemática do mastócito	24
Figura 2.6 – Representação esquemática da lisozima2	26
Figura 2.7 – Fotomicrografia da célula gigante multinucleada tipo corpo estranho2	27
Figura 2.8 – Mecanismo de interação entre as células sanguíneas a partir de um estímu	ılo
tecidual (Fator VIII)	28
Figura 2.9 – Representação esquemática do anti-PCNA	29
Figura 4.1 – Esquema do modelo experimental utilizado	31
Figura 4.2 – Representação esquemática das imagens capturadas com o microscópio3	32
Figura 4.3 – Fotomicrografia identificando as células polimorfonucleares	33
Figura 4.4 – Fotomicrografias identificando mastócito	34
Figura 4.5 – Fotomicrografia identificando as células gigantes multinucleadas ti	ро
corpo estranho	35
Figura 4.6 – Fotomicrografia identificando as células imunopositivas pa	ıra
macrófagos	37
Figura 4.7 – Fotomicrografia identificando os microvasos	37
Figura 4.8 – Fotomicrografia identificando as células em proliferação	38
Figura 4.9 – Tela do programa Image-Pro Plus® mostrando as contagens das	3
diferentes classes de células inflamatórias da análise histomorfométrica	40
Figura 4.10 – Tela do programa Image-Pro Plus ® mostrando a quantificação das áre	as
de tecido conjuntivo, osso e biomaterial ²	41
Figura 4.11 – Tela do programa Image-Pro Plus ® mostrando a contagem	de
macrófagos imunomarcados com anti-lisozima	42
Figura 4.12 – Tela do programa Image-Pro Plus ® mostrando a contagem de vas	os
sanguíneos imunomarcados com anti-Faor VIII	13
Figura 4.13 – Tela do programa Image-Pro Plus ® mostrando a avaliação da área e	em
mm ² ocupada pelas células em proliferação imunomarcadas com an	ıti-
PCNA4	14
Figura 5.1 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 1 mês	49

Figura 5.2 - Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 1 mês do
grupo controle
Figura 5.3 - Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 1 mês do
grupo HA151
Figura 5.4 - Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 1 mês do
grupo HA252
Figura 5.5 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 3 meses53
Figura 5.6 - Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 3 meses do
grupo controle54
Figura 5.7 - Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 3 meses do
grupo HA155
Figura 5.8 - Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 3 meses do
grupo HA256
Figura 5.9 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 6 meses57
Figura 5.10 - Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 6 meses do
grupo controle
Figura 5.11 - Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 6meses do
grupo HA159
Figura 5.12 Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 6 meses
do grupo HA260
Figura 5.13 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 9 meses.61
Figura 5.14 - Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 9 meses do
grupo controle62
Figura 5.15 - Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 9 meses do
grupo HA163
Figura 5.16 - Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 9 meses do
grupo HA264
Figura 5.17 – Número de PMN/mm ² de tecido conjuntivo
Figura 5.18 – Tendência de diminuição do número de $PMN/por mm^2$ de tecido
conjuntivo do defeito ósseo tratado com coágulo e HA2 e uma tendência de
aumento dos PMN no grupo HA168
Figura 5.19 – Número de mastócitos/mm ² de tecido conjuntivo69
Figura 5.20 - Tendência de diminuição do número de mastócitos/mm ² de tecido
conjuntivo71

Figura 5.22 – Tendência de diminuição da quantidade de macrófagos/mm ² de tecido
conjuntivo74
Figura 5.23 – Número de células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho/mm ² de
tecido conjuntivo75
Figura 5.24 - Tendência de diminuição do número de células gigantes multinucleadas
tipo corpo estranho/mm ² de tecido conjuntivo77
Figura 5.25 – Densidade de microvasos/mm ² de tecido conjuntivo78
Figura 5.26 – Tendência de diminuição da densidade de microvasos/mm² de tecido
conjuntivo do defeito ósseo tratado nos grupos HA1 e HA2 e uma tendência de
aumento no grupo coágulo80
Figura 5.27 – Área de células em proliferação/mm ² de tecido conjuntivo81
Figura 5.28 – Tendência de diminuição da área de células em proliferação/mm 2 de
tecido conjuntivo83
Figura 5.29 – Percentual de área de tecido conjuntivo
Figura 5.30 – Percentual de área de osso
Figura 5.31 – Percentual de área de biomaterial
Figura 6.1 – Corte corado com Hematoxilina Eosina no período de 9 meses com
НА 296
Figura 6.2 – Tela do programa Image-Pro Plus ® mostrando a segmentação da imagem
fotográfica do corte marcado com anti-PCNA98
Figura 6.3 - Tela do programa Image-Pro Plus ® mostrando a segmentação da imagem
fotográfica do corte marcado com anti-PCNA99
Figura 10.1 - Imagens das pastilhas de HA após a prensagem e dos grânulos
produzidos119
Figura 10.2 – Seqüência do procedimento cirúrgico dos animas experimentais121
Figura 10.3 – Peças anatômicas inseridas nos blocos de parafina122
Figura 10.4 – Diagrama esquemático de ligações de anticorpos policionais123
Figura 10.5 - Um específico clone de anticorpo monoclonal reage com um específico
epítopo do antígeno124
Figura 10.6 – Utilização do LSAB onde a enzima streptavidina reage com o anticorpo
secundário biotinilado125
Figura 10.7 – Materiais coletados (setas) inclusos em blocos de parafina126
Figura 10.8 – Lâminas com os cortes histológicos sobrepostos126
Figura 10.9 – Estufa utilizada a 60º C127
Figura 10.10 – Cubas com xilol utilizadas para os banhos127

Figura 10.11 – Bateria de hidratação com as cubas de álcool 99% e álcool 90%	128
Figura 10.12 – Balança digital utilizada para pesar o bórax	128
Figura 10.13 – Frasco com peróxido de hidrogênio diluído	129
Figura 10.14 – Panela de pressão utilizada para fazer a recuperação antigênica	130
Figura 10.15 – Incubação com BSA e leite desnatado	132
Figura 10.16 – Lâminas sobre as quais os cortes foram incubados com os anticorp	os.132
Figura 10.17 – Bateria de contra-coloração de Harris	133
Figura 10.18 – Bateria de desidratação	134
Figura 10.19 – Posicionamento da lamínula	134
Figura 10.20 - Tela do programa Image-Pro Plus ® mostrando a imagem na qu	ial será
realizada a contagem	135
Figura 10.21 – Escolha da calibração	136
Figura 10.22 – Escolha dos nomes das classes a serem contadas	137
Figura 10.23 – Escolha da classe a ser contada	138
Figura 10.24 – Contagem da classe concluída	139
Figura 10.25 – Exportação dos dados para o Excel	140
Figura 10.26 – Salvamento dos pontos	141
Figura 10.27 - Tela do programa Image-Pro Plus ® mostrando a imagem na qu	ial será
realizada a contagem	142
Figura 10.28 – Escolha da calibração	143
Figura 10.29 – Formatação da grade a ser utilizada	144
Figura 10.30 – Formatação da grade a ser utilizada	145
Figura 10.30 – Formatação e salvamento da grade a ser utilizada	146
Figura 10.31 – Aplicando os pontos sobre a imagem	147
Figura 10.32 – Aplicando os pontos sobre a imagem	148
Figura 10.33 – Quantificação das áreas de tecido conjuntivo, osso e biomaterial	149
Figura 10.34 – Formatação da grade a ser utilizada	150
Figura 10.35 – Formatação e salvamento da grade a ser utilizada	151
Figura 10.36 – Aplicando a grade sobre a imagem	153
Figura 10.37 – Aplicando a grade sobre a imagem	154
Figura 10.38 – Contagem da densidade de microvasos	155
Figura 10.39 – Zoom de 400x sobre a imagem sobre a célula que será marcada	156
Figura 10.40 – Área escolhida para servir de padrão para a cor da segmentação	157
Figura 10.41 – Padronizando os níveis RGB	158
Figura 10.42- Criação de arquivo com os dados obtidos dos níveis de RGB	159

Figura 10.43 - Criação de arquivo com os dados obtidos dos níveis de RGB	160
Figura 10.44 – Criação de arquivo com os dados obtidos dos níveis de RGB	161
Figura 10.45 – Aplicação da máscara para contagem	162
Figura 10.46 – Aplicação da máscara para contagem	164
Figura 10.47 – Salvando os dados no Excel	166

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 – Efeito do tempo para PMN	67
Tabela 5.2 – Efeito do tratamento para PMN	67
Tabela 5.3 – Efeito do tempo para mastócito	70
Tabela 5.4 – Efeito do tratamento para mastócito	70
Tabela 5.5 – Efeito do tempo para macrófagos	73
Tabela 5.6 – Efeito do tratamento para macrófagos	73
Tabela 5.7 – Efeito do tempo para células gigantes multinucleadas	tipo corpo
estranho	76
Tabela 5.8 – Efeito do tratamento para células gigantes multinucleadas	tipo corpo
estranho	76
Tabela 5.9 – Efeito do tempo para a densidade de microvasos	79
Tabela 5.10 – Efeito do tratamento para a densidade de microvasos	79
Tabela 5.11 – Efeito do tempo na área de células em proliferação	
Tabela 5.12 – Efeito do tratamento na área de células em proliferação	
Tabela 5.13 – Efeito do tempo no tecido conjuntivo	85
Tabela 5.14 – Efeito do tratamento no tecido conjuntivo	85
Tabela 5.15 – Efeito do tempo no osso	87
Tabela 5.16 – Efeito do tratamento no osso	87
Tabela 5.17 – Efeito do tempo no biomaterial	89
Tabela 5.18 – Efeito do tratamento no biomaterial	89
Tabela 10.1 – Anticorpos primários utilizados	133

GLOSSÁRIO¹

Antígeno:

Qualquer substância que sob condições apropriadas é capaz de estimular a formação de anticorpos.

Avidina:

É uma glicoproteína obtida a partir da clara do ovo ocorrendo também no oviduto de várias espécies aves. É uma molécula quadrivalente onde cada lado da molécula contém um par de receptores para a biotina.

Biotina:

Vitamina (vitamina H) de baixo peso molecular, hidrossolúvel, derivada da dieta e de bactérias intestinais. Pode ser ligada covalentemente a cadeia de aminoácidos ou açúcares de proteínas e glicoproteínas.

Citocina:

Proteína de sinalização extracelular que atua como um mediador local na comunicação célula-célula.

Citoesqueleto:

Sistema de filamentos protéicos no citoplasma de uma célula que confere a forma celular e a capacidade de movimento direcionado.

Citoplasma:

O constituinte mais externo do citoplasma é a membrana plasmática. No citoplasma se localizam o citoesqueleto, as organelas (mitocôndrias, retículo endoplasmático, lisossomos, peroxissomos e complexo de Golgi) e os depósitos ou inclusões.

Dextrano:

Polímero de alto peso molecular. Muito utilizado em contrastes para imaginologia médica, sobretudo com o objetivo de aumentar o tempo de retenção destes compostos.

DNA (ácido desoxirribonucléico):

Serve como armazenador da informação hereditária dentro de uma célula e como o carreador dessa informação de uma geração para a outra.

Epítopo:

É o determinante antigênico, o sítio exato de ligação do anticorpo na molécula do antígeno.

¹ Fonte: (ALBERTS et al 2004, JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004)

Estreptoavidina:

Obtida a partir do *Streptomyces avidinii* não contém carboidrato, possui ponto isoelétrico próximo do neutro, mantém as propriedades de ligação da avidina sem apresentar, entretanto problemas físicos indesejáveis.

Fagocitose:

Propriedade de alguns tipos celulares, como os macrófagos e os leucócitos polimorfonucleares de englobar e eliminar bactérias, fungos, protozoários, células danificadas e moléculas do meio extracelular que se tornaram desnecessárias.

Lisossomo:

Organela delimitada por membrana, presente em células inflamatórias, contendo enzimas digestivas, as quais são tipicamente mais ativas no pH ácido.

Integrina:

Membro de uma grande família de proteínas transmembrana envolvidas na adesão de células à matriz extracelular e na adesão de uma célula à outra.

Interleucinas:

São proteínas (citocinas) que medeiam, principalmente, interações locais entre leucócitos durante a resposta imune e a inflamação. Além disso, elas agem também sobre as células de outros sistemas que possuam receptores apropriados, participando da resposta inflamatória, da cicatrização das feridas e de outros processos biológicos.

Matriz extracelular:

É uma rede de macromoléculas (polissacarídeos e proteínas) secretada por células que desempenha muitas funções, mas a mais importante delas é a de sustentação. Ela auxilia a manter células e tecidos unidos e fornece um ambiente organizado no qual as células migratórias podem mover-se e interagir umas com as outras de forma ordenada.

Megacariócitos:

Os megacariócitos são células da medula óssea responsáveis pela produção de plaquetas sanguíneas. A produção de plaquetas ocorre quando o citoplasma de um megacariócito se fragmenta.

Monócitos:

Tipo de célula branca do sangue que deixa a corrente sanguínea e matura, originando os macrófagos, nos tecidos.

Peroxidase:

É uma enzima que promove a oxidação de certos substratos e a transferência de íons de hidrogênio para peróxido de hidrogênio produzindo ao mesmo tempo moléculas de água.

Pseudópodos:

Prolongamentos emitidos pela célula realizadora da fagocitose que engloba a substância ou microrganismo em um vacúolo intracelular.

Queratinócitos:

Células da epiderme cuja atividade é a síntese de proteínas (queratina) que dão à epiderme a sua resistência.

Quimiocina:

Pequena proteína que atrai células, tais como as células brancas (inflamatórias), movendo-as em direção da fonte quimiotática. É importante no funcionamento do sistema imune.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

DAB	
НА	Hidroxiapatita
НЕ	Hematoxilina-Eosina
MEC	
MMP	Metaloproteinase de matriz
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PMN	Célula polimorfonuclear

1. INTRODUÇÃO

A biocompatibilidade das substâncias sintéticas utilizadas para a substituição dos tecidos biológicos sempre foi uma grande preocupação na clínica médica e odontológica. A reparação da área ferida, na maioria dos casos, pode ocorrer através da substituição da arquitetura do tecido lesado por outra distinta da original., conceituada como cicatrização (WIKESJO et al., 1992) diferentemente da regeneração onde o processo de reparo tecidual culmina com o restabelecimento integral dos aspectos morfológicos e funcionais (CARVALHO et al., 2004).

A previsibilidade dos tratamentos para a regeneração do tecido ósseo perdido depende de vários fatores como a técnica cirúrgica utilizada, assepsia, topografia e extensão do defeito ósseo, vascularização e do material de substituição óssea utilizada (MISCH, 2006).

A utilização de substitutos ósseos na odontologia teve um grande avanço nas últimas décadas com o desenvolvimento dos biomateriais, que se tornaram indispensáveis para os profissionais que atuam nas áreas de cirurgia bucomaxilofacial., periodontia, cirurgia paraendodôntica, cirurgia ortognática e implantodontia. Com o aumento na expectativa de vida da população, há o aumento da necessidade de reposição de partes perdidas do corpo devido às doenças degenerativas ou aos acidentes, visto que este tem maior probabilidade de acontecer durante um maior tempo de vida. A maioria da população também vive em grandes cidades, o que apresenta um índice maior de trauma, decorrente de acidentes ou da violência urbana, com isto também há uma maior necessidade de reabilitação funcional e estética.

A razão biológica que sustenta o uso de implantes ósseos é o potencial que esses materiais possuem de conter células formadoras de osso (osteogênese), ou servir de arcabouço para a formação óssea (osteocondução) ou conter substâncias indutoras ósseas (osteoindução) (LINDHE et al., 2005, OLIVEIRA et al., 1999, SICCA et al., 2000).

Os materiais de implantes ósseos utilizados podem ser classificados quanto à sua origem (LINDHE et al., 2005, MISCH, 2006) em autógeno (do próprio indivíduo, osteoindutor, osteocondutor e osteogênico), alógeno (de indivíduos diferentes, osteocondutor e osteoindutor), xenógeno (de espécie diferente, osteocondutor) (CIANI et al., 2006) e aloplástico (sintético, osteocondutor) (CONZ et al., 2005).

Ao mesmo tempo em que intensa investigação é conduzida no sentido de se entender a base da remodelação óssea, muito se estuda, também, sobre alternativas terapêuticas para perdas ósseas (BRAZ et al., 2003). Objetiva-se o desenvolvimento de biomateriais para implantes ósseos com propriedades semelhantes à do próprio osso, como, por exemplo, a capacidade de remodelar. Já é amplamente difundido e pesquisado o uso clínico de biomateriais osteosubstitutos na odontologia (BLANK e LEVY, 1999, FUJITA et al. 2003, GE et al., 2004, INDOVINA e BLOCK, 2002, MEIJER et al., 2007, OLIVEIRA et al., 1999, ROSA et al. 2003, SCHNETTLER et al., 2003, SICCA et al., 2000, SU-GWAN et al., 2001, ZITZMANN et al., 1997).

O desenvolvimento de novos biomateriais induz à necessidade de um completo entendimento da resposta biológica aos materiais implantados. Uma vez que o biomaterial é introduzido no corpo, uma sequência de eventos ocorre no tecido adjacente podendo terminar com a formação de células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho na interface entre o tecido e o material e desenvolvimento de cápsula fibrosa (ANDERSON, 2000, ANDERSON, 2001, GRETZER et al., 2006, LUTTIKHUIZEN, 2006). As conseqüências da reação à superfície do material podem ser devastadoras. ANDERSON et al (2007) demonstraram que a química da superfície pode causar impacto no comportamento dos macrófagos como a adesão, apoptose, fusão e secreção de citocinas. Aumentar nossos conhecimentos das complexas interações entre célula e material., contribui para o desenvolvimento de novos biomateriais e maior avanço dentro da engenharia tecidual.

Como o campo da engenharia de tecidos e medicina regenerativa se expande, biomateriais poderão ser combinados com células, proteínas e/ou outros componentes biológicos, criando estruturas híbridas, apropriadas para a regeneração funcional dos tecidos doentes ou traumatizados. Um dos poucos problemas para qualquer modelo de biomaterial são as interações entre o hospedeiro e a superfície do material alógeno, células do xenógeno ou possíveis células tronco implantadas. Quanto ao sítio receptor, o biomaterial poderia desencadear a liberação de mediadores inflamatórios sinalizando moléculas como as citocinas, fatores de crescimento e enzimas e proteínas da matriz extra-celular (MEC), visto ser diferente das células nativas do local. Dependendo do tipo celular do implante estes mediadores podem causar várias respostas como ativação, diferenciação, proliferação ou migração celular. Adicionalmente, células próximas ou sobre a superfície do material podem estar sujeitas a um ambiente de baixo pH e enzimas digestivas que são específicas para a reação de corpo estranho. O biomaterial deve prover um ambiente apropriado biomimético para permitir a sobrevivência celular (ANDERSON et al., 2007).

Os implantes ósseos são utilizados para reabilitação funcional e estética dos pacientes, porém existem várias escolhas possíveis para tal (BECKER, 2000, BRAZ et

al., 2003, HENCH, 1998, TROMBELLI et al., 2002). Dentre os aloplásticos destaca-se a hidroxiapatita, que se apresenta com diferentes características (blocos, grânulos, diferentes porosidades e cristalinidades, entre outros). A escolha de substitutos ósseos sintéticos com características físico-químicas controladas no processo de fabricação permite a eliminação de um segundo sítio cirúrgico, diminuindo o tempo de cirurgia e sua morbidade, e maior segurança para o paciente eliminando a possibilidade de transmissão de doenças.

Os biomateriais com estruturas altamente cristalinas são quimicamente mais estáveis e influenciam na adesão celular, "in vitro" (YANG et al., 2005). Recentemente, CONZ (2006) demonstrou não haver diferença significativa no reparo de defeito crítico em calvária de ratos tratados com HA com diferentes propriedades físicoquímica, entre elas a cristalinidade. A despeito deste resultado, demonstrou que a intensidade de neoformação óssea obtida era da mesma ordem de magnitude relatada em outros trabalhos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar quantitativamente a resposta tecidual à hidroxiapatita com diferentes propriedades físico-químicas, utilizadas para o preenchimento de defeito de tamanho crítico na calvária de ratos, com relação ao recrutamento de células inflamatórias, intensidade da angiogênese (observando a densidade de microvasos), proliferação celular, bem como a variação na área do tecido conjuntivo, osso e biomaterial.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Tecido Ósseo - Considerações gerais

O tecido ósseo é uma forma altamente especializada de tecido conjuntivo, onde a matriz extracelular é mineralizada, conferindo-lhe rigidez, mas mantendo algum grau de elasticidade. O osso é a maior reserva primária de cálcio do organismo, sendo o cálcio um íon essencial para a vida, pois participa da manutenção do pH interno do corpo, assim como na transmissão e condução do impulso elétrico em nervos e músculos. Deste modo, o tecido ósseo tem uma grande capacidade de remodelação, renovando-se constantemente para responder às necessidades metabólicas do corpo e a manutenção da estabilidade da calcemia (MARX e GARG, 1998). O osso tem a função de suporte, proteção dos órgãos internos e em conjunto com os músculos promovem a movimentação dos seres (DOROZHKIN, 2007).

Em nível molecular, o osso é constituído, basicamente, de uma matriz orgânica colagênica (colágeno tipo I), contendo proteoglicanas de baixa massa molecular e proteínas não colágenas, que correspondem a 25% de seu peso; uma parte mineral, principalmente hidroxiapatita (HA) correspondente a 65% e água (10%). Sua função geral está relacionada com a constituição do esqueleto, sustentação e fixação dos músculos e depósito para íons cálcio para manutenção da calcemia (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Macroscopicamente há duas formas de osso: cortical (compacto) e esponjoso (medular). No osso compacto, a matriz de colágeno está organizada em forma de lamelas concêntricas, geralmente ao redor de um canal vascular central., constituindo o sistema de Harvers. Os canais centrais contendo nervos e vasos sanguíneos se comunicam entre si e com a cavidade medular óssea através dos canais de Volkmann. Já o osso esponjoso apresenta uma matriz mais porosa, organizada em trabéculas. As diferenças entre osso cortical e esponjoso não são apenas estruturais, mas também funcionais. Assim, o osso cortical dá resistência e proteção, enquanto que o esponjoso atua nas funções metabólicas. O osso cortical ou compacto é encontrado nas diáfises de ossos longos e na superfície externa de ossos chatos. O osso esponjoso ou medular delimita espaços intertrabeculares que são preenchidos por medula óssea vermelha, onde há a produção ativa de células sanguíneas a partir de células mesenquimais, ou, com o envelhecimento, por medula óssea amarela, um sítio de reserva de gordura (MARX e GARG, 1998).

Protegendo externamente o osso existe uma fina camada de tecido conjuntivo com grande potencial osteogênico, denominado periósteo, e um tecido equivalente, o endósteo, que recobre as superfícies internas dos ossos.

Histologicamente existem quatro tipos de tecido ósseo: o trabeculado ou entrelaçado, o composto, o lamelar e o fasciculado. O osso trabeculado desempenha importante papel durante o reparo ósseo, sendo o primeiro tecido ósseo a ser formado. Caracteriza-se por uma velocidade de formação muito rápida (30-50µm ao dia ou mais), por ter uma matriz de colágeno desorganizada sem a estrutura lamelar dos sistemas harvesianos e por ser frágil, exibindo pouca resistência biomecânica. É o tecido ósseo predominante durante o desenvolvimento pré-natal., por isso é referido como "osso embrionário", um termo incorreto, visto que todos os adultos têm habilidade de formar este tipo de osso. Também é o tecido que caracteriza a primeira fase da regeneração óssea, e apesar de formar-se muito rapidamente, é absorvido e substituído pelo osso lamelar. Este, por sua vez, é o tecido ósseo maduro, com alta resistência mecânica. Caracteriza-se por formar-se bem devagar, a uma velocidade de 0,6µm por dia e por ter uma estrutura altamente organizada de fibras colágenas e cristais de minerais. O termo "tecido ósseo composto" é usado para descrever o estágio de transição entre o osso trabeculado ao osso lamelar, durante a fase de remodelação. E, finalmente, o tecido ósseo fasciculado é o osso encontrado na zona de inserção de ligamentos das articulações. Este tipo de osso é de importância particular na odontologia porque está presente adjacente ao ligamento periodontal (MELCHER, 1970; ROBERTS et al., 1987).

Quanto às células presentes no tecido ósseo, temos:

Osteoblastos: células cubóides organizadas em uma camada contínua sobre o osteóide, ou seja, camada não mineralizada de matriz, que recobre a superfície óssea mineralizada. Estas células são responsáveis pela osteogênese, isto é, pela síntese e secreção da matriz orgânica, sua maturação e mineralização. O osteoblasto além de sintetizar e secretar o colágeno tipo I, que corresponde a 90% da matriz orgânica, também produz as outras proteínas não colagênicas encontradas na matriz, como: sialoproteína óssea, osteopontina, osteonectina, osteocalcina, proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), proteoglicanas e outras (MISCH, 2006). É uma célula muito rica em fosfatase alcalina, enzima essencial para o processo de mineralização da matriz (MARX e GARG, 1998). Vários fatores sistêmicos e locais regulam o seu número, a sua diferenciação e a sua atividade, incluindo fatores autócrinos. Assim, estas células possuem receptores

para hormônios sistêmicos (paratormônio, estrógenos, glicocorticóides, insulina, hormônios tireoideanos), vitamina D3 e fatores locais como prostanóides (PGE, PGF_{2α}), citocinas (TGF- β s, BMPs, FGFs, IGF-1, PDGF) e interleucinas (RAISZ e RODAN, 1998). Os osteoblastos se diferenciam a partir de células mesenquimais indiferenciadas, e a sua diferenciação em osteoblastos depende de estímulos externos, fatores de crescimento, hormônios e interações celulares.

- Osteócitos: são osteoblastos incorporados à matriz óssea mineralizada, durante a osteogênese. Apresentam longas projeções citoplasmáticas que delimitam canalículos intercomunicantes constituindo uma rede de comunicação entre as células e a superfície óssea.
- 3. Osteoclastos: são células grandes multinucleadas, formadas pela fusão de células mononucleares. Quando ativo é polarizado, com parte da membrana envolvida na absorção fortemente aderida à superfície óssea e que delimita a zona absorvente da célula, denominada "borda em escova" ou "borda franjada". Com o início da absorção aparece uma depressão na superfície óssea junto à borda em escova que é conhecida como lacuna de Howship (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004, MARX e GARG, 1998).

A interação da atividade de osteoblasto-osteoclasto é responsável pela remodelação óssea, ou seja, a absorção e a neoformação óssea contínua que ocorre em todos os ossos (RODAN e MARTIN, 1981). Deste modo, os osteoblastos produzem fatores que vão influenciar a diferenciação e função dos osteoclastos, alguns destes são depositados e armazenados na matriz e outros secretados localmente em resposta a hormônios ou fatores locais. Segundo RODAN e MARTIN (1981), os receptores para a maioria dos fatores osteolíticos são encontrados nos osteoblastos e não nos osteoclastos. Em cultura, os osteoclastos absorvem osso em resposta a fatores liberados por osteoblastos estimulados (MCSHEEHY e CHAMBERS, 1986), e componentes da matriz óssea é que atraem e ativam os osteoclastos (THESINGH e BURGER 1983). Por outro lado, a absorção óssea libera fatores que recrutam e ativam os osteoblastos (AMADEI et al.,2006).

Um destes fatores que controlam o comportamento osteoclástico, é a osteoprotegerina (OPG), descoberta em 1997 por SIMONET et al. Os autores observaram que a sua superexpressão em camundongos transgênicos resultava em osteopetrose devido ao bloqueio da diferenciação de osteoclastos. A identificação e o estudo funcional da OPG mostraram que, além de esteróides e outros hormônios, novas moléculas secretadas podem atuar sistemicamente no controle da diferenciação de

osteoclastos. Obviamente a identificação de um receptor solúvel que controla a osteoclastogênese sugeriu que deveria existir um fator associado a este receptor, o qual foi chamado de RANKL, ou fator de diferenciação de osteoclastos (ODF). RANKL está presente na membrana de precursores de osteoclastos, bem como solúvel no microambiente ósseo. A deficiência em RANKL leva a osteopetrose (KARSENTY, 1999).

2. 2. Materiais osteo-substitutos

O organismo está sujeito a inúmeras adversidades que podem levar à perda de um órgão (perda dental., por exemplo), de massa corpórea (perdas ósseas), ou podem levar à substituição de um tecido por outro, podendo ser este novo tecido indesejado ou ineficiente. Isto é especialmente verdadeiro no que se refere ao tecido ósseo. Como observado anteriormente, este é um tecido altamente dinâmico e versátil, com funções diversas, como proteção de órgãos, reservatório de cálcio, sustentação do corpo. Em determinadas situações, como em casos de acidentes ou doenças osteodestrutivas, nem sempre toda a dinâmica orgânica pode ser capaz de regenerar o tecido perdido e, assim, devolver forma e função adequadas. Outros distúrbios podem interferir no crescimento craniofacial., como no caso da crânio-sinostose (MARDAS et al., 2002), e novamente o organismo não consegue oferecer reparo adequado, o que prejudica o crescimento do indivíduo. De acordo com SERVICE (2000), todo ano são realizados ao redor de 450,000 enxertos ósseos nos Estados Unidos principalmente em fraturas com perda tecidual.

No caso da odontologia, inúmeras são as situações onde as perdas ósseas prejudicam a função dental., como nas periodontites, ou até mesmo impedem a reabilitação bucal., como é o caso de pacientes desdentados que necessitam de reabilitação com implantes osteointegrados, mas não possuem quantidade ou qualidade óssea adequadas. BOYNE, em 1971, foi o primeiro autor a estudar a aplicação dos enxertos ósseos por razões protéticas. Com o tempo, o mesmo tipo de enxerto passou a ser utilizado de forma regular para que fosse possibilitada a instalação de implantes osteointegrados.

É importante que se faça uma distinção entre enxertos e implantes. O enxerto ou transplante é um tecido ou órgão vivo, pois contém células do doador e, portanto, espera-se que sobreviva na região receptora. Já o implante, ao contrário, é um material sem células viáveis (BAUER e MUSCHLER, 2000).

Os biomateriais utilizados para restabelecer ou aumentar os tecidos biológicos devem apresentar propriedades físicas, químicas, biomecânicas e biológicas apropriadas para serem utilizados em pacientes, caracterizados em testes in vitro e in vivo. Devem prover sítios de ancoragem celular, ter estabilidade mecânica, proporcionar a interface para responder a mudanças fisiológicas e biológicas e remodelar a matriz extracelular, a fim de integrar-se com o tecido nativo adjacente (GE et al., 2004). Deseja-se que o material ideal estimule a função das células osteoprogenitoras e a expressão do fenótipo osteoblástico (DUCHEYNE e QIU, 1999). Estes materiais ganharam aceitação e são utilizados para aplicações médico-odontológicas em regeneração, aumento ou substituição de tecido ósseo. As aplicações odontológicas dos materiais utilizados para substituição óssea incluem preenchimento de defeitos periodontais, aumento de rebordo implantes imediatos após exodontia, reconstrução alveolar. maxilofacial. preenchimento de alvéolos após exodontia e fenestração ou deiscência associados à instalação de implantes orais (INDOVINA e BLOCK, 2002, TAGA et al., 2000).

De acordo com o Instituto Nacional de Saúde Americano (The National Institute of Health Consensus Development Conference on Dental Implants) em 1988, os materiais para implante ósseo podem ser classificados de acordo com sua origem em três grandes famílias: autógeno, alógeno e aloplástico. Atualmente outra categoria deve ser salientada, a do implante xenogênico, e que vem sendo empregado de forma crescente (BUNYARATAVEJ e WANG, 2001, CIANI et al., 2006, HERCULANI et al., 2000; OLIVEIRA et al., 1999, SICCA et al., 2000, ZAMBUZZI et al., 2006).

O osso autógeno é obtido de áreas doadoras do próprio individuo. O implante alógeno é obtido de indivíduos de espécie semelhante ao receptor; e os implantes aloplásticos podem ser de natureza metálica, cerâmica ou polimérica. Os implantes xenogênicos são obtidos de indivíduos de espécies diferentes do receptor, sendo mais comumente obtidos de bovinos (CARVALHO et al., 2004).

O material autógeno tem sido preferido pelos profissionais devido as suas excelentes propriedades osteogênica, osteocondutora e osteoindutora, porém há limitações quanto ao seu uso no que diz respeito à morbidade do sítio doador, quantidade e qualidade do osso doador, problemas de absorção durante a regeneração, problemas estruturais e anatômicos e prolongação do tempo cirúrgico (CARVAHO et al., 2004, DUCHEYNE e QIU, 1999, SILVA et al., 2005, SU-GWAN et al., 2001),. É conhecido que o remodelamento do enxerto autógeno gera resultados imprevisíveis geralmente associados a uma absorção periférica intensa (ARAÚJO et al. 2002). Essa absorção pode ser explicada pela falta de células osteoprogenitoras viáveis após o

transplante, por uma menor quantidade de osso cortical., visto que este osso tem uma concentração mais alta de proteínas de osso morfogenético (MISCH, 2006) e pela revascularização limitada do enxerto, provenientes do osso receptor (MURAMATSU e BISHOP, 2002).

Em vista do que foi citado, é natural a busca de substitutos ósseos e de produtos que estimulem a formação óssea e que possam ser utilizados em situações onde o restabelecimento do volume e qualidade óssea seja desejável. Tal biomaterial deve ser utilizado em íntimo contato com os tecidos do indivíduo e, para tanto, possuir características como: biocompatibilidade, previsibilidade, aplicação clínica, ausência de riscos trans-operatórios e seqüelas pós-operatórias mínimas, além de aceitação pelo paciente (SERVICE, 2000). Apesar de haver uma grande variedade de implantes ósseos, associada a um avanço crescente no seu desenvolvimento e aperfeiçoamento, ainda não existe um biomaterial que preencha todos esses requisitos.

AABOE et al., em 1995, realizaram uma revisão de literatura sobre defeitos ósseos criados experimentalmente e sobre materiais osteopreenchedores. Relataram que um material ideal para implante ósseo, de origem não autógena, deve ser esterilizável, não tóxico, não induzir resposta imunológica e que possa estar disponível em quantidades suficientes. Este deve ainda ser capaz de induzir a diferenciação de células em osteoblastos, sendo ao mesmo tempo gradualmente absorvível, fornecendo um suporte condutivo para formação de um novo osso. Adicionalmente, o material deve funcionar como uma barreira mecânica para o crescimento de tecido fibroso ou invaginação de tecido muscular para dentro do defeito.

Os materiais alógeno e xenógeno apresentam como desvantagens a possibilidade de contaminação com vírus ou bactérias, indução de resposta imune, variabilidade considerável na composição e propriedades biológicas dentro de uma população difíceis de controlar (DUCHEYNE e QIU, 1999), porém WENZ et al. (2001) afirmam que o material de origem xenogênica é obtido de uma fonte abundante, de custo acessível, sendo também seguro quanto ao risco de transmissão de doenças, e o processo de tratamento a qual é submetido elimina qualquer risco de resposta imunogênica. Contudo, o processamento do material é um requisito fundamental e nem sempre a qualidade obtida nos materiais é reprodutível (CONZ et al., 2005).

ZAMBUZZI et al (2006) avaliaram a resposta tecidual ao material de osso inorgânico medular bovino macrogranular implantado em subcutâneo de ratos. A análise histológica mostrou aos 10 dias pós-cirúrgicos que o infiltrado inflamatório era do tipo granulomatoso, rico em células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho. Com o avançar do tempo experimental houve significante diminuição do infiltrado inflamatório inicial concomitantemente ao aumento do grau de fibrosamento ao redor das partículas implantadas. O material não desencadeou nenhuma resposta imune, sendo portanto biocompatível.

Os biomateriais podem, ainda, ser classificados de acordo com algumas de suas propriedades, e divididos em: osteogênicos, osteoindutores e osteocondutores. Osteogênicos são os materiais orgânicos capazes de estimular diretamente os osteoblastos a formar osso; osteoindutores, por sua vez, são materiais capazes de induzir a transformação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, aumentando o crescimento ósseo ou, até mesmo, formando osso ectópico, e os osteocondutores (geralmente inorgânicos, materiais desproteinizados) favorecem a migração, proliferação e maturação das células progenitoras, além de conduzirem a aposição do novo osso em sua superfície a partir de tecido ósseo preexistente nas bordas da lesão (URIST, 1965). Mudanças tecnológicas na produção dos biomateriais e na obtenção dos substitutos ósseos são responsáveis por conferir a estes materiais características de osteoindução, osteocondução ou osteogênese, e estes fatores são o grande foco atual da bioengenharia.

Há, ainda, outra classificação que pode ser utilizada em função das características físico-químicas resultantes do processamento dos biomateriais, ou seja, dividem-se em orgânicos e inorgânicos. O osso, geralmente bovino, é desmineralizado em condições controladas de pH e temperatura removendo os componentes inorgânicos e celulares, restando predominantemente colágeno tipo I e, em algumas vezes, resíduos de fatores de crescimento. O material inorgânico é obtido através da desproteinização do osso através de processos termo-químicos que removem sua porção orgânica, restando fundamentalmente hidroxiapatita (HA). Ambos biomateriais podem apresentar-se em blocos ou particulados em diferentes tamanhos de grânulos, macro ou micro partículas (CARVALHO et al., 2004).

Dentre os vários biomateriais desenvolvidos, esforços intensos têm sido feitos nas últimas três décadas para o desenvolvimento de derivados inorgânicos, os quais receberam grande atenção como materiais de preenchimento, espaçadores e substitutos para enxertos ósseos, principalmente devido à sua biocompatibilidade, bioatividade e características de osteocondução em relação ao tecido hospedeiro (BONACHELLA et al., 1992, BURSTEIN et al., 1997, DE GROOT, 1980; DOROZHKIN, 2007, GRANJEIRO et al., 1992). Além de fornecer uma estrutura de suporte e osteocondução,

proverão também um alto conteúdo de cálcio e fósforo, essenciais para a neoformação do tecido ósseo (SCIADINI et al., 1997).

É importante salientar que a estrutura da hidroxiapatita é similar entre as espécies (LE GEROS, 1991). Inúmeros trabalhos na literatura demonstraram a biocompatibilidade da matriz inorgânica bovina como material para enxerto ósseo (MASTERS, 1988; OLIVEIRA et al., 1999).

Um dos materiais provenientes de osso bovino inorgânico, e com larga utilização no mercado, é o Bio-Oss[®] (Osteohealth Co.). Este material é uma matriz óssea mineral obtida após a remoção de componentes orgânicos do osso bovino medular. Devido à sua estrutura, é física e quimicamente comparável à matriz mineral do osso humano.

Em 1993, HISLOP et al. utilizaram o (Bio-Oss) para reconstrução óssea em humanos, e observaram que os melhores resultados foram observados em pacientes submetidos à cirurgia ortognática, e os piores em pacientes que necessitavam de aumento de rebordo alveolar. Pacientes com defeitos hipoplásicos (sindrômicos), e pacientes que necessitavam de correção após trauma, obtiveram resultados medianos. De acordo com os autores, as propriedades do material poderiam ser melhoradas acrescentando-se alguns fragmentos de osso autógeno.

Entretanto, diversos outros trabalhos demonstraram as várias possíveis utilizações para o osso inorgânico bovino (Bio-Oss), e que tais procedimentos podem ser bem sucedidos quando bem indicados. YOUNG et al., em 1999, avaliaram o uso de osso inorgânico bovino (Bio-Oss) em defeitos na maxila e mandíbula de coelhos, e compararam com defeitos preenchidos com osso autógeno, osso autógeno + Bio-Oss e defeitos não tratados. Após 12 semanas, os autores puderam observar que no grupo não tratado o defeito estava preenchido com tecido fibroso com formação óssea somente nas bordas do defeito; no grupo tratado com osso autógeno houve formação de novo osso ao redor das partículas, embora em algumas regiões tenha-se observado células mutltinucleares compatíveis com osteoclastos absorvendo as partículas. Não houve sinal de absorção do material., embora a superfície da partícula fosse irregular, levando os autores a questionar se o Bio-Oss poderia ser classificado como um material absorvível, visto que suas partículas não apresentavam sinais de absorção.

A observação de que o Bio-Oss pode não ser absorvível vai ao encontro das observações de ARTZI, que em 2000 avaliou alvéolos que foram preenchidos com Bio-Oss. A altura da crista óssea foi medida logo após a extração e após 9 meses, quando o

campo foi novamente aberto e um cilindro ósseo da área enxertada foi coletado. Observou-se que houve completo preenchimento do alvéolo com osso neoformado em 82,3% dos casos, e verificou-se ainda a presença das partículas do material em todos os espécimes, presença de osso imaturo na porção coronal e osso lamelar na porção mais apical. O autor concluiu que o mineral ósseo bovino é um material biocompatível e apropriado para evitar a perda óssea que ocorre após a extração, no entanto, mesmo após nove meses, as partículas ainda estavam presentes, não sendo totalmente absorvidas.

Outros trabalhos demonstraram sucesso na utilização do Bio-Oss em diferentes situações, como AABOE et al., em 2000, na osteointegração de implantes subperiostais na tíbia de coelhos, e observaram que o Bio-Oss é biocompatível e osteocondutor.

O mineral ósseo bovino (Bio-Oss), relatado até o momento, é um produto importado, com custo elevado. Além disto, recentemente a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) proibiu a sua comercialização. Após esforços para a obtenção de um produto similar nacional., chegou-se ao que hoje é comercializado sob a marca Gen-Ox® (Baumer S.A., São Paulo, Brasil), com menor custo e propriedades físicoquímicas e biológicas semelhantes aos similares importados. Uma diferença em relação ao Bio-Oss ® é que o Gen-Ox ® apresenta-se nas formas inorgânica e orgânica (oriundas da cortical ou medular), em blocos ou grânulos. Este material vem sendo, de forma crescente, alvo de pesquisas, com o intuito de observar sua biocompatibilidade, suas características físico-químicas, e seu potencial osteocondutor e osteoindutor.

OLIVEIRA et al., em 1999, implantaram no subcutâneo de ratos, matriz óssea desproteinizada (Gen-Ox® inorgânico), nas temperaturas de 100°C e 1000°C, e observaram que os materiais de origem bovina podem ser adequadamente utilizados como material de preenchimento. Entretanto, os autores relataram a formação de granuloma do tipo corpo estanho ao redor do material implantado.

Em 2000, HERCULANI et al. avaliaram o reparo ósseo com a utilização de membrana de cortical óssea bovina (Gen-Derm®, Baumer S. A.) associada ou não a implante ósseo bovino desmineralizado (Gen-Ox® orgânico), em defeitos cirúrgicos de 12 mm de diâmetro na calvária de cobaias, e observaram os melhores resultados em longo prazo no grupo com osso liofilizado. Apesar de a formação óssea, a partir da borda, ter sido menor, ao final de 6 meses 62% do espaço do defeito estava preenchido por tecido ósseo, cuja formação iniciava-se em ilhotas no interior da cavidade.

MARINS et. al (2004) avaliaram a promoção do reparo de lesões ósseas de tamanho crítico em calvária de ratos com a implantação do Gen-Ox® orgânico em

bloco. Observaram que na maioria dos casos tratados, o material foi absorvido lentamente e serviu como material de preenchimento e mantenedor de espaço, favorecendo a angiogênese, migração e adesão celular e a neoformação óssea a partir das bordas da lesão.

Materiais aloplásticos podem ser produzidos com grande controle de sua composição e propriedades, e assim, otimizados para aplicações específicas. As cerâmicas bioativas recebem uma atenção considerável quanto a sua utilização como materiais de implantes ósseos sintéticos, incluindo HA, fosfato tricálcico (TCP) e biovidros cerâmicos (BG) (DUCHEYNE e QIU, 1999, MISCH, 2006). Algumas propriedades dos materiais de implantes ósseos sintéticos como serem absorvíveis ou não, densos ou porosos, cristalinos ou amorfos, parecem afetar diretamente o resultado clínico da sua aplicação (CONZ et al., 2005, MISCH, 2006).

Hidroxiapatitas altamente cristalinas são mais resistentes às alterações e absorções a longo prazo, enquanto que aquelas com menor cristalinidade são mais suscetíveis à decomposição (AOKI, 1994).

O tamanho de partículas dos diferentes tipos de material para implante é fator importante para o sucesso do reparo ósseo (SICCA et al., 2000). Sugere-se que as diminuições do tamanho da partícula para a escala nanométrica e da cristalinidade de materiais de fosfato de cálcio podem favorecer a promoção de adesão de osteoblastos (BALASUNDARAM et al., 2006).

Outra característica importante da hidroxiapatita é a porosidade, cuja presença acarreta aumento de sua área superficial proporcionando maior contato do material com os tecidos e células (AOKI, 1994). A rede de poros interconectados promove vantagens para a circulação dos fluidos tecidual e sanguíneo, com o suprimento de nutrientes e íons minerais para o necessário processo funcional e biológico. Poros com pequenos tamanhos e quantidade diminuída dificultam a circulação dos fluidos através dos grânulos, podendo restringir o crescimento tecidual e formação óssea, reduzindo a bioperformance dos grânulos (LIU, 1996).

Observa-se também que quanto maior for o tamanho da partícula, por mais tempo o material poderá permanecer no local sem ser absorvido (MISCH, 2006). O material particulado permite mais formação óssea numa região pós-extração do que um material sólido (INDOVINA e BLOCK, 2002).

2.3. Reparo ósseo e reação tipo corpo estranho

2.3.1 - Resposta inflamatória após a implantação do biomaterial

Reações do hospedeiro decorrentes da implantação do biomaterial incluem: trauma, interações entre o material e o sangue, formação da matriz provisória, inflamação aguda, inflamação crônica, desenvolvimento de tecido de granulação, reação de corpo estranho e desenvolvimento de cápsula fibrosa (ANDERSON, 2000, ANDERSON, 2001, GRETZER et al., 2006, KESELOWSKY et al., 2007, LUTTIKHUIZEN et al., 2006). No início do processo após a implantação, interações entre o material e o sangue ocorrem com a adesão de proteínas à superfície do biomaterial e o desenvolvimento de uma matriz provisória proveniente do sangue, que é formada em torno do biomaterial. A matriz provisória é o coágulo de sangue inicial na interface entre o material e o tecido. Obviamente, adsorção de proteína e formação de matriz provisória, predominantemente de fibrina, estão intimamente ligados ao mecanismo de resposta inflamatória. O trauma para o tecido conjuntivo vascularizado não só inicia a reposta infamatória (imunidade natural), como também leva à formação de trombos envolvendo a ativação dos sistemas de: coagulação extrínseco e intrínseco, complemento, fibrinolítico e plaquetas. De uma perspectiva de reparo tecidual, a deposição de proteína do sangue na superfície do biomaterial é descrita como a formação da matriz provisória. A matriz provisória fornece componentes estruturais bioquímicos e celulares para o processo de reparo e reação de corpo estranho. Ela pode ser vista como um sistema aonde agentes bioativos são liberados para controlar fases subseqüentes do reparo.

Após as interações iniciais do sangue e do material e a formação da matriz provisória, ocorrem as inflamações aguda e crônica. A intensidade desta resposta é controlada pela extensão do trauma no procedimento de implantação, o tecido ou órgão que recebe a implantação e a extensão da formação da matriz provisória. Células polimorfonucleares são características da inflamação aguda. Degranulação dos mastócitos com liberação de histamina e adsorção do fibrinogênio são conhecidos como mediadores da resposta inflamatória aguda aos biomateriais implantados (TANG et al., 1998, ZDOLSEK et al., 2007). Interleucinas também são liberadas de mastócitos no processo de degranulação e podem contribuir significantemente na determinação da extensão e no grau do desenvolvimento subseqüente da reação de corpo estranho. A resposta inflamatória decorrente do biomaterial pode ser modulada por recrutamento fagocitário decorrente da histamina e adesão fagocitária na superfície do implante facilitada pela adsorção do fibrinogênio do hospedeiro. A resposta inflamatória aguda decorrente dos biomateriais, normalmente termina em menos de uma semana, dependendo da extensão do trauma no local receptor do implante.

Após ocorrer a inflamação aguda, a inflamação crônica é identificada pela presença de células mononucleares (monócitos e linfócitos) no local do implante. A inflamação crônica é menos uniforme histologicamente do que a aguda. A resposta inflamatória crônica aos biomateriais é normalmente de curta duração e está confinada ao local do implante. Inflamação crônica também é usada para descrever a reação de corpo estranho onde monócitos, macrófagos e células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho estão presentes na interface do biomaterial. Com biomateriais biocompatíveis, o término precoce da resposta da inflamação aguda e crônica ocorre com a resposta da inflamação crônica composta de células mononucleares por até duas semanas. Após o término da resposta inflamatória aguda e crônica há a identificação de tecido de granulação pela presença de macrófagos, a infiltração de fibroblastos e a neovascularização no tecido de reparação. Tecido de granulação é precursor da formação da cápsula fibrosa e é separado do implante ou biomaterial por componentes celulares da reação de corpo estranho (camada de uma ou duas células de monócitos, macrófagos e células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho).

2.3.2 - Monócitos, macrófagos e células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho

2.3.2.1 – Adsorção de proteínas

Biomateriais imediatamente e espontaneamente adquirem uma camada de proteínas antes de interagirem com as células do hospedeiro. Logo, é extremamente provável que os tipos, níveis e conformações das superfícies das proteínas adsorvidas sejam determinantes críticos na reação tecidual para os implantes (WILSON et al., 2005). Contrariamente, os tipos, concentrações e conformações das proteínas adsorvidas na superfície são dependentes das propriedades da superfície do biomaterial que dita a adesão e sobrevivência das células, especialmente monócitos, macrófagos e células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho. A interação de proteínas adsorvidas com receptores presente nas populações de células inflamatórias constitui o maior sistema de reconhecimento celular para materiais sintéticos implantados. A presença de proteínas adsorvidas (albumina, fibrinogênio, complemento, fibronectina, entre outras) modula as interações e adesões das células inflamatórias do hospedeiro e está ligada a subseqüente resposta inflamatória e reparadora (BRODBECK et al., 2003, HU et al., 2001, JENNEY e ANDERSON, 2000, JENNEY e ANDERSON, 2000).

O sistema complemento tem sido reconhecido como o maior sistema de defesa do hospedeiro para a interação e remoção de substâncias estranhas *in vivo* (GORBET e SEFTON, 2004, NILSSON et al., 2007).

2.3.2.2 – Adesão de macrófagos

O progresso de eventos na inflamação e na resposta de corpo estranho requer o extravasamento e migração de monócitos/macrófagos para o local do implante. O movimento orientado dos monócitos/macrófagos ocorre em resposta de citocinas e outros quimioatrativos. Quimiocinas são citocinas que tem propriedades quimioatrativas. Elas não estão envolvidas apenas em guiar a migração celular na inflamação e no reparo, mas também influencia na hematopoese, angiogênese, metástase tumoral e diferenciação linfocitária (CAMPBELL et al., 2003, ESCHE et al., 2005, GERARD e ROLLINS, 2001).

Degranulação de mastócitos e liberação de histamina também exercem um importante papel no recrutamento de células fagocitárias, incluindo macrófagos, para o local da implantação do biomaterial (TANG et al., 1998). A reunião de macrófagos no local do implante leva a uma futura propagação de sinais quimioatrativos, que chamam mais macrófagos para a área da ferida. Uma vez que estejam no local do implante ou na superfície do biomaterial., os macrófagos podem então aderir e se engajar nos eventos subseqüentes de reação de corpo estranho.

A proteína modificada sanguínea adsorvida na superfície do material é o substrato com o qual o recrutamento de monócitos/macrófagos se encontra e interage. Esta interação se dá através de receptores de superfície (integrinas) (DELON e BROWN, 2007, GIANCOTTI e RUOSLAHTI, 1999). Esta adesão molecular permite a migração celular através da matriz extracelular e medeia a transdução de sinal entre a célula e seu meio ambiente e então a célula pode responder ao meio ambiente (DELON e BROWN, 2007). Em seus recentes estudos, ANDERSON et al. (2007) relataram que alguns tipos de integrinas tem sido determinantes no papel da adesão e a indução de fusão de macrófagos para formar células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho.

A ligação do macrófago pelas integrinas promove alterações no seu comportamento, tendo como consequência o remodelamento do seu citoesqueleto para promover o envolvimento da superfície do material. As integrinas são importantes também no seu ciclo de vida, ao regular a morte celular, que é necessária para o

desligamento da célula do seu receptor e o remodelamento tecidual (DAMSKY e ILIC, 2002).

2.3.2.3 – Fusão de macrófagos: formação de células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho

Macrófagos aderidos na superfície do biomaterial se fundem para formar células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho e para que isto ocorra é necessária a presença de moléculas de ligação na superfície (HELMING e GORDON, 2007). Logo, os eventos que levam a formação de células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho são dependentes de dois principais fatores: a presença de um estímulo de indução de fusão apropriado e uma superfície do material com adequadas proteínas de adesão.

Como os macrófagos, as células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho apresentam a habilidade de adesão célula/célula, assim como interações célula/matriz.

Macrófagos são capazes de fagocitar partículas muito pequenas ($<5\mu$ m) enquanto que partículas maiores ($>10\mu$ m) induzem a formação de células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho.

2.3.2.4 – Consequências da formação de células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho

Sabe-se que os lisossomos dos macrófagos podem ter uma acidez em torno do pH4 (HAAS, 2007). Superfícies do biomaterial expostas neste ambiente são suscetíveis a altas concentrações destes agentes degradantes. Logo, a química da superfície do biomaterial vai ditar a sua susceptibilidade à biodegradação.

A adesão de macrófagos e células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho, assim como as outras células inflamatórias, tem apresentado uma reduzida capacidade bactericida após a adesão à superfície do biomaterial. Em parte, isto é relacionado ao colapso respiratório que ocorre durante a adesão e deixa a célula depletada e incapacitada de produzir moléculas bactericidas. Além disto, a química da superfície do biomaterial pode facilitar a apoptose (morte celular programada) que, deixa os macrófagos incapazes de atacar microrganismos estranhos que podem estar aderidos ao biomaterial (BRODBECK et al., 2001).

2.3.3 – Relação entre macrófagos, células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho e células do reparo

2.3.3.1 – Secreção de citocinas pelos macrófagos e células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho

Os macrófagos secretam uma série de mediadores inflamatórios após a sua ativação. O macrófago em repouso se torna ativo em resposta a produtos microbianos, complexos imunes, mediadores químicos, certas proteínas da matriz extracelular e citocinas derivadas de linfócitos T. Sua ativação também pode ser modulada pelas propriedades da superfície do biomaterial., como a química e topografia. Após ativos, são capazes de secretar uma grande gama de citocinas (FUJIWARA et al., 2005).

Macrófagos na superfície do biomaterial que não promovem fusão, secretam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Macrófagos e células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho que são aderentes passaram por uma mudança de fenótipo com o passar do tempo, de um estado de ativação clássica para uma mais alternativa (JONES et al., 2007).

Macrófagos ativados têm vários fenótipos heterogêneos. A ativação clássica dos macrófagos ocorre após a exposição de produtos microbianos (MOSSER, 2003). Macrófagos ativados classicamente, tem a função principal de matar patógenos intracelulares, regular citocinas pró-inflamatórias, inibir citocinas anti-inflamatórias e produzir óxido nítrico. Macrófagos ativados alternativamente inibem citocinas pró-inflamatórias, promovem citocinas anti-inflamatórias, atuam na resposta alérgica, na eliminação de parasitas e na remodelação da matriz (MANTOVANI et al., 2004).

Os macrófagos e células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho aderidas ao biomaterial são consideradas os principais mediadores da resposta de corpo estranho e podem influenciar no comportamento de outros leucócitos (neutrófilos, monócitos e linfócitos) e células do reparo (fibroblastos e queratinócitos) através da secreção de mediadores solúveis.

Macrófagos são capazes de secretar fatores de crescimento e angiogênicos, que são importantes na regulação da fibro-proliferação e na angiogênese (MARTIN e LEIBOVICH, 2005). Macrófagos ativados alternativamente expressam certas proteínas da matriz extracelular (MEC), como a fibronectina, e acredita-se que estejam envolvidos no remodelamento tecidual durante o reparo (GRATCHEV et al., 2001). Também produzem fatores pró-fibrogênicos que promovem a fibrogênese por fibroblastos, opostos aos macrófagos ativados classicamente que inibem a fibrogênese (SONG et al., 2000). Consequentemente, macrófagos aderidos ao biomaterial podem
secretar proteínas que modulam a fibrose em volta da cápsula fibrosa que se desenvolve em torno do material após a implantação. Esta cápsula fibrosa pode interferir com a função do biomaterial., dependendo da indicação do seu uso.

ANDERSON et al., (2007), verificaram que macrófagos e células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho de humanos aderidos no biomaterial produzem metaloproteinases de matriz (MMP). Elas são enzimas proteolíticas que hidrolisam componentes da MEC, afetam o comportamento celular por quebrar receptores da superfície celular e moléculas pericelulares, facilitam a liberação de fatores de crescimento da matriz e da superfície celular e citocinas. As MMPs influenciam diretamente a composição da MEC e podem causar um impacto no movimento, crescimento, diferenciação e sobrevivência celular. Assim, macrófagos e células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho de humanos aderidos no biomaterial podem modular a MEC (remodelando/fibrosando) e então afetar o desempenho do biomaterial.

2.4 – Principais funções das células inflamatórias e marcadores biológicos analisados no presente estudo

As células são estruturas pequenas e complexas, o que torna difícil ver sua estrutura, descobrir sua composição molecular e, mais difícil ainda, descobrir como seus vários componentes funcionam. Para compreender a biologia celular contemporânea é necessário entender parte de seus métodos. A microscopia de luz é um dos métodos utilizados para o estudo das células. Uma célula animal tem de 10 a 20 µm de diâmetro, em torno de um quinto do tamanho da menor partícula visível a olho nu. As células animais não são apenas minúsculas, mas também incolores e transparentes, sendo assim necessário o uso de corantes para tornar suas características visíveis (ALBERTS et al., 2004).

Existe íntima correlação entre a reparação óssea e determinadas proteínas que atuam como verdadeiros marcadores do processo (SANTOS et al., 2005). O avanço nesta área poderá contribuir para o desenvolvimento ou melhoria do tratamento de perdas ósseas, minimizando o tempo de reparo. A evolução das técnicas de biologia molecular e celular tem permitido a observação mais acurada de moléculas, como, por exemplo, quando se utiliza a imunohistoquímica para estudar as proteínas.

Através da técnica de imunohistoquímica, podemos observar em um corte histológico convencional a distribuição das proteínas presentes naquele tecido (Figura 2.1). A imunohistoquímica é usada para identificar constituintes celulares ou teciduais (antígenos) através de interações antígeno-anticorpo que podem ser visualizadas em microscópios (YAMASHITA, 2007). O seu princípio básico refere-se à capacidade de desenvolver anticorpos específicos para determinadas proteínas do organismo, às quais irão se ligar visando sua posterior identificação por diversos métodos como atividade luminescente, fluorescente ou corantes visíveis para o olho humano (enzimas como a peroxidase). Os anticorpos podem ser do tipo monoclonal (mais específico) ou policlonal (PINHO, 2005).



Figura 2.1 – Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido tumoral (câncer colo-retal). Coloração convencional em (a) e imunohistoquímica em (b), na qual podemos observar a presença de proteína p53 (coloração acastanhada) (PINHO, 2005).

Durante o exame de imunohistoquímica estes anticorpos são adicionados ao tecido contido em um corte histológico fixado em lâmina, no qual irão identificar e fixar-se às moléculas da proteína em questão, permitindo sua identificação e distribuição espacial. (Figura 2.2) (PINHO, 2005).



Figura 2.2 – Esquema identificando as principais etapas para a produção e utilização de anticorpos primários para imunohistoquímica (PINHO, 2005).

A imunohistoquímica vem sendo largamente empregada no diagnóstico de doenças e estudo de processos inflamatórios. A descrição mais detalhada deste método está no Apêndice 10.2.

A seguir apresentam-se as principais células inflamatórias e suas funções observadas na análise histomorfométrica, bem como a importância dos marcadores biológicos propostos para estudar a angiogênese local e a proliferação celular no presente estudo.

2.4.1- Eosinófilo (polimorfonuclear)

Age na modulação do processo inflamatório. Fagocita e digere complexos de antígenos com anticorpos (presentes em reações alérgicas). São muito menos numerosos do que os neutrófilos. Têm aproximadamente o mesmo tamanho dos neutrófilos. Seu núcleo em geral é bilobulado. Possui grânulos específicos, são os lisossomos (Figura 2.3).

Os eosinófilos não são células especializadas para a fagocitose de microrganismos. Sua atividade defensiva é realizada pela liberação do conteúdo de seus

grânulos para o meio extracelular e pela fagocitose e destruição de complexos antígenoanticorpo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).



Figura 2.3: Representação esquemática do eosinófilo e sua fotomicrografia com o núcleo bilobulado e grânulos citoplasmáticos grosseiros (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

2.4.2- Neutrófilo (polimorfonuclear)

Atua na defesa contra a invasão de microrganismos, estando presente em tecidos que estão infectados ou inflamados. Realiza fagocitose de substâncias e microrganismos. Tem núcleos formados por dois a cinco lóbulos (mais frequentemente, três lóbulos) ligados entre si por finas pontes de cromatina. A célula muito jovem tem núcleo não segmentado em lóbulos (Figura 2.4).

O citoplasma do neutrófilo apresenta principalmente dois tipos de granulações: os grânulos específicos, muito finos, e os grânulos azurófilos (lisossomos).

Enquanto estão no sangue circulante são esféricos e não fagocitam mas se tornam amebóides e fagocitários tão logo encontrem um substrato sólido sobre o qual possam emitir pseudópodos.

A substância ou microrganismo é rodeado pelos pseudópodos, que se fundem em torno dela. Assim a substância ou microrganismo finalmente ocupa um vacúolo (fagossomo). Logo a seguir, os grânulos específicos situados nas proximidades fundem suas membranas com a dos fagossomos e esvaziam seu conteúdo no interior destes. Em seguida os lisossomos descarregam as enzimas no fagossomo, onde tem lugar a morte e a digestão da substância ou microrganismo. A lisozima é um dos componentes dos grânulos dos neutrófilos.

Os neutrófilos e os outros granulócitos entram no tecido conjuntivo passando entre as células endoteliais dos capilares e vênulas pós-capilares (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004)



Figura 2.4: Representação esquemática do neutrófilo e sua fotomicrografia com os núcleos de um número variável de lóbulos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

2.4.3- Mastócito

Secreta moléculas que modulam a inflamação e a reação imunitária. É uma célula globosa grande e com citoplasma repleto de grânulos que se coram intensamente. Seus grânulos contêm mediadores químicos como a histamina e glicosaminas. Os mastócitos colaboram com as reações imunes e tem um papel fundamental na inflamação, nas reações alérgicas e na expulsão de parasitas (Figura 2.5).





Os grânulos dos mastócitos são metacromáticos devido à alta concentração de radicais ácidos presentes nos glicosaminas. Outros constituintes dos grânulos dos mastócitos são a histamina, a qual promove um aumento da permeabilidade vascular, importante na inflamação, proteases neutras e o fator quimiotático dos eosinófilos na anafilaxia. Com a dilatação e o aumento da permeabilidade dos vasos, decorrente da liberação de histamina, há uma facilitação da migração dos leucócitos e portanto dos anticorpos e componentes do complemento para o local da infecção (ALBERTS et al., 2004).

Os mastócitos participam ativamente na reparação tecidual., um processo contínuo que inicia após o trauma e tem muitas etapas: inflamação, formação de tecido de granulação e remodelamento. Participam de todos os estágios da reparação tecidual

atuando na permeabilidade dos vasos e formação de colágeno (LEVI-SCHAFFER e RUBINCHIK, 1995). Estão presentes na inflamação crônica, resposta imunológica e de fibrose (GALLI, 1993, RÜGER et al., 1994). Podem afetar o comportamento do fibroblasto e conseqüentemente o processo de fibrose, pela liberação de mediadores (histamina, proteoglicanas e enzima proteolíticas) (KUPIETZKY e LEVI-SCHAFFER, 1996).

Os mastócitos regulam a proliferação de fibroblastos e contribuem significantemente para o reparo tecidual. Segundo MUSSEL et al. (2003), o aumento do número de mastócitos interagindo com fibroblastos permite a grande produção de colágeno, aumentando assim a densidade da cápsula fibrosa.

Os mastócitos se originam de células precursoras hematopoéticas (produtoras de sangue) situadas na medula óssea. Estes mastócitos imaturos circulam no sangue, cruzam a parede de vênulas e capilares e penetram nos tecidos, onde vão proliferar e se diferenciar. Os mastócitos são amplamente distribuídos pelo corpo, porém são particularmente abundantes na derme e nos tratos digestivo e respiratório (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

2.4.4 – Macrófago

O macrófago participa da avaliação da atividade inflamatória, produzindo intensamente a lisozima, enzima capaz de digerir a parede celular de algumas bactérias, fazendo com que elas se desintegrem e morram (ALLEN et al.,1984, BISHOP et al., 2007, YAMATE et al.,1997). Está presente no interior dos grânulos (lisossomos) dos macrófagos e de células polimorfonuleares (Figura 2.6).

É uma célula fagocitária derivada dos monócitos sanguíneos, tipicamente residente em muitos tecidos. Tem a função de lixeiro e de apresentação de antígeno na resposta imune. Estes promovem a defesa, fagocitose de restos celulares, elementos anormais da matriz extracelular, células neoplásicas (cancerosas), substâncias estranhas que penetram no organismo e bactérias. Secreta substâncias (citocinas) que participam nas funções de defesa e reparo dos tecidos. É abundante nas inflamações crônicas. O macrófago tem importante papel na remoção de restos celulares e componentes extracelulares alterados (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). É um marcador tanto para a linhagem granulocítica, quanto para a monocítica (ALVES et al., 1999).



Figura 2.6: Representação esquemática da lisozima, presente no interior dos lisossomos dos macrófagos. (<u>www.educared.org.ar/enfoco/recursos/archivo/biologia.asp</u> e <u>www.sanidadanimal.info/cursos/inmuno2/ca031.htm</u>, acessados em julho de 2007).

2.4.5- Célula gigante multinucleada tipo corpo estranho

Os macrófagos podem se fundir formando a célula gigante multinucleada tipo corpo estranho (Figura 2.7). Faz a segregação e digestão de corpos estranhos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).



Figura 2.7: Fotomicrografia da célula gigante multinucleada tipo corpo estranho (*) no centro da figura (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

2.4.6- Fator VIII ou de Von Willebrand

O fator Von Willebrand, também designado por fator VIII endotelial., é uma glicoproteína, sintetizada exclusivamente por células endoteliais e megacariócitos. Além de atuar na adesão e agregação plaquetária, como transportador do fator VIII da coagulação, aumenta consideravelmente sua meia-vida plasmática. Em condições fisiológicas, a proteína endotelial é secretada constitutivamente, tanto para a membrana basal como para o sangue (Figura 2.8).

Quando o equilíbrio da célula endotelial é "perturbado", em condições patológicas, ocorre rápida secreção do fator VIII. A atividade antigênica do fator VIII na membrana plasmática é considerada universalmente como um marcador de disfunção endotelial e assim utilizada rotineiramente (LOPES et al., 1998)

O fator VIII é um angígeno altamente específico para a demonstração de diferenciação vascular (ALVES et al., 1999).



Figura 2.8: Mecanismo de interação entre as células sanguíneas a partir de um estímulo tecidual (Fator VIII). Um trauma vascular induz imediatamente as células endoteliais a liberarem os conteúdos dos seus grânulos estocados (corpos de Weibel-Palace) compostos de P-selectinas e Fatores de Von Willebrand (vWF) ou Fator VIII. O FVW é rapidamente depositado na superfície da matriz extracelular exposta, onde desempenha um papel importante na adesão das plaquetas ao sítio infectado (www.medstudents.com.br/original/revisao/selectin/selectin.htm, www.famema.br/hemocentro/sangue.htm, acessados em julho de 2007).

2.4.7- PCNA

Seu significado é antígeno nuclear de proliferação celular e tem a função de quantificação da proliferação celular (UENO et al., 2003) (Figura 2.9).

Estudar a dinâmica celular é vital para a compreensão de uma grande variedade de processos fisiológicos ou patológicos. Durante o ciclo celular, as células têm três caminhos possíveis a percorrer: permanecer no ciclo, e portanto seguir para uma próxima divisão, permanecer viva sem divisões adicionais ou morrer. Os métodos imunohistoquímicos baseiam-se na detecção de antígenos cuja expressão tenha relação qualitativa ou quantitativa com uma ou mais fases do ciclo celular. O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é uma proteína nuclear envolvida na síntese do DNA (ALVES et al., 1999).



Figura 2.9: Representação esquemática do anti-PCNA e fotomicrografia de sua marcação em corte histológico preparado pela imunohistoquímica. (www.cor.uams.edu/images/youngmouse do pcna40x.jpg e www.wikipedia.org/wiki/Wikipedia:WikiProject_Molecular_and_Cellular_Biology, acessados em julho de 2007).

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo é analisar qualitativa e quantitativamente a resposta tecidual a duas hidroxiapatitas com diferentes propriedades físico-químicas utilizadas para o preenchimento de defeito de tamanho crítico na calvária de ratos. Os objetivos específicos são:

• identificar e quantificar os tipos celulares presentes durante o reparo ósseo. Especificamente células polimorfonucleares, mastócitos, macrófagos, células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho;

- quantificar o número de microvasos;
- quantificar o número das células em proliferação;
- determinar a área de tecido conjuntivo, osso e biomaterial;

• avaliar a evolução do reparo correlacionando os parâmetros analisados com as propriedades físico-químicas dos biomateriais..

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Dentre os procedimentos relatados a seguir, destaque-se que as hidroxiapatitas utilizadas, os procedimentos cirúrgicos e processamento histotológico foram realizados durante o desenvolvimento da tese de doutorado do Márcio Baltazar Conz (2006, COPPE/UFRJ). A fim de proporcionar a compreensão do desenho experimental., este se encontra descrito no Apêndice 10.1. A análise histomorfométrica dos cortes histológicos corados por HE e imunohistoquímica foi realizada no presente trabalho.

4.1- Materiais

- a) HA-1 Grânulos de hidroxiapatita sintética de baixa cristalinidade (28%)
- **b)** HA-2 Grânulos de hidroxiapatita sintética alta cristalinidade (70%)

4.1.1- Grupos Experimentais

Um total de 60 ratos Wistar (*Rattus norvergicus*), machos adultos (cinco meses de idade e peso médio de 350g), fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, foram divididos aleatoriamente em três grupos de 20 animais cada, os quais foram mortos 1, 3, 6 e 9 meses após os procedimentos cirúrgicos. Os grupos experimentais analisados foram Coágulo (I), HA-1 (II) e HA-2 (III). Defeitos críticos foram criados no crânio dos ratos como descrito no Apêndice 10.1, e preenchidos com coágulo (controle) ou HA (1 e 2), como demonstrado na figura 4.1.



Figura 4.1: **Esquema do modelo experimental utilizado.** A) Grupo I (controle), defeito preenchido com coágulo e B) Grupo experimental., defeito preenchido com biomaterial (grupos II e III).

4.2- Métodos

4.2.1 - Análise microscópica descritiva - HE

As fotomicrografias dos cortes histológicos corados com HE foram obtidas com uma câmara digital Sony cyber-shot - P-93 operando no modo manual., zoom de 3.0, com 2592 x 1944 pixels, acoplada a um microscópio trinocular de luz (Jeneval-Zeis), com uma objetiva de 100x, sendo armazenadas digitalmente. Foram fotografados cerca de 40 campos em cada corte histológico, correspondente a um animal., sendo assim coletadas imagens dos 60 cortes perfazendo um total de 2.346 imagens digitais, sem haver sobreposições das mesmas (Figura 4.2).



Figura 4.2- **Representação esquemática das imagens capturadas com o microscópio.** Os círculos em amarelo são os campos fotografados nos cortes histológicos. Entre cada imagem capturada, 3 campos sucessivos e não superpostos foram desprezados.

Na análise microscópica, quantificou-se, por identificação morfológica, as células inflamatórias, em particular: polimorfonucleares (Figura 4.3), mastócitos (Figura 4.4) e células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho (Figura 4.5), assim como as áreas de tecido conjuntivo, osso e biomaterial.



Figura 4.3 – Fotomicrografia identificando as células polimorfonucleares.



Figura 4.4 – **Fotomicrografias identificando mastócito**. A) HE; B) Giemsa: corante utilizado para confirmar a marcação de mastócito, notar os grânulos no citoplasma (seta).



Figura 4.5 – Fotomicrografia identificando as células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho.

4.2.2- Análise microscópica descritiva - Imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica empregada foi a enzimática (peroxidase) tendo como cromógeno o 3,3 – diaminobenzidina – HCl (DAB), obtendo-se a cor marrom nas marcações. Determinou-se assim, a distribuição espaço-temporal das células imunopositivas para macrófagos (anti-lisozima); quantificação da intensidade da densidade de microvasos por meio do anti-fator VIII e proliferação celular através da identificação e quantificação do anti-PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular). O protocolo seguido foi o utilizado no Laboratório de Imunohistoquímica do Hospital Antônio Pedro da Universidade Federal Fluminense (Apêndice 10.3).

As capturas das imagens das seções imunomarcadas com anti-Lisozima (Figura 4.6) e anti-Fator VIII (Figuras 4.7), foram feitas com uma câmara digital Cannon Power Shot A 95 operando no modo automático, zoom de 3.0,com 2502x1944 pixels, acoplada a um microscópio trinocular de luz (Jeneval-Zeis), com uma objetiva de 40x, sendo armazenadas digitalmente. Foram fotografados 10 campos aleatórios em cada corte histológico (de cada imunomarcador), correspondente a um animal., sendo assim coletadas imagens dos 60 cortes perfazendo um total de 1.200 imagens digitais, sem haver sobreposições das mesmas.



Figura 4.6 – Fotomicrografia identificando as células imunopositivas para macrófagos, através da marcação com anti-lisozima.



Figura 4.7 – Fotomicrografia identificando os microvasos, através da marcação dos vasos sanguíneos imunomarcados com anti-fator VIII.

As capturas das imagens das seções imunomarcadas com anti-PCNA foram feitas com uma câmara digital Media Cybernetics, Evolution MP Color, acoplada a um microscópio trinocular de luz (Nikon Eclipse E 400), com uma objetiva de 20x, sendo armazenadas digitalmente. Foram fotografados 10 campos aleatórios em cada corte histológico, correspondente a um animal sendo, assim, coletadas imagens dos 60 cortes perfazendo um total de 600 imagens digitais, sem haver sobreposições das mesmas (Figura 4.8).



Figura 4.8 – Fotomicrografia identificando as células em proliferação, através da marcação com anti-PCNA.

4.2.3- Análise histomorfométrica

A análise histomorfométrica foi realizada com o auxílio do programa Image Pro Plus® (Media Cybernetics, L. P., Silver Spring, MD) (FRANCISCO, 2003), como descrito no Apêndice 10.4. Para o material corado com HE, a contagem das células identificadas morfologicamente foi manual (Figura 4.9), assim como a avaliação das áreas de tecido conjuntivo, osso e biomaterial (Figura 4.10).



Figura 4.9: A) e B) Tela do programa Image-Pro Plus® mostrando as contagens das 3 diferentes classes de células inflamatórias da análise histomorfométrica.



Figura 4.10: Tela do programa Image-Pro Plus ® mostrando a quantificação das áreas de tecido conjuntivo, osso e biomaterial.

Para o material imunomarcado com anti-lisozima, foi realizada a contagem dos elementos imunomarcados, sendo os macrófagos identificados também morfologicamente (Figura 4.11).



Figura 4.11: Tela do programa Image-Pro Plus ® mostrando a contagem de macrófagos imunomarcados com anti-lisozima.

Para o material imunomarcado com anti-fator VIII, foram computados apenas os vasos sanguíneos que apresentaram o diâmetro interno menor que 50 μ m, para isto foi utilizada uma grade sobre a imagem, onde cada lado do quadrado tinha 50 μ m (Figura 4.12).



Figura 4.12: Tela do programa Image-Pro Plus ® mostrando a contagem de vasos sanguíneos imunomarcados com anti-fator VIII, com o auxílio de grade sobre a imagem.

Para o material imunomarcado com anti-PCNA, foi realizada a segmentação de imagem, sendo feita a avaliação da área em mm² ocupada pelas células em proliferação (Figura 4.13).



Figura 4.13: Tela do programa Image-Pro Plus ® mostrando avaliação da área em mm² ocupada pelas células em proliferação imunomarcadas com anti-PCNA, com o auxílio da segmentação de imagem.

4.2.4- Análise Estatística

A análise estatística dos escores foi realizada por meio de teste de comparação das médias dentro dos grupos com o mesmo tratamento (coágulo, HA1 e HA2) e dos grupos com o mesmo tempo (1, 3, 6 e 9 meses). Como alguns dos dados obtidos na análise histomorfométrica das células inflamatórias (polimorfonucleares, mastócitos, macrófagos, células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho), da quantificação da

densidade de microvasos e da intensidade da proliferação celular apresentaram diferença significativa entre os desvios padrões, esses foram analisados estatisticamente pelos testes não paramétricos de Kruskal Wallis e complementados pelo teste de Dunn para comparações múltiplas das médias. Porém os dados referentes ao efeito tratamento das células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho e o efeito tratamento dos biomateriais em função dos períodos experimentais foram analisados pelo teste de Mann-Withney. Foram utilizados os programas GraphPad InStat versão 3.01 para Windows 95, 1998, GraphPad Software, San Diego California EUA,(www.graphpad.com) e GraphPad Prism versão 4.00 para Windows, 2003, GraphPad Software, San Diego California EUA, (www.graphpad.com) . O nível de significância empregado foi de $\alpha = 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 – Análise histológica descritiva

A análise histológica das biópsias nos vários grupos experimentais mostrou que o defeito não foi preenchido por tecido ósseo em nenhum dos tratamentos nos diferentes períodos estudados, porém foram identificados na área do defeito os seguintes estágios de reparação:

1 mês

O tecido conjuntivo se apresentou com alto grau de celularidade, denso em torno dos grânulos de biomaterial e frouxo nas regiões mais afastadas do mesmo. Tecido ósseo neoformado foi encontrado nos bordos do defeito (Figura 5.1A).

No grupo controle, a área ocupada pelo tecido conjuntivo era significantemente maior do que a do grupo HA2. O infiltrado inflamatório era crônico, com poucos polimorfonucleares identificados principalmente nas regiões próximas aos vasos sanguíneos (Figura 5.2A). É importante destacar a presença de células sugestivas de mastócitos, que se encontram dispersos no tecido conjuntivo (Figura 5.2B), a qual foi confirmada pela coloração por Giemsa. Com relação às células inflamatórias havia predominância de células mononucleares, sugestivas de macrófagos (Figura 5.2C). A distribuição de microvasos ocorreu de forma homogênea no tecido conjuntivo (Figura 5.2D). A proliferação celular era discreta e dispersa no tecido conjuntivo, sugerindo células inflamatórias e fibroblastos (Figura 5.2E).

No grupo com HA1, havia semelhança com o grupo controle na distribuição das células polimorfonucleares (Figura 5.3A) e dos mastócitos (Figura 5.3B). Os macrófagos se encontram em maior número nas regiões adjacentes ao biomaterial (Figuras 5.1 B e 5.3C). Foram identificadas células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho na periferia dos grânulos de HA1 (Figura 5.3D), sugerindo tentativa de atividade de absorção. A distribuição de microvasos ocorreu de forma homogênea (Figura 5.3E). Células em proliferação se concentram nas regiões adjacentes ao biomaterial, sugerindo células inflamatórias (Figura 5.3F).

A resposta tecidual à HA 2 apresentou poucas células polimorfonucleares, com maior concentração próximo aos vasos sanguíneos (Figura 5.4A). Os mastócitos se localizaram de forma dispersa no tecido conjuntivo (Figura 5.4B). Havia um maior número de macrófagos com relação à HA1 (Figura 5.4C). Células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho estavam presentes na periferia dos grânulos de HA2

(Figuras 5.1C e 5.4D). A distribuição de microvasos ocorreu homogeneamente dentro do tecido conjuntivo (Figura 5.4 E) e houve uma maior concentração de células em proliferação nas regiões adjacentes ao biomaterial (Figura 5.4F).

3 meses

Este período teve similaridades ao de 1 mês (Figura 5.5), porém o tecido conjuntivo apresentou o início do fibrosamento (Figura 5.5B) e nas regiões de maior presença de fibras, houve uma menor incidência de células (Figura 5.5A). Tecido ósseo neoformado foi encontrado nos bordos do defeito (Figura 5.5C).

No grupo controle, a área de osso era significantemente menor que nos grupos com HA1 e HA2. O infiltrado inflamatório tendeu a diminuir, com uma particular diferença na quantidade de macrófagos (Figuras 5.6A; B; C). A distribuição de microvasos ocorreu de forma homogênea (Figura 5.6D). Com relação ao grupo controle com 1 mês, a proliferação celular tendeu a aumentar (Figura 5.6E), sugestivo de aumento na atividade da reparação tecidual.

No grupo com HA1, houve semelhança com o período de 1 mês (Figuras 5.7A-D; F), porém a densidade de microvasos foi maior que o grupo controle de 3 meses (Figura 5.7E).

A resposta tecidual no grupo com HA 2 (Figuras 5.8A; B; D-F), seguiu o mesmo padrão que o HA1, porém observou-se maior número de macrófagos quando comparado ao controle de 3 meses (Figura 5.8C).

6 meses

Este período apresentou um padrão de similaridade com os períodos de 1 e 3 meses (Figura 5.9), porém o tecido conjuntivo era menos celularizado, indicando maior fibrosamento da região(Figura 5.9B) e com formação óssea na borda do defeito (Figura 5.9A). Houve o aumento na densidade de fibras na aresta do biomaterial (Figura 5.9C).

No grupo controle o infiltrado inflamatório e a proliferação celular tenderam a diminuir, sendo este último com uma diferença estatisticamente significante em relação ao período de 3 meses, sugerindo a diminuição do recrutamento de células inflamatórias (Figuras 5.10A-C, E), e a densidade de microvasos tendeu a aumentar (Figura 5.10D).

No grupo com HA1(Figura 5.11) houve semelhança com o período de 3 meses.

Em comparação com os períodos de 1 e 3 meses houve similaridade da resposta tecidual do grupo com HA 2 (Figuras 5.12A;B; D-F), porém notou-se clara diminuição na distribuição no numero de macrófagos (Figura 5.12C).

9 meses

Foi evidente a diminuição na densidade celular neste período em relação aos tempos anteriores (1-6 meses) (Figura 5.13A), com fibras organizadas em torno do biomaterial. A área de tecido conjuntivo aumentou significantemente em relação aos tempos anteriores para o grupo de HA1. Para o grupo de HA2, o tecido conjuntivo dobrou de área entre os períodos de 3 e 9 meses. O tecido ósseo neoformado foi encontrado em algumas regiões englobando os grânulos de HA (Figura 5.13B). Em outras regiões foram observadas células sugestivas de osteoclastos, indicando remodelamento ósseo, pois a área ocupada por osso diminuiu em relação ao período de 6 meses (Figura 5.13C).

No grupo controle, o infiltrado inflamatório e a proliferação celular tenderam a diminuir (Figuras 5.14A; B), com uma particular diferença da quantidade de macrófagos, sendo menor em relação ao grupo de controle com 1 mês (Figura 5.14C), sugerindo que a resposta inflamatória diminua com o tempo. Houve aumento na densidade de microvasos (Figura 5.14D). A proliferação celular foi dispersa no tecido conjuntivo (Figura 5.14E).

No grupo HA1, houve semelhança com o período de 6 meses (Figuras 5.15A; B; D-F), exceto pela diminuição no número de macrófagos (Figura 5.15C) em relação ao período de 1 mês.

A resposta tecidual no grupo com HA 2 foi semelhante ao período anterior (Figura 5.16A; B; D; F), porém o número de macrófagos (Figura 5.16C) foi menor em relação ao grupo de HA2 com 3 meses. A densidade de microvasos (Figura 5.16E) diminuiu de forma significante em relação ao grupo de HA2 com 1 mês, talvez por neste momento se apresentarem vasos de maior calibre.



Figura 5.1 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 1 mês (HE). A) Grupo controle, exibindo tecido conjuntivo frouxo (TC) e no bordo do defeito tecido ósseo neoformado (O) exibindo osteócitos (Oc) e osteoblastos (Ob); B) Grupo HA1, biomaterial (Bm) em contato com células mononucleares, sugestivas de macrófagos (M) e células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho (CG) e invaginação do tecido para o interior de uma partícula (setas vermelhas); C) Grupo HA2, tecido conjuntivo (TC) com células inflamatórias (seta) na periferia do biomaterial (Bm).



Figura 5.2 - Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 1 mês do grupo controle. A) Células polimorfonucleares (setas) próximas a vasos sanguíneos (VS) (HE); B) Mastócitos (setas) dispersos no tecido conjuntivo (TC) (HE); C) Macrófagos (setas) predominando no infiltrado inflamatório (anti-Lisozima/40x); D) Microvasos (setas) distribuídos homogeneamente dentro do tecido conjuntivo (anti-Fator VIII); E) Células em proliferação (setas) sugestivas de células inflamatórias (anti-PCNA).



Figura 5.3 - Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 1 mês do grupo HA1. A) Células polimorfonucleares (setas) próximas a vasos sanguíneos (VS) (HE); B) Mastócitos (setas) dispersos no tecido conjuntivo (TC) (HE); C) Macrófagos (setas) se encontram em maior número nas regiões adjacentes ao biomaterial (Bm) e poucos dispersos no tecido conjuntivo (TC) (anti-Lisozima); D) Célula gigante multinucleada tipo corpo estranho (seta) na periferia do biomaterial (Bm) (HE); E) Microvasos (setas) distribuídos homogeneamente dentro do tecido conjuntivo (TC) (anti-Fator VIII); F) Células em proliferação (setas) se concentram em íntimo contato com o biomaterial (Bm)., sugestivas de células inflamatórias (anti-PCNA).



Figura 5.4 - Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 1 mês do grupo HA2. A) Células polimorfonucleares (setas) próximas a vasos sanguíneos (VS) (HE); B) Mastócitos (setas) dispersos no tecido conjuntivo (TC) (HE); C) Macrófagos (setas) se encontram em maior número nas regiões adjacentes ao biomaterial (Bm) e poucos dispersos no tecido conjuntivo (anti-Lisozima); D) Célula gigante multinucleada tipo corpo estranho (seta) na periferia do grânulo de HA (HE); E) Microvasos (setas) distribuídos homogeneamente dentro do tecido conjuntivo (anti-Fator VIII); F) Células em proliferação (setas) se concentram em íntimo contato com o biomaterial (Bm)., sugestivas de células inflamatórias (anti-PCNA).



Figura 5.5 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 3 meses (HE). A) Grupo controle, exibindo tecido conjuntivo (TC) fibroso e menos celular; B) Grupo HA1, biomaterial (Bm) apresentando em sua periferia células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho (CG) e tecido conjuntivo denso (TC) com fibras ordenadas ao seu redor; C) Grupo HA2, tecido ósseo neoformado (O) no bordo do defeito exibindo osteócitos (Oc) e osteoblastos (Ob).



Figura 5.6 - Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 3 meses do grupo controle. A) Célula polimorfonuclear (seta) próxima a vaso sanguíneo (HE); B) Mastócitos (setas) dispersos no tecido conjuntivo (TC) (HE); C) Macrófagos (setas) em menor número, pois a reação inflamatória está diminuindo (anti-Lisozima); D) Microvasos (setas) distribuídos homogeneamente dentro do tecido conjuntivo (anti-Fator VIII); E) Células em proliferação (setas) sugestivas de células inflamatórias (anti-PCNA).


Figura 5.7 - Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 3 meses do grupo HA1. A) Células polimorfonucleares (seta) próximas a vasos sanguíneos (VS) (HE); B) Mastócitos (seta) dispersos no tecido conjuntivo (HE); C) Macrófagos (setas) se encontram em maior número nas regiões adjacentes ao biomaterial (Bm) e poucos dispersos no tecido conjuntivo (anti-Lisozima); D) Célula gigante multinucleada tipo corpo estranho (seta) na periferia do grânulo de HA (HE); E) Microvasos (setas) distribuídos homogeneamente dentro do tecido conjuntivo (anti-Fator VIII); F) Células em proliferação (seta) se concentram em íntimo contato com o biomaterial (Bm), sugestivas de células inflamatórias (anti-PCNA).



Figura 5.8 - Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 3 meses do grupo HA2. A) Células polimorfonucleares (setas) próximas a vasos sanguíneos (VS) (HE); B) Mastócitos (setas) dispersos no tecido conjuntivo (HE); C) Macrófagos (setas) se encontram em maior número nas regiões adjacentes ao biomaterial (Bm) e poucos dispersos no tecido conjuntivo (anti-Lisozima); D) Célula gigante multinucleada tipo corpo estranho (seta) na periferia do biomaterial (Bm) (HE); E) Microvasos (setas) distribuídos homogeneamente dentro do tecido conjuntivo (anti-Fator VIII); F) Células em proliferação (setas) se concentram em íntimo contato com o biomaterial (Bm), sugestivas de células inflamatórias (anti-PCNA).



Figura 5.9 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 6 meses (HE). A) Grupo controle, exibindo tecido conjuntivo (TC) menos celularizado e tecido ósseo (O) neoformado no bordo do defeito exibindo osteócitos (Oc) e osteoblastos (Ob); B) Grupo HA1, tecido conjuntivo organizado (TC); C) Grupo HA2, tecido conjuntivo (TC) com fibras ordenadas ao redor do grânulo de HA.



Figura 5.10 - Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 6 meses do grupo controle. O infiltrado inflamatório tende a diminuir. A) Célula polimorfonuclear (seta) próxima a vaso sanguíneo (VS) (HE); B) Mastócitos (setas) dispersos no tecido conjuntivo (TC) mais fibroso (HE); C) Macrófago (seta) em menor número, pois a reação inflamatória está diminuindo (anti-Lisozima); D) Microvasos (setas) distribuídos homogeneamente dentro do tecido conjuntivo (anti-Fator VIII); E) Células em proliferação (seta) sugestivas de fibroblastos (anti-PCNA).



Figura 5.11 - Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 6 meses do grupo HA1. A) Célula polimorfonuclear (seta) próxima a vaso sanguíneo (VS) (HE); B) Mastócitos (setas) dispersos no local (HE); C) Macrófagos (setas) se encontram em maior número adjacentes ao biomaterial e poucos dispersos no tecido conjuntivo (anti-Lisozima); D) Célula gigante multinucleada tipo corpo estranho (seta) na periferia do biomaterial (Bm) (HE); E) Microvasos (setas) distribuídos homogeneamente na região (anti-Fator VIII); F) Células em proliferação (setas vermelhas) se concentram em contato com o biomaterial (Bm), sugestivas de células inflamatórias (anti-PCNA).



Figura 5.12 - Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 6 meses do grupo HA2. A) Célula polimorfonuclear (seta) próxima a vasos sanguíneos (VS) (HE); B) Mastócito (seta) dispersos no tecido conjuntivo (HE); C) Macrófagos (setas) no tecido conjuntivo. Alguns grânulos de biomaterial (Bm) se encontram envoltos por cápsula fibrosa (anti-Lisozima); D) Célula gigante multinucleada tipo corpo estranho (seta) na periferia do grânulo de HA (HE); E) Microvasos (setas) distribuídos homogeneamente dentro do tecido conjuntivo (anti-Fator VIII); F) Células em proliferação (setas) se concentram dispersas no tecido conjuntivo (TC), sugestivas de fibroblastos (anti-PCNA).



Figura 5.13 – Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 9 meses. A) Grupo controle, exibindo tecido conjuntivo denso (TC) (HE); B) Grupo HA1, tecido ósseo sendo formado envolvendo os grânulos de HA (HE); C) Grupo HA2, osso neoformado celularizado e em seu bordo células sugestivas de osteoclastos (seta), promovendo o remodelamento ósseo (HE).



Figura 5.14 - Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 9 meses do grupo controle. O infiltrado inflamatório tendeu a diminuir. A) Célula polimorfonuclear (seta) próxima ao vaso sanguíneo (VS) (HE); B) Mastócitos (setas) dispersos no tecido conjuntivo (TC) (HE); C) Macrófagos (setas) (anti-Lisozima); D) Microvasos (setas) distribuídos homogeneamente dentro do tecido conjuntivo (anti-Fator VIII); E) Células em proliferação (seta) sugestivas de fibroblastos (anti-PCNA).



Figura 5.15 - Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 9 meses do grupo HA1. A) Células polimorfonucleares (setas) próxima a vaso sanguíneo (VS) (HE); B) Mastócitos (setas) dispersos no tecido conjuntivo (HE); C) Macrófagos (setas) em maior concentração próximos ao biomaterial (Bm) (anti-Lisozima); D) Célula gigante multinucleada tipo corpo estranho (seta) na periferia do biomaterial (Bm) (HE); E) Microvasos (setas) distribuídos homogeneamente dentro do tecido conjuntivo (anti-Fator VIII); F) Células em proliferação (setas vermelhas) (anti-PCNA).



Figura 5.16 - Fotomicrografias do defeito ósseo no período experimental de 9 meses do grupo HA2. A) Células polimorfonucleares (setas vermelhas) próximas aos vasos sanguíneos (VS) (HE); B) Mastócito (seta) disperso no tecido conjuntivo (HE); C) Macrófagos (setas) no tecido conjuntivo. Alguns grânulos do biomaterial (Bm) se encontram envoltos por cápsula fibrosa (anti-Lisozima); D) Célula gigante multinucleada tipo corpo estranho (seta) na periferia do biomaterial (Bm), sugerindo atividade de absorção (HE); E) Microvasos (setas) distribuídos homogeneamente dentro do tecido conjuntivo (anti-Fator VIII); F) Células em proliferação (setas) se concentram próximas ao biomaterial (Bm) (anti-PCNA).

5.2 – Análise histomorfométrica

A análise histomorfométrica dos cortes corados com Hematoxilina e Eosina e de cortes submetidos à imunohistoquímica foi realizada nas imagens obtidas por microscópio de luz e armazenadas digitalmente.

As análises estatísticas entre os grupos experimentais e controle foram realizadas de duas formas. A primeira buscou comparar o comportamento tecidual em resposta aos diferentes materiais de preenchimento inseridos nos defeitos ósseos em cada período de tempo do experimento (1, 3, 6 e 9 meses) – efeito tratamento. A outra abordagem foi realizada avaliando a quantidade de células inflamatórias, área de células em proliferação e a densidade de microvasos em cada grupo ao longo do experimento – efeito tempo.

Os valores resultantes das contagens foram relacionados proporcionalmente à quantidade de área de tecido conjuntivo presente em cada corte histológico. Houve uma grande variação no índice do tecido conjuntivo, pois ocorreu ossificação diminuindo a área inicialmente preenchida com coágulo, assim como houve também uma área ocupada pelo biomaterial. Portanto, os resultados foram expressos na relação de densidade de cada item analisado sobre a área de tecido conjuntivo presente em cada animal.

5.2.1 - Células polimorfonucleares

A presença de células polimorfonucleares em todos os períodos avaliados, não apresentou diferença significativa (p>0,05) entre os grupos coágulo, HA1 e HA2 (Figura 5.17 e Tabelas 5.1 e 5.2). Embora não tenha havido diferença estatisticamente significante entre os grupos, houve uma tendência de diminuição do número de células polimorfonucleares ao longo dos períodos experimentais nos grupos coágulo e HA2 e uma tendência de aumento no grupo HA1 (Figura 5.18).



Figura 5.17 – Número de PMN/mm² de tecido conjuntivo do defeito ósseo tratado com coágulo, HA1 e HA2, ao longo dos períodos experimentais.

Tabela 5.1 - **Efeito do tempo para PMN** – Determinação do número de PMN / mm². Análise de dados pelos testes Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn (Instat, GraphPad Inc.) dos grupos controle (C) e experimentais (HA1 e HA2) em função dos períodos experimentais (1, 3, 6, 9 meses)

Comparação	Valor de p
C1 x C3	ns
C1 x C6	ns
C1 x C9	ns
C3 x C6	ns
C3 x C9	ns
C6 x C9	ns
HA1-1 x HA1-3	ns
HA1-1 x HA1-6	ns
HA1-1 x HA1-9	ns
HA1-3 x HA1-6	ns
HA1-3 x HA1-9	ns
HA1-6 x HA1-9	ns
HA2-1 x HA2-3	ns
HA2-1 x HA2-6	ns
HA2-1 x HA2-9	ns
HA2-3 x HA2-6	ns
HA2-3 x HA2-9	ns
HA2-6 x HA2-9	ns

Tabela 5.2 - **Efeito do tratamento para PMN** – Determinação do número de PMN / mm². Análise de dados pelos testes Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn (Instat, GraphPad Inc.) dos grupos controle (C) e experimentais (HA1 e HA2) em função dos períodos experimentais (1, 3, 6, 9 meses)

Comparação	Valor de p
C1 x HA1-1	ns
C1 x HA2-1	ns
HA1-1 x HA2-1	ns
C3 x HA1-3	ns
C3 x HA2-3	ns
HA1-3 x HA2-3	ns
C6 x HA1-6	ns
C6 x HA2-6	ns
HA1-6 x HA2-6	ns
C9 x HA1-9	ns
C9 x HA2-9	ns
HA1-9 x HA2-9	ns



Figura 5.18 – Tendência de diminuição do número de PMN/mm² de tecido conjuntivo do defeito ósseo tratado com coágulo e HA2 e uma tendência de aumento dos PMN no grupo HA1, ao longo dos períodos experimentais.

5.2.2 - Mastócitos

A presença de mastócitos em todos os períodos avaliados, não apresentou diferença significativa (p>0,05) entre os grupos coágulo, HA1 e HA2 (Figura 5.19 e Tabelas 5.3 e 5.5). Embora não tenha havido diferença estatisticamente significante entre os grupos, houve uma tendência de diminuição do número de mastócitos ao longo dos períodos experimentais (Figura 5.20).



Figura 5.19 – Número de mastócitos/mm² de tecido conjuntivo do defeito ósseo tratado com coágulo, HA1 e HA2, ao longo dos períodos experimentais.

Tabela 5.3 - Efeito do tempo para mastócito – Determinação do número de Mastócito / mm². Análise de dados pelos testes Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn (Instat, GraphPad Inc.) dos grupos controle (C) e experimentais (HA1 e HA2) em função dos períodos experimentais (1, 3, 6, 9 meses)

Comparação	Valor de p
C1 x C3	ns
C1 x C6	ns
C1 x C9	ns
C3 x C6	ns
C3 x C9	ns
C6 x C9	ns
HA1-1 x HA1-3	ns
HA1-1 x HA1-6	ns
HA1-1 x HA1-9	ns
HA1-3 x HA1-6	ns
HA1-3 x HA1-9	ns
HA1-6 x HA1-9	ns
HA2-1 x HA2-3	ns
HA2-1 x HA2-6	ns
HA2-1 x HA2-9	ns
HA2-3 x HA2-6	ns
HA2-3 x HA2-9	ns
HA2-6 x HA2-9	ns

Tabela 5.4 - **Efeito do tratamento para mastócito** – Determinação do número de Mastócito / mm². Análise de dados pelos testes Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn (Instat, GraphPad Inc.) dos grupos controle (C) e experimentais (HA1 e HA2) em função dos períodos experimentais (1, 3, 6, 9 meses)

Comparação	Valor de p
C1 x HA1-1	ns
C1 x HA2-1	ns
HA1-1 x HA2-1	ns
C3 x HA1-3	ns
C3 x HA2-3	ns
HA1-3 x HA2-3	ns
C6 x HA1-6	ns
C6 x HA2-6	ns
HA1-6 x HA2-6	ns
C9 x HA1-9	ns
C9 x HA2-9	ns
HA1-9 x HA2-9	ns



Figura 5.20 – Tendência de diminuição do número de mastócitos/mm² de tecido conjuntivo do defeito ósseo tratado com coágulo, HA1 e HA2, ao longo dos períodos experimentais.

5.2.3 – Macrófagos

Na quantidade de macrófagos foram observadas diminuições significantes (p<0,05) entre as médias no grupo controle de 1 mês (80 céls/mm^2) para 3 meses (20 céls/mm^2) e para 9 meses (25 céls/mm^2); no grupo HA1 de 1 mês (141 céls/mm^2) para 9 meses (19 céls/mm^2) e finalmente no grupo HA2 de 1 mês (238 céls/mm^2) para 6 meses (34 céls/mm^2), de 3 meses (308 céls/mm^2) para 6 meses (34 céls/mm^2) e de 3 meses (308 céls/mm^2) para 9 meses (49 céls/mm^2). Entre os grupos controle e HA2 houve aumentos significantes (p<0,01) entre as médias dos períodos experimentais de 1 e 3 meses (Figura 5.21 e Tabelas 5.5 e 5.6). Foi observada uma tendência de diminuição do número de macrófagos ao longo dos períodos experimentais (Figura 5.22).



Figura 5.21 – Número de macrófagos/mm² de tecido conjuntivo do defeito ósseo tratado com coágulo, HA1 e HA2, ao longo dos períodos experimentais.

Tabela 5.5 - **Efeito do tempo para macrófagos** – Determinação do número de macrófagos / mm². Análise de dados pelos testes Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn (Instat, GraphPad Inc.) dos grupos controle (C) e experimentais (HA1 e HA2) em função dos períodos experimentais (1, 3, 6, 9 meses)

Comparação	Valor de p
C1 x C3	<0,05
C1 x C6	ns
C1 x C9	<0,01
C3 x C6	ns
C3 x C9	ns
C6 x C9	ns
HA1-1 x HA1-3	ns
HA1-1 x HA1-6	ns
HA1-1 x HA1-9	<0,01
HA1-3 x HA1-6	ns
HA1-3 x HA1-9	ns
HA1-6 x HA1-9	ns
HA2-1 x HA2-3	ns
HA2-1 x HA2-6	<0,05
HA2-1 x HA2-9	ns
HA2-3 x HA2-6	<0,01
HA2-3 x HA2-9	<0,05
НА2-6 х НА2-9	ns

Tabela 5.6 - **Efeito do tratamento para macrófagos** – Determinação do número de macrófagos / mm². Análise de dados pelos testes Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn (Instat, GraphPad Inc.) dos grupos controle (C) e experimentais (HA1 e HA2) em função dos períodos experimentais (1, 3, 6, 9 meses)

Comparação	Valor de p
C1 x HA1-1	ns
C1 x HA2-1	<0,01
HA1-1 x HA2-1	ns
C3 x HA1-3	ns
C3 x HA2-3	<0,01
HA1-3 x HA2-3	ns
C6 x HA1-6	ns
C6 x HA2-6	ns
HA1-6 x HA2-6	ns
C9 x HA1-9	ns
C9 x HA2-9	ns
HA1-9 x HA2-9	ns



Figura 5.22 – Tendência de diminuição da quantidade de macrófagos/mm² de tecido conjuntivodo defeito ósseo tratado nos grupos, ao longo dos períodos experimentais.

5.2.4 – Células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho

É possível constatar que a células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho não foram observadas no grupo coágulo e não houve diferença significativa (p>0,05) entre os grupos HA1 e HA2 ao longo dos períodos experimentais (Figura 5.23 e Tabelas 5.7 e 5.8). Embora não tenha havido diferença estatisticamente significante entre os grupos HA1 e HA2, houve uma tendência de diminuição do número de células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho ao longo dos períodos experimentais avaliados, sendo esta maior no grupo HA2 (Figura 5.24).



Figura 5.23 – Número de células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho/mm² de tecido conjuntivo do defeito ósseo tratado com HA1 e HA2, ao longo dos períodos experimentais. Nesta figura,o grupo coágulo não é aparente visto não ter célula gigante multinucleada tipo corpo estranho.

Tabela 5.7 - Efeito do tempo para células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho – Determinação do número de células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho / mm². Análise de dados pelos testes Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn (Instat, GraphPad Inc.) dos grupos experimentais (HA1 e HA2) em função dos períodos experimentais (1, 3, 6, 9 meses)

Comparação	Valor de p
HA1-1 x HA1-3	ns
HA1-1 x HA1-6	ns
HA1-1 x HA1-9	ns
HA1-3 x HA1-6	ns
HA1-3 x HA1-9	ns
HA1-6 x HA1-9	ns
HA2-1 x HA2-3	ns
HA2-1 x HA2-6	ns
HA2-1 x HA2-9	ns
HA2-3 x HA2-6	ns
HA2-3 x HA2-9	ns
HA2-6 x HA2-9	ns

Tabela 5.8 - **Efeito do tratamento para células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho** – Determinação do número de células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho / mm². Análise de dados pelo teste de Mann Whitney (Instat, GraphPad Inc.) dos grupos experimentais (HA1 e HA2) em função dos períodos experimentais (1, 3, 6, 9 meses)

Comparação	Valor de p
HA1-1 x HA2-1	ns
HA1-3 x HA2-3	ns
HA1-6 x HA2-6	ns
HA1-9 x HA2-9	ns



Figura 5.24 – Tendência de diminuição do número de células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho/mm² de tecido conjuntivo do defeito ósseo tratado com HA1 e HA2, ao longo dos períodos experimentais. Nesta figura, o grupo coágulo não é aparente, visto não ter célula gigante multinucleada tipo corpo estranho.

5.2.5 – Densidade de microvasos

Na densidade de microvasos houve diminuição significativa (p<0,05) entre as médias dos grupos HA2 de um mês (92 céls/mm^2) para 9 meses (28 céls/mm^2). Entre os outros grupos houve aumento estatisticamente significante (p<0,05) entre os grupos controle e HA1 no período experimental de 3 meses (Figura 5.25 e Tabelas 5.9 e 5.10). Foi observada uma tendência de diminuição da densidade de microvasos, nos grupos HA1 e HA2 e uma tendência de aumento no grupo coágulo, ao longo dos períodos experimentais (Figura 5.26).



Figura 5.25 – Densidade de microvasos/mm² de tecido conjuntivo do defeito ósseo tratado com coágulo, HA1 e HA2, ao longo dos períodos experimentais.

Tabela 5.9 - **Efeito do tempo para a densidade de microvasos** – Determinação da densidade de microvasos / mm². Análise de dados pelos testes Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn (Instat, GraphPad Inc.) dos grupos controle (C) e experimentais (HA1 e HA2) em função dos períodos experimentais (1, 3, 6, 9 meses)

Comparação	Valor de p
C1 x C3	ns
C1 x C6	ns
C1 x C9	ns
C3 x C6	ns
C3 x C9	ns
C6 x C9	ns
HA1-1 x HA1-3	ns
HA1-1 x HA1-6	ns
HA1-1 x HA1-9	ns
HA1-3 x HA1-6	ns
HA1-3 x HA1-9	ns
HA1-6 x HA1-9	ns
HA2-1 x HA2-3	ns
HA2-1 x HA2-6	ns
HA2-1 x HA2-9	<0,05
HA2-3 x HA2-6	ns
HA2-3 x HA2-9	ns
HA2-6 x HA2-9	ns

Tabela 5.10 - **Efeito do tratamento para a densidade de microvasos** – Determinação da densidade de microvasos / mm². Análise de dados pelos testes Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn (Instat, GraphPad Inc.) dos grupos controle (C) e experimentais (HA1 e HA2) em função dos períodos experimentais (1, 3, 6, 9 meses)

Comparação	Valor de p
C1 x HA1-1	ns
C1 x HA2-1	ns
HA1-1 x HA2-1	ns
C3 x HA1-3	<0,05
C3 x HA2-3	ns
HA1-3 x HA2-3	ns
C6 x HA1-6	ns
C6 x HA2-6	ns
HA1-6 x HA2-6	ns
C9 x HA1-9	ns
C9 x HA2-9	ns
НА1-9 х НА2-9	ns



Figura 5.26 – Tendência de diminuição da densidade de microvasos/mm² de tecido conjuntivo do defeito ósseo tratado nos grupos HA1 e HA2 e uma tendência de aumento no grupo coágulo, ao longo dos períodos experimentais.

5.2.6 – Células em proliferação

No grupo controle foram observadas diminuições significantes (p<0,05) entre as médias de 3 meses (6 céls/mm^2) para 6 meses ($0,5 \text{ cél/mm}^2$) e de 3 meses (6 céls/mm^2) para 9 meses ($0,5 \text{ cél/mm}^2$). Dentro de todos os grupos não houve diferença estatisticamente significante no índice de proliferação celular nos diferentes períodos experimentais (Figura 5.27 e Tabelas 5.11 e 5.12). Embora não tenha havido diferença estatisticamente significante entre os grupos, houve uma tendência de diminuição ao longo dos períodos experimentais (Figura 5.28).



Figura 5.27 – Área de células em proliferação/mm² de tecido conjuntivo do defeito ósseo tratado com coágulo, HA1 e HA2, ao longo dos períodos experimentais.

Tabela 5.11 - **Efeito do tempo na área de células em proliferação** – Determinação da área de células em proliferação/ mm². Análise de dados pelos testes Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn (Instat, GraphPad Inc.) dos grupos controle (C) e experimentais (HA1 e HA2) em função dos períodos experimentais (1, 3, 6, 9 meses)

Comparação	Valor de p
C1 x C3	ns
C1 x C6	ns
C1 x C9	ns
C3 x C6	<0,05
C3 x C9	<0,05
C6 x C9	ns
HA1-1 x HA1-3	ns
HA1-1 x HA1-6	ns
HA1-1 x HA1-9	ns
HA1-3 x HA1-6	ns
HA1-3 x HA1-9	ns
HA1-6 x HA1-9	ns
HA2-1 x HA2-3	ns
HA2-1 x HA2-6	ns
HA2-1 x HA2-9	ns
HA2-3 x HA2-6	ns
HA2-3 x HA2-9	ns
HA2-6 x HA2-9	ns

Tabela 5.12 - **Efeito do tratamento na área de células em proliferação** – Determinação da área de células em proliferação / mm². Análise de dados pelos testes Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn (Instat, GraphPad Inc.) dos grupos controle (C) e experimentais (HA1 e HA2) em função dos períodos experimentais (1, 3, 6, 9 meses)

Comparação	Valor de p
C1 x HA1-1	ns
C1 x HA2-1	ns
HA1-1 x HA2-1	ns
C3 x HA1-3	ns
C3 x HA2-3	ns
HA1-3 x HA2-3	ns
C6 x HA1-6	ns
C6 x HA2-6	ns
HA1-6 x HA2-6	ns
C9 x HA1-9	ns
C9 x HA2-9	ns
НА1-9 х НА2-9	ns



Figura 5.28 – Tendência de diminuição da área de células em proliferação/mm² de tecido conjuntivo do defeito ósseo tratado com coágulo, HA1 e HA2, ao longo dos períodos experimentais.

5.2.7 – Tecido Conjuntivo

Foi possível constatar que a área de tecido conjuntivo aumentou (p<0,05) de 43% para 72% e de 41% para 72% entre os períodos de 3 e 9 meses e de 6 e 9 meses, respectivamente, no grupo HA1. Para o grupo HA2, o tecido conjuntivo dobrou de área entre os períodos de 3 e 9 meses (p<0,05).

Entre os grupos experimentais observou-se que a área de tecido conjuntivo era maior no grupo coágulo em relação o HA2 com 1 e 3 meses após a implantação. Aos 6 meses, a área de tecido conjuntivo no grupo HA1 era menor que o HA2 (p<0,05) (Figura 5.29 e Tabelas 5.13 e 5.14).



Figura 5.29 – Percentual de área de tecido conjuntivo encontrado no defeito ósseo tratado com coágulo, HA1 e HA2, ao longo dos períodos experimentais.

Tabela 5.13 - **Efeito do tempo no tecido conjuntivo** – Determinação da porcentagem de tecido conjuntivo. Análise de dados pelos testes Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn (Instat, GraphPad Inc.) dos grupos controle (C) e experimentais (HA1 e HA2) em função dos períodos experimentais (1, 3, 6, 9 meses)

Comparação	Valor de p
C1 x C3	ns
C1 x C6	ns
C1 x C9	ns
C3 x C6	ns
C3 x C9	ns
C6 x C9	ns
HA1-1 x HA1-3	ns
HA1-1 x HA1-6	ns
HA1-1 x HA1-9	ns
HA1-3 x HA1-6	ns
HA1-3 x HA1-9	<0,05
HA1-6 x HA1-9	<0,05
HA2-1 x HA2-3	ns
HA2-1 x HA2-6	ns
HA2-1 x HA2-9	ns
HA2-3 x HA2-6	ns
HA2-3 x HA2-9	<0,05
HA2-6 x HA2-9	ns

Tabela 5.14 - **Efeito do tratamento no tecido conjuntivo** – Determinação da porcentagem de tecido conjuntivo. Análise de dados pelos testes Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn (Instat, GraphPad Inc.) dos grupos controle (C) e experimentais (HA1 e HA2) em função dos períodos experimentais (1, 3, 6, 9 meses)

Comparação	Valor de p
C1 x HA1-1	ns
C1 x HA2-1	<0,01
HA1-1 x HA2-1	ns
C3 x HA1-3	ns
C3 x HA2-3	<0,05
HA1-3 x HA2-3	ns
C6 x HA1-6	ns
C6 x HA2-6	ns
HA1-6 x HA2-6	<0,05
C9 x HA1-9	ns
C9 x HA2-9	ns
HA1-9 x HA2-9	ns

5.2.8 - Osso

.

A área ocupada pelo osso no defeito avaliado não variou significativamente durante os períodos experimentais (p>0,05), exceto quando comparamos os períodos de 1 e 6 meses e 6 e 9 meses dentro do grupo HA1, quando se observa o aumento de 8% para 34% e a redução da área do osso de 34% para 5% (p<0,05), respectivamente. Os tratamentos experimentais utilizados (coágulo, HA1 e HA2) não afetaram significativamente a área de osso (p>0,05), exceto aos 3 meses onde o grupo coágulo apresentou a área de osso menor que os grupos HA1 e HA2 (p<0,05) (Figura 5.30 e Tabelas 5.15 e 5.16).



Figura 5.30 – Percentual de área de osso encontrado no defeito ósseo tratado com coágulo, HA1 e HA2, ao longo dos períodos experimentais.

Tabela 5.15 - **Efeito do tempo no osso** – Determinação da porcentagem de osso. Análise de dados pelos testes Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn (Instat, GraphPad Inc.) dos grupos controle (C) e experimentais (HA1 e HA2) em função dos períodos experimentais (1, 3, 6, 9 meses)

Comparação	Valor de p
C1 x C3	ns
C1 x C6	ns
C1 x C9	ns
C3 x C6	ns
C3 x C9	ns
C6 x C9	ns
HA1-1 x HA1-3	ns
HA1-1 x HA1-6	<0,05
HA1-1 x HA1-9	ns
HA1-3 x HA1-6	ns
HA1-3 x HA1-9	ns
HA1-6 x HA1-9	<0,05
HA2-1 x HA2-3	ns
HA2-1 x HA2-6	ns
HA2-1 x HA2-9	ns
HA2-3 x HA2-6	ns
HA2-3 x HA2-9	ns
HA2-6 x HA2-9	ns

Tabela 5.16 - **Efeito do tratamento no osso** – Determinação da porcentagem de osso. Análise de dados pelos testes Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn (Instat, GraphPad Inc.) dos grupos controle (C) e experimentais (HA1 e HA2) em função dos períodos experimentais (1, 3, 6, 9 meses)

Comparação	Valor de p
C1 x HA1-1	ns
C1 x HA2-1	ns
HA1-1 x HA2-1	ns
C3 x HA1-3	<0,05
C3 x HA2-3	<0,05
HA1-3 x HA2-3	ns
C6 x HA1-6	ns
C6 x HA2-6	ns
HA1-6 x HA2-6	ns
C9 x HA1-9	ns
C9 x HA2-9	ns
HA1-9 x HA2-9	ns

5.2.9 - Biomaterial

Foi observado aumento significativo na área de biomaterial entre os períodos de 1mês (14%) para 9 meses (22%) e 6 meses (12%) para 9 meses (22%) no grupo HA1 (p<0,05) e redução também significativa entre o período de 3 meses (33%) para 6 meses (8%) no grupo HA 2 (p<0,05). Entre os grupos houve diferença significativa, onde o grupo HA1 apresentou menor área de biomaterial que o HA2 (p<0,05) com 3 meses após a implantação (Figura 5.31 e Tabelas 5.17 e 5.18).



Figura 5.31 – Percentual de área de biomaterial encontrado no defeito ósseo tratado com HA1 e HA2, ao longo dos períodos experimentais. Nesta figura o grupo coágulo não é aparente visto não ter biomaterial.

Tabela 5.17 - **Efeito do tempo no biomaterial** – Determinação da porcentagem de biomaterial. Análise de dados pelos testes Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn (Instat, GraphPad Inc.) dos grupos experimentais (HA1 e HA2) em função dos períodos experimentais (1, 3, 6, 9 meses)

Comparação	Valor de p
HA1-1 x HA1-3	ns
HA1-1 x HA1-6	ns
HA1-1 x HA1-9	<0,05
HA1-3 x HA1-6	ns
HA1-3 x HA1-9	ns
HA1-6 x HA1-9	<0,01
HA2-1 x HA2-3	ns
HA2-1 x HA2-6	ns
HA2-1 x HA2-9	ns
HA2-3 x HA2-6	<0,05
HA2-3 x HA2-9	ns
HA2-6 x HA2-9	ns

Tabela 5.18 - **Efeito do tratamento no biomaterial** – Determinação da porcentagem de biomaterial. Análise de dados pelo teste de Mann Whitney (Instat, GraphPad Inc.) dos grupos experimentais (HA1 e HA2) em função dos períodos experimentais (1, 3, 6, 9 meses)

Comparação	Valor de p
HA1-1 x HA2-1	ns
HA1-3 x HA2-3	<0,05
HA1-6 x HA2-6	ns
HA1-9 x HA2-9	ns

6. DISCUSSÃO

A reparação de extensos defeitos ósseos é, ainda, um dos maiores desafios para as áreas de cirurgia odontológica e médica. Deste modo, é de grande importância o aprimoramento de meios que auxiliem o organismo na regeneração óssea no local. A terapia cirúrgica utilizando biomateriais de preenchimento é um dos procedimentos que tem proporcionado resultados satisfatórios na regeneração óssea em alguns tipos de defeitos (PROUSSAEFS et al., 2002). A despeito do grande número de biomateriais osteosubstitutos disponíveis no mercado, o biomaterial ideal., aliando simultaneamente propriedades mecânicas e biológicas que favoreçam o reparo, ainda não foi produzido (CONZ et al., 2005).

Parece evidente que é necessária a compreensão mais detalhada dos eventos moleculares e celulares envolvidos na resposta a biomateriais para implante ósseo. Analisar quantitativamente o efeito desses biomateriais na angiogênese e no recrutamento de células infamatórias é um passo essencial, pois é o processo inflamatório, viabilizado pelos vasos sanguíneos, que irá definir a evolução do reparo para a cicatrização ou regeneração.

Segundo a FDA (Food and Drugs Administration), os requisitos para um material ser considerado biocompatível são: não deve ser tóxico, cancerígeno ou antigênico, não mutagênico e o biomaterial não deve interferir com a cicatrização dos tecidos que foram lesionados durante o ato cirúrgico (HELMUS e TWEDEN, 1995).

A hipótese positiva deste estudo era que as diferenças físico-químicas (em especial a diferença de cristalinidade) das duas hidroxiapatitas afetassem a resposta tecidual nos itens citados acima.

6.1 – Modelo experimental utilizado

Deve-se evidenciar que modelos animais têm sido utilizados, por várias décadas, em experimentos para testes de medicamentos, materiais cirúrgicos e técnicas de tratamentos. Usamos um modelo animal criado em condições laboratoriais totalmente padronizadas, seguindo condições éticas pré-estabelecidas. Entretanto, os resultados obtidos em modelo animais devem ser analisados com cautela, visto que não podem ser extrapolados diretamente para os humanos e deve-se salientar que animais de laboratório de pequeno porte apresentam maior capacidade regenerativa óssea do que humanos.
Muitos fatores devem ser levados em consideração na avaliação de estudos *in vivo*, como a quantidade e qualidade de osso formado num defeito ósseo, pois são influenciadas pela espécie e o tipo de animal utilizado no experimento, sua idade, a estabilidade do defeito, localização anatômica do defeito, tipo de osso, presença ou ausência de periósteo e da dura-máter (TAGA, 2004). A espécie *Rattus norvegicus*, avaliada neste estudo, é muito utilizada em pesquisas e aceita na comunidade científica (BOHNING et al., 1999).

A região anatômica escolhida para a confecção do defeito foi a calvária. A utilização da calvária para a realização de defeito de tamanho crítico deveu-se a sua pobre vascularização e relativa deficiência de medula óssea com relação a outros ossos. Na díploe da calvária do rato a presença do osso esponjoso entre as corticais é muito discreta. Além disso, embriológica e morfologicamente, a calvária desenvolve-se por ossificação intramembranosa, à semelhança dos ossos membranosos da face. Anatomicamente a calvária consiste de duas tábuas corticais que delimitam a região medular central., semelhante ao osso alveolar. Segundo DUPOIRIEUX et al. (2001) e SCHMITZ e HOLLINGER (1986), devido às características acima citadas, a calvária é o local de eleição para testes de biomateriais e de estudo de regeneração óssea guiada.

O defeito ósseo de tamanho crítico é definido como um defeito cujas dimensões não permitem a regeneração espontânea do tecido ósseo durante o tempo de vida do animal, a não ser que algum tipo de material osteogênico, osteoindutor ou osteocondutor seja colocado dentro ou sobre este defeito. Tais defeitos, quando não tratados, são reparados por tecido conjuntivo fibroso, embora possa ocorrer alguma neoformação óssea nas margens do defeito (DUPOIRIEUX et al., 2001, FERREIRA et al., 2004, SCHMITZ e HOLLINGER, 1986 e TAGA et al., 2000).

O defeito de tamanho crítico em calvária aqui usado, atendeu aos requisitos descritos por BOSCH et al. (1998) para testes de regeneração óssea, ou seja: a) o tamanho mínimo do defeito ósseo experimental não deve ser menor do que o defeito crítico ósseo, individualizado para a espécie; b) o sítio de implantação deve incluir preferencialmente osso cortical e medular; c) o defeito deve ser estável; d) o risco de fratura deve ser mínimo; e) o modelo animal deve permitir fácil acesso às análises radiográfica e histológica.

Contudo, na literatura há discordância quanto ao tamanho crítico dos defeitos em calvária de ratos. BOSCH et al. (1998), SANDBERG et al. (1993) e MARDAS et al. (2002) consideraram crítico defeitos de 5 mm de diâmetro. Já para DUPOIRIEUX et al. (2001) são defeitos de 6 mm e para DAHLIN et al. (1991) defeitos de 8 mm.

Devido às estas considerações, na presente pesquisa foram utilizadas trefinas cirúrgicas com 8mm de diâmetro interno, permitindo a confecção de um defeito final com 8,5 mm de diâmetro.

Outro fator discutido na literatura é a localização de defeito na calvária. Foi realizado o defeito na região frontoparietal da calvária por vários fatores, como: a não interferência da musculatura da orelha; a disponibilidade de grande área óssea e a grande facilidade para o manejo e realização do defeito.

Apesar do acima exposto, convém salientar que existem pesquisadores que contra-indicam esta localização, devido ao risco de lesar durante a cirurgia a estrutura anatômica vascular existente abaixo da sutura sagital., e de introduzir o tecido conjuntivo proveniente da sutura na avaliação da regeneração óssea (BOSCH et al.,1998). Estes pesquisadores preconizam a realização de defeitos bilaterais em cada animal., o que permitiria uma análise pareada entre o defeito controle e o teste. De acordo com vários pesquisadores (DAHLIN et al., 1991; KOSTOPOULOS e KARRING, 2000; MARDAS et al.,2002), é contra-indicado também esse procedimento porque defeitos bilaterais ficam muito próximos um do outro, podendo a reparação de um defeito interferir no defeito contralateral e até mesmo haver a intercomunicação entre os defeitos por reabsorção da fina parede divisória e, conseqüentemente, a transformação em um único grande defeito, afetando os resultados do experimento.

O tipo de incisão usada na calvária é também um aspecto de discussão, já que deve: facilitar a visão do leito cirúrgico, gerar um retalho de fácil manejo, manter o periósteo íntegro, conter o material em experimentação no local e facilitar a sutura. Nos trabalhos de BOHNING et al., 1999; BOSCH et al., 1998 e DUPOIRIEUX et al., 2001 foi utilizada a incisão sobre a sutura sagital. Contudo, acreditou-se que esse tipo de incisão seja contra-indicado, uma vez que a coaptação do retalho e do periósteo, dividido no meio pela incisão, fica no meio do defeito fazendo com que os dois processos de cicatrização, o do tegumento e o do osso, fiquem sobrepostos, possibilitando a interferência entre ambos e o desvirtuamento do processo de regeneração óssea. Também pode ocorrer, neste tipo de incisão, que a sutura seja realizada de forma inadequada, promova a deslocamento do material ou pode ocorrer ainda a deiscência, o que provocaria a exposição do material, com instalação de um processo infeccioso e, conseqüentemente, alteração no resultado final do reparo. (JOVANOVIC et al., 1992; LEKOVIC et al., 1998; MURPHY, 1995; NOWZARI e SLOTS, 1995; WANG e CAROLL, 2001). Devido a estas considerações, optou-se por realizar uma incisão em meia-lua (SCHLIEPHAKE et al., 2004), deixando o retalho e o

periósteo íntegro sobre o defeito, fazendo com que a sutura fique a uma distância segura, sem a possibilidade de deslocamento do material em experimentação.

6.2 – Análise histológica da resposta biológica

Atualmente o implante ósseo mais utilizado na prática cirúrgica odontológica e médica é o osso autógeno que preenche o defeito proporcionando estabilidade, além de agir como um arcabouço para a neoformação óssea, sendo absorvido de maneira gradual e vascularizado à medida que novo osso é sintetizado (YOUNG et al., 1999). Contudo, a dificuldade em se conseguir o osso suficiente e a morbidade causada por este procedimento estimulou a busca de novas alternativas (BAUER e MUSCHLER, 2000; CARVALHO, 2004, SERVICE, 2000, TAKAMORI et al 2007).

O reparo ósseo envolve a quimiotaxia e adesão de células tronco à matriz óssea desmineralizada, seguida de proliferação de células osteoprogenitoras, diferenciação de condroblastos e osteoblastos e a formação de cartilagem, osso e medula óssea hematopoiética. É cada vez mais evidente que uma ampla variedade de proteínas regulatórias governe a biologia celular e molecular da osteogênese (HAUSCHKA et al., 1986; REDDI, 1981, SPORN e ROBERTS, 1989). Dentre essas proteínas destaque especial deve ser dado às proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), encontradas nos tecidos mineralizados e que são liberadas durante a reabsorção (LIMA et al., 2007, URIST, 1965; URIST et al., 1984; WOZNEY et al., 1988), induzindo a formação de novo osso, tornando os fenômenos de reabsorção e aposição acoplados (RODAN, 1991, RODAN, 1992).

O desenvolvimento de substitutos ósseos decorre da limitação em qualidade e quantidade de osso autógeno, impossibilidade de prever o grau de reabsorção do enxerto e à grande morbidade. Dentre os diversos materiais existentes e em estudo, implantes ósseos aloplásticos, como as HA, têm sido avaliadas (BODEN, 2002). Elas são disponíveis em diversas formas e características físico-químicas, densas ou porosas e com propriedades osteocondutoras.

É sabido que, para que haja crescimento de tecido ósseo, existe a necessidade de preenchimento do defeito com coágulo sanguíneo, permitindo o seu íntimo contato com tecido vivo das paredes do defeito e, conseqüentemente, com células osteoprogenitoras e osteoblastos preservados (MARKS e ODGREN, 2002). Assim foi escolhido o grupo coágulo como controle e, em todos os outros grupos experimentais, os biomateriais foram misturados ao sangue do próprio animal.

Desta forma, a fim de confirmar ou rejeitar a hipótese inicial deve-se determinar a quantidade de células inflamatórias, densidade de microvasos, células em proliferação e áreas de tecido conjuntivo, osso e biomaterial em função dos tratamentos utilizados (efeito do tratamento) e do tempo. Como é requisito fundamental a comparação entre grupos e períodos, a análise quantitativa e a aplicação de testes estatísticos são essenciais para a identificação, ou não, de diferenças provocadas pelos biomateriais ou pelo tempo de reparo. Neste contexto, o grupo que recebeu apenas coágulo atua como controle negativo, ou seja, não haverá reação inflamatória, aumento na densidade de microvasos ou proliferação celular estimulados pelo biomaterial no defeito, apenas a reação tecidual e cicatrização induzida pela realização do defeito ósseo. (URIST et al., 1984).

A análise histomorfométrica dos vasos sanguíneos e das células presentes no tecido conjuntivo da área do defeito (polimorfonucleares, mastócitos, macrófagos e células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho) foi realizada por meio de identificação morfológica. A escolha desta forma de análise se deve à complexidade estrutural., dimensional e da coloração destas estruturas (tanto entre, quanto dentro, das classes celulares), a qual dificulta a automatização de sua identificação. Além disto, nem todas as estruturas que foram analisadas são claramente distinguíveis do fundo e não tem uma escala de intensidade de cor diferente de outras estruturas da imagem (instruções sobre o programa Image Pro® no site <u>www.mediacy.com</u>, acessado em julho de 2007).

Contudo, a avaliação da proliferação celular pode ser automatizada por meio da segmentação de imagem em função do corante utilizado na imunohistoquímica para o anti-PCNA (LU et al., 2006). Com esta possibilidade comparou-se a área marcada nos diferentes grupos. É importante destacar que esse procedimento pode conter viés, uma vez que existem variáveis na técnica da imunohistoquímica que podem influenciar na intensidade da coloração obtida, bem como na coloração de fundo ("background") alterando assim os resultados.

Outro fator importante refere-se à análise estatística. Como os dados obtidos apresentaram diferença significativa entre os desvios padrões, esses foram analisados estatisticamente por testes não paramétricos. Desta forma as pequenas diferenças observadas, ou não, não são explicitadas. Cabe ressaltar que no sistema biológico diferenças da ordem de 10-15% podem não ser significativas do ponto de vista do reparo em defeitos críticos.

Foram encontradas raras células polimorfonucleares e estas observadas quase que exclusivamente próximos aos vasos sanguíneos (visto que entram no tecido conjuntivo passando entre as suas células endoteliais), não ao redor de osso ou biomateriais e raramente dispersos no tecido conjuntivo (Figura 5.3 e 5.4). Houve tendência de diminuição na incidência de células polimorfonucleares com o tempo (Figura 5.18).

Os mastócitos são conhecidos como mediadores da resposta infamatória aos biomateriais implantados, contribuindo significantemente na determinação da extensão e no grau do desenvolvimento da reação de corpo estranho, pois exercem importante papel no recrutamento de células fagocitárias, incluindo macrófagos, para o local da implantação do biomaterial (TANG et al., 1998). Neste estudo foram encontrados mastócitos dispersos no tecido conjuntivo dos 3 grupos experimentais (Figura 5.6, 5.7, 5.8) e houve tendência de diminuição na incidência de mastócitos com o tempo (Figura 5.20).

No início do reparo do defeito é esperada a presença de células inflamatórias, mesmo no grupo controle, devido ao trauma cirúrgico (ANDERSON et al., 2007) A presença de macrófagos é característica da inflamação crônica e a maior concentração desta resposta se encontra no local periférico ao implante. No presente estudo esteve mais marcante ao redor dos biomateriais (Figura 5.7, 5.8) e esporadicamente foram encontrados dispersos no tecido conjuntivo. No primeiro trimestre do reparo, os dados sugerem que nos grupos com HA o material de maior cristalinidade recrutou mais macrófagos que o de menor cristalinidade, pois este último tem uma cristalinidade semelhante ao do osso, em torno de 20 a 30 % (Figura 5.21). Após este período houve considerável redução na quantidade de macrófagos dentro dos 3 diferentes grupos.

A existência de células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho entre os grupos experimentais está relacionada à presença dos biomateriais no defeito, visto ser uma célula que faz a segregação e digestão de corpos estranhos. É a única célula que não é encontrada no grupo controle. Apresenta-se marcantemente nas regiões adjacentes e em contato direto com os grânulos de hidroxiapatitas (Figura 6.1). Como os macrófagos aderidos na superfície do biomaterial se fundem para formar as células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho, algumas destas células também foram marcadas com anti-lisozima (utilizado como marcador de macrófagos).



Figura 6.1– Corte corado com Hematoxilina Eosina no período de 9 meses com HA 2. Observar a presença de células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho em torno do biomaterial (setas vermelhas).

O início da angiogênese é essencial para o desenvolvimento adequado do osso, visto que o sucesso do implante ósseo depende da vascularização prematura (MISCH, 2006). A angiogênese é definida como o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir da proliferação de células endoteliais de estruturas vasculares pré-existentes (FREITAS et al., 2005, STETLER-STEVENSON, 1999). Os vasos sanguíneos provenientes do osso que penetram no biomaterial fornecem células perivasculares pluripotentes (os pericitos), que são capazes de se diferenciar em osteoblastos (GARTNER e HIATT, 2002, LINDHE et al.,2005, MISCH, 2006, MURAMATSU e BISHOP, 2002).

A contagem dos vasos foi feita sabendo-se que estava contando uma estrutura com arranjo tridimensional., que recebeu cortes e mostrou assim informações bidimensionais. Por isto foram contados os microvasos cujos menores calibres de luz possuíam 50 µm (MANDARIN-DE-LACERDA, 2003).

A HA de mais alta cristalinidade estimulou o maior surgimento de vasos no início do reparo, o que pode ter sido fundamental para o conseqüente aumento na presença de células polimorfonucleares, mastócitos, macrófagos e células em proliferação, todos no período experimental de um mês (Figura 5.4).

A densidade de microvasos foi observada de forma difusa em todo o tecido conjuntivo e foram computados apenas os vasos com a luz de no máximo 50 μ m, pois estes são aqueles recentemente formados (GUTTMAN et al., 2004). Porém, com o passar do tempo os vasos se apresentaram de maior calibre e houve uma tendência de diminuição de sua densidade nos grupos com biomaterial e de aumento no grupo controle.

Foram avaliadas todas as células que proliferaram, não só as inflamatórias. A proliferação celular se mostra mais exacerbada nas áreas próximas ao implante (Figura 6.2), sugerindo células inflamatórias englobando as partículas de HA e em menor intensidade próximo aos bordos ósseos (Figura 6.3), sugerindo células de neoformação óssea (osteoblastos) o que corrobora com os resultados de CONZ (2006). No grupo controle, as células em proliferação se apresentaram em menor intensidade do que nos grupos com biomateriais e estavam presentes de forma dispersa em todo o defeito sugerindo células inflamatórias e fibroblastos. Em todos os grupos foram observadas tendências de diminuição ao longo dos períodos experimentais.



Figura 6.2: Tela do programa Image-Pro Plus ® mostrando a segmentação da imagem fotográfica do corte marcado com anti-PCNA, onde foi feito o cálculo da área em mm² ocupada pelas células em proliferação. Uma das regiões predominantes de marcação foi próxima ao biomaterial.



Figura 6.3: Tela do programa Image-Pro Plus ® mostrando a segmentação da imagem fotográfica do corte marcado com anti-PCNA, onde foi feito o cálculo da área em mm² ocupada pelas células em proliferação. Uma das regiões predominantes de marcação foi próxima ao osso e esporadicamente, dentro do tecido conjuntivo.

No tecido conjuntivo, com a evolução dos períodos experimentais foi observada uma diminuição do número de células e conseqüente maior presença de fibras, indicando o início do fibrosamento, em especial ao redor das partículas de biomaterial (Figura 5.12C).

O tecido conjuntivo fibroso é separado do biomaterial por uma camada de macrófagos e/ou células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho.

Nos grupos com biomaterial houve um aumento significativo com o tempo, da área de tecido conjuntivo (Figura 5.29), o que pode ser atribuído à equivalente diminuição (provavelmente por remodelamento) da área de tecido ósseo (Figura 5.30). No grupo controle houve uma tendência de aumento tanto do tecido conjuntivo como ósseo.

Freqüentemente foi observada a presença de osteoblastos de recobrimento em contato com o tecido ósseo neoformado (Figura 5.9A).

A análise dos resultados obtidos para todos os grupos mostrou que não houve a completa reparação do defeito por tecido ósseo ao longo dos períodos experimentais. O fechamento completo do defeito não ocorreu, provavelmente, pela proliferação fibroblástica e fibrosamento de parte da lesão

A formação óssea observada no grupo controle restringiu-se à borda da lesão. Microscopicamente, a quantidade de tecido ósseo foi pequena, restrita a borda do defeito, enquanto que o restante do defeito estava ocupado por tecido conjuntivo fibroso. Estes dados confirmam que o defeito ósseo criado era efetivamente de tamanho crítico, ideal para se avaliar a eficiência prática de biomateriais (BOSCH et al.,1998).

Nos grupos com biomaterial ocorreu a formação de novo osso próximo das bordas dos defeitos, envolvendo as partículas e como pequenas ilhotas no tecido conjuntivo, estando estas últimas presentes a partir do 6º mês. Houve osteogênese até o 6º mês e depois ocorreu remodelamento ósseo. A formação óssea ao redor das partículas de HA ocorreu apenas na interface da cápsula fibrosa.

Há de se levar em consideração que a presença de tecido ósseo e fibrosamento ao redor dos grânulos concorrem para uma maior estabilização do tecido de cicatrização.

Embora estivessem presentes células capazes de promover absorção do material ao redor das partículas de HA, não foram observados aspectos morfológicos que indicassem a diminuição dos biomateriais ao longo dos períodos experimentais. Foi observado aumento da área de biomaterial (Tabela 5.17), provavelmente por ter havido diferença da quantidade de biomaterial implantado no ato cirúrgico, mesmo com toda padronização da técnica.

Segundo PROUSSAFS et al. (2002) a HA é um material para implante biocompatível, porém ele não é absorvível.

6.3 – Reparo tecidual

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma importante família de endopeptidases metalo dependentes e representam a maior classe de enzimas responsáveis pela degradação ou absorção de todos os componentes da MEC (matriz extracelular). (MENDONÇA et al., 2005, SOUZA e LINE, 2002). A degradação da MEC é essencial para o desenvolvimento embriogênico, morfogênico, reprodução, remodelamento e absorção tecidual., densidade de microvasos e tumores invasivos (NAGASE e WOESSNER, 1999). As MMPs também funcionam promovendo a angiogênese pela regulação da adesão celular endotelial., proliferação, migração e crescimento, tanto diretamente ou por liberação de fatores de crescimento seqüestrados da matriz extracelular (STETLER-STEVENSON, 1999). As MMPs são expressas por células inflamatórias como monócitos, macrófagos, linfócitos, células polimorfonucleares e por células locais como fibroblastos, células epiteliais, endoteliais, osteoblastos e osteócitos (MENDONÇA et al., 2005, SOUZA e LINE, 2002). Portanto, se faz necessária a presença de infiltrado inflamatório para haver a degradação da MEC e estímulo para o desenvolvimento de microvasos.

As observações histopatológicas confirmaram a avaliação clínica dos animais no pós-operatório, não sendo observado qualquer sinal clínico negativo como supuração (CONZ, 2006). Em conjunto, as observações clínicas e microscópicas permitem concluir que os grânulos de hidroxiapatitas utilizados neste estudo são biocompatíveis, como esperado para hidroxiapatitas sintéticas (MURUGAN e RAMAKRISHNA, 2005).

Segundo ANDERSON et al. (2007), reações do hospedeiro decorrentes da implantação do biomaterial incluem: trauma, interações entre o material e o sangue, formação da matriz provisória, inflamação aguda, inflamação crônica, desenvolvimento de tecido de granulação, reação de corpo estranho e desenvolvimento de cápsula fibrosa, portanto as HAs estudadas apresentaram resposta celular esperada e descrita na literatura.

Os resultados da maioria dos itens analisados tendem a diminuir com o tempo, indicando que as diferentes propriedades físico-químicas das HAs não afetaram a reação inflamatória, densidade de microvasos e proliferação celular nos grupos experimentais em comparação ao grupo controle, sendo o material enxertado inócuo ao tecido hospedeiro, reforçando a potencial aplicação dos mesmos em terapias de perdas ósseas

Os biomateriais analisados nesse trabalho mostraram-se biocompatíveis por não se mostrarem agressivos ao hospedeiro. A presença dos grânulos de HA no tecido cicatrizado indica a sua utilização em procedimentos de reparo ósseo, onde esses biomateriais remanescentes fazem parte da "massa óssea" da região enxertada (MEIJNDERT et al., 2005), sendo indicados para preenchimento de alvéolos dentários após extração, permitindo a manutenção do contorno do tecido mucoso, para posterior instalação de implantes osseointegrados, (MAIORANA et al., 2005, MEIJNDERT et al., 2005; NORTON et al., 2003) ou também aplicados em levantamentos de seio maxilar associados ou não à instalação de implantes (ARTZI et al., 2004, FUGAZZOTTO e VLASSIS, 1998, HANISCH et al., 1999, VALENTINI e ABENSUR, 2003, WALLACE et al. 2006). Sendo assim, a indicação de sua utilização está relacionada à morfologia e extensão do defeito e o tipo de reparo desejado, tendo como principal objetivo o restabelecimento da forma e função, devolvendo ou possibilitando a melhoria da qualidade de vida e saúde dos pacientes.

7. CONCLUSÃO

- As duas hidroxiapatitas utilizadas como implantes ósseos apresentaram-se biocompatíveis, pois não estimularam o recrutamento de células inflamatórias, a densidade de microvasos foi similar em todos os grupos, assim como a proliferação celular.

- Não houve fechamento completo do defeito ósseo em qualquer dos grupos experimentais, pois os grânulos de hidroxiapatitas foram envolvidos por tecido conjuntivo fibroso com algumas áreas de ossificação.

- A utilização da técnica de imunohistoquímica foi de grande importância na análise da resposta tecidual.

- A hipótese inicial do estudo foi contestada posto que a cristalinidade distinta entre as duas hidroxiapatitas, não afetou de forma quantitativa a reação inflamatória, densidade de microvasos, células em proliferação ou as áreas de tecido conjuntivo, osso e biomaterial.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Aplicar a metodologia de análise a outros biomateriais de uso em implantes ósseos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AABOE, M. PINHOLT, E. M., HJORTING-HANSEN, E., 1995, "Healing of experimentally created defects: a review", *Br. J. Oral. Maxillofac. Surg.*, v.33, n.5, pp.312-318.

AABOE, M., SCHOU, S., HJORTING-HANSEN, E. et al., 2000, "Osseointegration of subperiosteal implants using bovine bone substitute and various membranes". *Clin. Oral.Implants Res.*, v.11, n.1, pp.51-58.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS J. et al., 2004, *Biologia molecular da célula*, 4^a. ed, Porto Alegre, Artmed.

ALLEN, P.M., STRYDOM, D.U, UNANUE, E.R., 1984, "Processing of lysozyme by macrophages: identification of the determinant recognized by two T-cell hibridomas", *Proc Natl Acad Sci*, v. 81, pp.2489-2493.

ALVES, V. A. F., BACCHI, C. E., VASSALLO, 1999, *Manual de Imunohistoquímica*, 1^a. ed, São Paulo, Sociedade Brasileira de Patologia.

AMADEI, S. U., SILVEIRA, V. A. S, PEREIRA, A. C., et al., 2006, "A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea", *J Bras Patol Med Lab*, v. 42, n. 1, PP. 5-12.

ANDERSON, J.M, 2000, "Multinucleated giant cells", *Curr Opin Hematol*, v.7, n. 1, pp. 40-47.

ANDERSON, J.M., 2001, "Biological responses to materials", *Annu Rev Mater Res*, v. 31, pp. 81-110.

ANDERSON, J.M., RODRIGUEZ, A., CHANG, D.T., 2007, "Foreign body reaction to biomaterials", *Semin. Immunol*.doi:10.1016/j.smim.2007.11.004.

AOKI, H., 1994, *Medical applications of hydroxyapatite*, 1a. ed., Tokyo, Takayama Press System Center Co., Inc.

ARAÚJO, M.G., SONOHARA, M., HAYACIBARA, R et al., 2002, "Lateral ridge augmentation by the use of grafts comprised of autologous bone or a biomaterial. An experiment in the dog", *J Clin Periodontol*, v. 29, pp.1122-1131.

ARTZI, Z., 2000, "Coronal ridge augmentation in the absence of bilateral bony plates around a pathologically denuded implant surface", *Int. J. Periodon. Res. Dent.*, v.20, n.2, pp.191-197.

ARTZI, Z., WEINREB, M., GIVOL, N et al., 2004, "Biomaterial resorption rate and healing site morphology of inorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate in the canine: a 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis". *The international journal of oral & maxillofacial implants*; v.19, pp.357-368.

BALASUNDARAM, G., SATO, M., WEBSTER, T. J., 2006, "Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD", *Biomaterials*, v.27, pp. 2798-2805.

BAUER, T. W., MUSCHLER, G. F., 2000, "Bone graft materials: an overview of the basic science", *Clin. Orthop. Relat. Res.*, v.371, pp.10-27.

BECKER, W., 2000, "Treatment of small defects adjacent to oral implants with various biomaterials", *Periodontology*, v. 33, pp. 26-35.

BISHOP, J.L., BOYLE, E.C., FINLAY, B.B, 2007, "Deception point: Peptidoglycan modification as a means of immune evasion", *PNAS*, v.104, n.3, pp.691-692.

BLANK, B. S., LEVY, A. R., 1999, "Combinated treatment of a large periodontal defect using GTR and DFDBA", *Int. J. Periodontics Restorative Dent.* v.19, n.5, pp.481-487.

BODEN, S. D, 2002, "Overview of the biology of lumbar spine fusion and principles for selecting a bone graft substitute", *Spine*, v. 27, n. 165, pp. 526-531.

BOSCH, C, MELSEN, B., VARGERVIK, K., 1998, "Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials", *J. Craniofac. Surg.*, v.9, n.4, pp. 310-316.

BOHNING, B. P. DAVENPORT, W. JEANSONNE, B., 1999, "The effect of guided tissue regeneration on the healing of osseous defects in rat calvaria". *J. Endod.*, v.25, n.2, pp.81-84.

BONACHELLA, W. C., MOLO, Jr. F. A., TAGA, E. M. et al., 1992, "Manutenção do rebordo alveolar com hidroxiapatita microgranular". *Revista Gaúcha de Odontologia*, v.40, n.3, pp.212-214.

BOYNE, P. J., 1971, "Transplantation, implantation and grafts", *Dent Clin North Am.*, v.15, n.2, pp. 433-543.

BRAZ, F., RAHAL., S.C., ROCHA, N. S. et al., 2003, "Emprego de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita no reparo de defeito induzido em crânio de ratos", *Acta Cir. Bras.*, v. 18, n. 1, pp. 19-24.

BRODBECK, W. G., SHIVE, M. S., COLTON, E. et al., 2001, "Influence of biomaterial surface chemistry on the apoptosis of adherent cells", *J Biomed Mater Res*, v. 55, n. 4, pp. 661-668.

BRODBECK, W.G., COLTON, E., ANDERSON, J.M., 2003, "Effects of adsorbed heat labile serum proteins and fibrinogen on adhesion and apoptosis of monocytes/macrophages on biomaterials", *J Mater Sci Mater Med*, v. 14, n. 8, pp 671-675.

BUNYARATAVEJ, P., WANG, H.L., 2001, "Collagen membrane: a review". J. Periodontol., v.72, n.2, pp.215-229.

BURG, K. J. L., PORTER, S., KELLAN, J. F., 2000, "Biomaterial developments for bone tissue engineering". *Biomaterials*, v. 21, pp. 2347-2359.

BURSTEIN, F. D., COHEN, S. R., HUDGINS, R et al., 1997, "The use of porous granular hydroxyapatite in secondary orbitocranial reconstruction", *Plast. Reconstr. Surg.*, v.100, n.4, pp.869-784.

CAMPBELL, D. J., KIM, C. J., BUTCHER, E. C., 2003, "Chemokines in the systemic organization of immunity", *Immunol Rev*, v. 195, pp. 58-71.

CARTUN, R. W., PEDERSEN, C. A., 1989, "An immunocytochemical technique offering increased sensitivity and lowered cost with a streptavidin-horseadish peroxidase conjugate", *J Histotechnol*, v.12, pp. 273.

CARVALHO, P. S. P., BASSI, A. P. F. PEREIRA, L. A. V. D., 2004, "Revisão e proposta de nomeclatura para os biomateriais", *Implant news*, v. 1, n. 3, pp. 255-259.

CIANI, R. B., RAHAL., S. C, VOLPI, R. S et al., 2006, "Mistura de proteínas morfogenéticas ósseas, hidroxiapatita, osso inorgânico e colágeno envolta por membrana de pericárdio no preenchimento de defeito ósseo segmentar em coelhos", *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 58, n. 1, pp. 59-67.

CONZ, M.B., 2006, Análise histomorfométrica do reparo de defeito crítico na calvária de ratos tratados com grânulos de hidroxiapatita com diferentes características físicoquímicas. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

CONZ, M. B., GRANJEIRO, J. M., SOARES, G. A., 2005, "Physicochemical characterization of six commercial hydroxyapatites for medical-dental applications as bone graft", J. *Appl Oral. Sci.*, v. 13, n. 2, pp. 136-140.

DAHLIN, C., ALBERIUS, P., LINDE, A., 1991, "Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique", *J. Neurosurg.*, v.74, n.3, pp.487-491.

DAMSKY, C. H., ILIC, D., 2002, "Integrin signaling: it's where the action is", *Curr Opin Cell Biol*, v. 14, n. 5, pp. 594-602.

DE GROOT, K., 1980, "Bioceramics consisting of calcium phosphate salts", *Biomaterials*, v.1, n.1, pp.47-50.

DELON, I., BROWN, N. H., 2007, "Integrins and the actin cytoskeleton", *Curr Opin Cell Biol*, v. 19, n. 1, pp. 43-50.

DOROZHKIN, S. V., 2007, "Calcium orthophosphates", *J Mater Sci*, v. 42, pp. 1061-1095.

DUCHEYNE, P., QIU, Q., 1999, "Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function", *Biomaterials*, v. 20, pp.2287-2303.

DUPOIRIEUX, L., POURQUIER, D., PICOT, M.C et al., 2001, "Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects", *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.30, pp.58-62.

ESCHE, C., STELLATO, C, BECK, L. A., 2005, "Chemokines: key players in innate and adaptive immunity", *J Invest Dermatol*, v. 125, n. 4, pp. 615-628.

FERREIRA, G. R., TANIA, M. C., GRANJEIRO, J. M. et al., 2004, "Lack of repair of rat skull critical size defect treated with bovine morphometric protein bound to microgranular bioabsorbable hydroxyapatite". *Brazilian Dental Journal.*, v.15, n.3, pp. 1-11.

FRANCISCO, J.S., 2003, *Manual de Aplicação do Image-Pro*, Pós Graduação em Patologia Bucodental., UFF, Niterói, RJ, Brasil.

FREITAS, T.M.C, MIGUEL, M.C.C., SILVEIRA, E.J.D et al., 2005, "Assessment of angiogenic markers in oral hemangiomas and pyogenic granulomas", *Experimental and molecular pathology*, v. 79, pp. 79-85.

FUGAZZOTTO, P., VLASSIS, J. 1998, "Long-term success of sinus augmentation using various approaches and grafting materials". *Int. Journal of oral and maxillofacial implants*, v.13, pp. 52-58.

FUJITA, R., YOKOYAMA, A., NODASAKA, Y. et al., 2003, "Ultrastructure of ceramic-bone interface using hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate ceramics and replacement mechanism of β -tricalcium phosphate in bone", *Tissue & Cell*, v. 35, pp. 427-440.

FUJIWARA, N., KOBAYASHI, K, 2005, "Macrophages in inflammation", *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, v. 4, n. 3, pp. 281-286.

GALLI, J. S., 1993, "New concepts about the mast cell", *New Engl J Med*, v. 328, pp. 257-264.

GARTNER, L.P, HIATT, J.L., 2002, *Atlas colorido de Histologia*, 3^a ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara-Koogan.

GE, Z., BAGUENARD, S., LIM, L. Y et al., 2004, "Hydroxyapatite-chitin materials as potential tissue engineered bone substitutes", *Biomaterials*, v. 25, pp.1049-1058.

GERARD, C., ROLLINS, B. J., 2001, "Chemokines and disease", *Nat Immunol*, v. 2, n. 2, pp. 108-115

GIANCOTTI, F. G., RUOSLAHTI, E., 1999, "Integrin signaling", *Science*, v. 285, n. 5430, pp. 1028-1032.

GORBET, M. B., SEFTON, M. V., 2004, "Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes", *Biomaterials*, v. 25, n. 26, pp. 5681-5703.

GRANJEIRO, J. M. TAGA, E. M., FONSECA, M. et al., 1992, "Hidroxiapatita para uso clínico". *Rev. Gaúcha Odontol.*, v.40, n.2, pp.130-134.

GRATCHEV, A., GUILLOT, P., HAKIY, N. et al., 2001, "Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracelular matrix protein beta IG-H3", *Scand J Immunol*, v. 53, n. 4, pp. 386-392.

GRETZER, C., EMANUELSSON, L., LILJENSTEN, E., et al., 2006, "The inflammatory cell influx and cytokines changes during transition from acute inflammation to fibrous repair around implanted materials", *J Biomater Polym*, v. 17, n. 6, pp. 669-687.

GUTTMAN, D, STERN, Y., SHPITZER, T et al., 2004, "Expression of MMP-9, TIMP-1, CD-34 and factor-8 as prognostic markers for squamous cell carcinoma of the tongue", *Oral Oncology*, v. 40, pp. 798-803.

HANISCH, O., LOZADA, J., HOLMES, E et al., 1999, "Maxillary sinus augmentation prior to placement of endosseous implants: A histomorphometric analysis." *Int. Journal of oral and maxillofacial implants*, v.14, pp. 329-336.

HAAS, A., 2007, "The phagosome: compartment with a license to kill", *Traffic*, v. 8, n. 4, pp. 311-330.

HAUSCHKA, P. V. MAVRAKOS, A. E., IAFRATI, M. D et al., 1986, "Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose", *J. Biol. Chem.*, v.261, pp.12665-12674.

HELMUS, M. N., TWEDEN, K., 1995, "Materials Selection". *In: Encyclopedic Handbook of biomaterials and bioengineering*, part A, v. 1, pp. 27-59.

HELMING, L, GORDON, S, 2007, "Macrophage fusion induced by IL-4 alternative activation is a multistage process involving multiple target molecules", *Eur J Immunol*, v. 37, n. 1, pp. 33-42.

HENCH, L.L., 1998, "Biomaterials: a forecast for the future", *Biomaterials*, v. 19, pp 1419-1423.

HERCULANI, P. P., CESTARI, T. M., TAGA, E. M. et al., 2000, "Tratamento de defeito ósseo perene em calvária de cobaia com membrana de cortical óssea bovina liofilizada associada ou não a enxerto ósseo bovino desmineralizado". *Rev. Bras. Implant*, v.7, n.2, pp.7-14.

HISLOP, W. S., FINLAY, P. M., MOOS, K. F., 1993, "A preliminary study into the uses of anorganic bone in oral and maxillofacial surgery". *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.31, p.149-153.

HU, W. J., EATON, J. W., UGOROVA, T. P et al., 2001, "Molecular basis of biomaterial-mediated foreign body reactions", *Blood*, v. 98, n. 4, pp. 1231-1238.

INDOVINA, A. Jr., BLOCK, M. S., 2002, "Comparison of 3 bone substitutes in canine extraction sites", *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.60, n.1, pp.53-58.

JENNEY, C.R., ANDERSON, J.J., 2000, "Adsorbed serum proteins responsible for surface dependent human macrophage behavior", *J Biomed Mater Res*, v. 49, n. 4, pp. 435-447.

JENNEY, C.R., ANDERSON, J.M., 2000, "Adsorbed IgG: a potent adhesive substrate for human macrophages", *J Biomed Mater Res*, v. 50, n. 3, pp. 281-290.

JONES, J. A., CHANG, D. T., MEYERSON, H. et al., 2007, "Proteomic analysis and quantification of cytokines and chemokines from biomaterial surface-adherent macrophages and foreign body giant cells", *J Biomed Mater Res*, v. 83, n. 3, pp. 585-596.

JOVANOVIC, S. A., SPIEKERMANN, H., RICHTER, E. J., 1992, "Bone regeneration around titanium dental implants in dehisced defect sites: a clinical study", *Int. J. oral Maxillofac. Implants*, v.7, n.2, pp.233-245.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J., 2004, *Histologia Básica*. 10^a. ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan.

KAMMERER, U., KAPP, M., GASSEL, A. M. et al., 2001, "A new rapid immunohistochemical staining technique using the envision antibody complex", *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 49, n. 5, pp. 623-630.

KARSENTY, G., 1999, "The genetic transformation of bone biology". *Genes Dev.*, v.13, n.23, pp.3037-3051.

KESELOWSKY, B. G., BRIDGES, A. W., BURNS, K.L. et al., 2007, "Role of plasma fibronectin in the foreign body response to biomaterials", *Biomaterials*, v. 28, n. 25, pp. 3626-3631.

KOSTOPOULOS, L., KARRING, T., 2000, "Regenerations of the sagittal suture by GTR and its impact on growth of the cranial vault", *J. Craniofac. Surg.*, v.11, n.6, pp.553-561.

KUPIETZKY, A., LEVI-SCHAFFER, F., 1996, "The role of mast cell derived histamine in the closure of an *in vitro* wound" *Inflamm Res*, v. 45, pp. 176-180.

LE GEROS, R. Z., 1991, "Calcium phosphates in oral biology and medicine". *Monographs in oral science*, v.15, pp.201.

LEKOVIC, V., CAMARGO, P. M., KLOKKEVOLD, P. R. et al., 1998, "Preservation of alveolar bone in extraction sockets using bioabsorbable membranes", *J. Periodontol.*, v.69, n.9, pp.1044-1049.

LEVI-SCHAFFER, F., RUBINCHIK, E., 1995, "Mast cell role in fibrotic diseases", *Isr J Med Sci*, v. 31, pp. 450-453.

LIMA, A. F. M., RAHAL., S. C., VOLPI, R. S. et al., 2007, "Effect of bovine bone morphogenetic proteins on radius fracture healing in rabbits", *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 22, n. 4, pp.260-265.

LINDHE, J., KARRING, T., LANG, N. P., 2005, *Tratado de periodontia clinica e implantologia oral.*, 4^a ed., Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan.

LIU, D.M., 1996, "Fabrication and characterization of porous hydroxyapatite granules", *Biomaterials*, v. 17, pp. 1955-1957.

LOPES, A.A.B., MAEDA, N.Y., BYDLOWSKI, S.P., 1998, "Fator von Willebrand e disfunção endotelial pulmonar. Implicações prognósticas", *Arq Bras Cardiol*, v.70, n.3, pp. 141-145.

LU, G., LIAO, J. YANG, G et al., 2006, "Inhibition of adenoma progression to adenocarcinoma in a 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis model in A/J mice by tea polyphenols and caffeine", *Cancer Res*, v. 66, n. 23 pp. 11494-11501.

LUTTIKHUIZEN, D.T., HARMSE, M.C., VAN LUYN, M.J., 2006, "Cellular and molecular dynamics in the foreign body reaction", *Tissue Eng*, n. 12, v. 7, pp. 1955-1970.

MAIORANA, C., BERETTA, M., SALINA, S. et al., 2005, "Reduction of autogenous bone graft resorption by means of bio-oss coverage: a prospective study", *Int. J. Periodontics Restorative Dent*, v. 25, pp.19-25.

MANDARIN-DE-LACERDA, C. A., 2003, "Stereological tools in biomedical research", *An Acad Bras Cienc*, v. 75, n. 4, pp. 469-486.

MANTOVANI, A., SICA, A., SOZZANI, S. et al., 2004, "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization", *Trends Immunol*, v. 25, n. 12, pp. 677-686.

MARDAS, N., KOSTOPOULOS, L., KARRING, T., 2002, "Bone and suture regeneration in calvarial defects by e-PTFE-membranes and demineralized bone matrix

and the impact on calvarial growth: an experimental study in the rat". *J. Craniofac. Surg.*, v.13, n.3, pp.453-462.

MARKS Jr, S. C., ODGREN, P. R., 2002, "Structure and development of the skeleton". In: Bilezikian, J. P.; Raisz, I. G.; Rodan, G. A. *Principles of bone biology*. 2^a Ed., San Diego, Academic Press, cap.1, p.3-15.

MARX, R. E., GARG, A. K., 1998, "Bone structure, metabolism and physiology: its impact on dental implantology". *Implant. Dent.*, v.7, n.4, pp.267-276.

MARTIN, P. LEIBOVICH, S. J., 2005, "Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly", *Trend Cell Biol*, v. 15, n. 11, pp. 599-607.

MARINS, L. V., CESTARI, T. M., SOTTOVIA, A. D., *et. al.*, 2004, "Radiographic and histological study of perennial bone defect repair in rat calvaria after treatment with blocks of porous bovine organic graft material", *J Appl Oral Sci*, v. 12, n. 1, pp. 62-69.

MASTERS, D.H., 1988, "Bone and bone substitutes" *Calif. Dent. Ass. J.*, v. 16, pp.56-65.

MASTROGIACOMO, M., SCAGLIONE, S., MARTINETTI, R. et al. 2006, "Role of scaffold internal structure on *in vivo* bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics". *Biomaterials*, v. 27, pp. 3230-3237.

MCSHEEHY, P. M., CHAMBERS, T. J., 1986, "Osteoblast-like cells in the presence of parathyroid hormone release soluble factors that simulates osteoclastic bone resorption", *Endocrinology*, v.119, pp.1654-1659

MEIJER, G. J., BRUIJN, J. D., KOOLE, R. et al., 2007, "Cell-based bone tissue engineering", *PloS Med*, v. 4, n. 2 pp. 260-264.

MEIJNDERT, L., RAGHOEBAR, G. M., SCHÜPBACH, P et al., 2005, "Bone quality at the implant site after reconstruction of a local defect of the maxillary anterior ridge with chin bone or deproteinised cancellous bovine bone", *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 34, pp.877-884.

MELCHER, A.H., 1970, "Repair of wound in the periodontium of the rat. Influence of the periodontal ligament on osteogenesis", *Arch Oral Biol.*, v. 15, pp. 1183-1204

MENDONÇA, T. A., ZAMBUZZI, W. F., PAIVA, K. B. S et al., 2005, "Expression of metalloproteinase 2 in the cell response to porous demineralized bovine bone matrix", *Journal of molecular histology*, v. 36, n. 4, pp. 311-316.

MILLER A., HANSEN, J., 2002, "Revision of the ISO and EN radiation sterilization standards". *Radiation Physics and Chemistry*; v. 63, pp. 665–667.

MISCH, C.E., 2006, Implantes dentários contemporâneos, 2ª ed., São Paulo, Ed. Santos.

MOSSER, D. M., 2003, "The many faces of macrophage activation", *J Leukoc Biol*, v.73, n. 2, pp. 209-212.

MURAMATSU, K., BISHOP, A.T., 2002, "Cell repopulation in vascularized bone grafts", *J Orthop Res.*, v. 20, pp. 772-788.

MURPHY, K. G., 1995, "Incidence of characterization and effect of postoperative surgical complications using Gore-Tex periodontal material. Part I. Incidence and character of complications", *Int. J. Periodon. Res. Dent.*, v.15, pp.363-375.

MURUGAN, R., RAMAKRISHNA S., 2005, Development of nanocomposites for bone grafting, *Composites Science and Technology*, v. 65, pp.2385-2406

MUSSEL, R. L. O., SILVA, E. S., COSTA, A. M. A. et al., 2003,"Mast cells in tissue response to dentistry materials: an adhesive resin, a calcium hydroxide and a glass ionomer cement", *J Cell Mol Med*, v. 7, n. 2, pp. 171-178.

NAGASE, H., WOESSNER, J.F., 1999, "Matrix metalloproteinases", *Journal of biological chemistry*, v. 274, n. 31, pp. 21491-21494.

"National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement on Dental Implants", 1988, *Journal of Dental Education*, v.52, n.12, pp.824-827.

NILSSON, B. EKDAHL, K. N, MOLLNES, T. E. et al., 2007, "The role of complement in biomaterial-induced inflammation", *Mol Imunol*, v. 44, n. 1-3, pp. 82-94.

NORTON, M. R., ODELL, E. W., THOMPSON, I. D. E et al., 2003, "Efficacy of bovine bone mineral for alveolar augmentation: a human histologic study", *Clinical Oral Implant Research*. v.14, pp. 775-783.

NOWZARI, H. e SLOTS, J., 1995, "Microbiologic and clinical study of expanded polytetrafluorethylene membranes for guided bone regeneration around implants", *Int. J. Periodont. Res. Dent.*, v.10, pp.67-73.

OLIVEIRA, R.C, SICCA, C. M., SILVA, T. L. et al., 1999, "Efeito da temperatura de desproteinização no preparo de osso cortical bovino microgranular. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular em subcutâneo de ratos", *Rev. FOB*, v. 7, pp. 85-93.

PINHO, M. S. L., 2005, "Imunohistoquímica: o estudo da biologia molecular ao alcance de todos", *Ver. Bras. Coloproct*, v. 25, n. 2, pp. 188-191.

PROUSSAEFS, P., LOZADA, J., VALENCIA, G. et al., 2002, "Histologic evaluation of a hydroxyapatite onlay bone graft retrieved after 9 years: A clinic report", *J Prosthet Dent*, v. 87, pp., 481-484.

RAISZ, L. G., RODAN, G. A., 1998, "Embryology and cellular biology of bone". In: Avioli, L. V.; Krane, S. M. *Metabolic bone disease*. 3^a Ed., San Diego, Academic Press, cap1, p.1-22.

REDDI, A. H., 1981, "Cell biology and biochemistry of endochondral bone development", *Coll. Relat. Res.*, v.1, pp.209-226.

ROBERTS, W. E., TURLEY, P. K., BREZNIAK, N et al., 1987, "Bone physiology and metabolism" *California Dental Association Journal.*, v.15, n.10, pp.54-61.

RODAN, G. A., 1991, "Mechanical loading, estrogen deficiency, and the coupling of bone formation to bone resorption: Comment", *J. Bone Miner Res.*, v.6, pp.527-530.

RODAN, G. A., 1992, "Introduction to bone biology", Bone, v.13 (suppl1), pp. S3-S6.

RODAN, G. A., MARTIN, T. J., 1981, "Role of ostoblasts in hormonal control of bone resorption: a hypothesis". *Calcif. Tiss. Int.*, v.33, n.4, pp.349-351.

ROSA, F.P., LIA, R.C.C., SOUZA, K.O.F. et al., 2003, "Tissue response to polyanionic collagen: elastin matrices implanted in rat calvaria", Biomaterials, v. 24, pp. 207-212.

RÜGER, B., DUNBAR, P. R., HASSAN, Q. et al., 1994, "Human mast cells produce type VIII collagen *in vivo*", *Int J. Exp Path*, v. 75, pp. 397-404.

SANDBERG, E, DAHLIN, C., LINDE, A., 1993, "Bone regeneration by the osteopromotion technique using biosorbable membranes: an experimental study in rats", *J. Oral. Maxill. Surg.*, v.51, n.10, pP.1106-1114.

SANTOS, A.A., MIRANDA, C.D.O., ALVES, M.T.S. et al., 2005, "O papel da proteína morfogenética óssea na reparação do tecido ósseo", *Acta ortop bras.*, v. 13, n. 4, pp. 194-195.

SCHLIEPHAKE, H., TAVASSOL, F., GELINSKY, M et al., 2004, "Use of a mineralized collagen membrane to enhance repair of calvarial defects in rats", *Clin. Oral Implants Res.*, v.5, n., pp.112-118.

SCHMITZ, J. P., HOLLINGER, J. O., 1986, "The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions". *Clin Orthop*, v. 205, pp.299-308.

SCHNETTLER, R., ALT, V., DINGELDEIN, E. et al., 2003, "Bone ingrowth in bFGFcoated hydroxyapatite ceramic implants", *Biomaterials*, v.24, pp. 4603-4608.

SCIADINI, M.F., DAWSON, J. M., JOHNSON, K. D. et al., 1997, "Evaluation of bovine-derived bone protein with a natural coral carrier as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model", *J. Orthop. Res.*, v. 15, pp. 844-857.

SERVICE, R.F., 2000, "Tissue engineers build new bone". *Science*, v.289, n.5484, pp.1498-1500.

SHAPOFF, C.A, BOWERS, M., LEVY, B et al., 1980, "The effect of particle size on the osteogenic activity of composite grafts of allogenec freezedried bone and autogenous marrow". *J. Periodontol*, v.51, n 11 November, pp.625-630.

SICCA, C.M., OLIVEIRA, R.C., SILVA, T.L et al., 2000, "Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito do tamanho da partícula", *Rev. FOB*, v. 8, n. 1/2, pp. 1-10.

SILVA, R. V., CAMILLI, J. A., BERTRAN, C. A. et al., 2005, "The use of hydroxyapatite and autogenous cancellous bone grafts to repair bone defects in rats". *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.34, pp. 178-184.

SIMONET, W.S., LACEY, D. L., DUNSTAN, C. R. et al., 1997, "Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density", *Cell*, v.89, pp 289-309.

SONG, E., OUYANG, N., HORBELT, M. et al., 2000, "Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts", *Cell Immunol*, v. 204, n. 1, pp. 19-28.

SOUZA, A.P., LINE, S.R.P., 2002, "The biology of matrix metalloproteinases", *Rev. FOB*, v. 10, pp.1-6.

SPORN, M. B., ROBERTS, A. B., 1989, "Transforming growth factors. Multiple actins and potencial clinical applications", *J. Am. Med. Assoc.*, v.262, pp.938-941.

STETLER-STEVENSON, W.G., 1999, "Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention", *The journal of clinical investigation*, v. 103, n.9, pp. 1237-1241.

SU-GWAN, K., HAK-KYUN, K., SUNG-CHUL, L., 2001, "Combined implantation of particulate dentine, plaster of Paris, and a bone xenograft (Bio-Oss) for bone regeneration in rats". *J. Craniomaxillofac. Surg.*, v.29, n.5, pp.282-288.

SUVOROVA, E. I., BUFFAT, P.A., 2001, "Electron diffraction and high resolution transmission electron microscopy in the characterization of calcium phosphate precipitation from aqueous solutions under biomineralization conditions". *European cells and materials*", v.1, pp. 27-42.

TAGA, M. L. L, 2004, "Análise histológica e radiográfica do potencial osteopromotor da membrana de cortical óssea bovina no reparo de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de cobaia (*Cavia Porcellus*)". Tese apresentada para obtenção do título de Mestre, Universidade de São Paulo, Bauru, SP, Brasil.

TAGA, R., CESTARI, T.M., TAGA, E.M. et al., 2000, "Avaliação histológica, radiográfica e morfométrica da reparação de defeito ósseo perene em crânio de cobaia

tratado com mistura de Osseobond e Biohapatita e membrana absorvível de cortical óssea bovina", *Jornal Brasileiro de Endo Perio.*, v. 1, n. 1, pp.78 - 87.

TAKAMORI, E. R., FIGUEIRA, E. A., TAGA, R. et al., 2007, "Evaluation of the cytocompatibility of mixed bovine bone", *Braz Dent J*, v. 18, n.3, pp. 179-184.

TANG, L., JENNINGS, T.A., EATON, J.W., 1998, "Mast cells mediate acute inflammatory responses to implanted biomaterials", *Proc Natl Acad Sci*, v. 95, n. 15, pp. 8841-8846.

THESINGH, C. W., BURGER, E. H., 1983, "The role of mesenchyme in embryonic long bones as early deposition site for osteoclast progenitor cells". *Dev. Biol.*, v.95, pp.429-438.

THORWARTH, M., SCHULTZE-MOSGAU, S., KESSLER, P et al., 2005, "Bone regeneration in osseous defects using a resorbable nanoparticular hydroxyapatite", J. *Oral Maxillofac Surg*, v. 63, pp.1626-1633.

TROMBELLI, L, HEITZ-MAYFIELD, L., NEEDLEMAN, I. et al., 2002, "A systematic review of graft materials and biological agents for periodontal intraosseous defects", *J Clin Periodontolol*, v. 29, n. 3, pp. 117-135.

UENO, T., KAGAWA, T., KANOU, M. et al., 2003, "Immunohistochemical observations of cellular differentiation and proliferation in endochondral bone formation from grafted periosteum: expression and localization of BMP-2 and -4 in the grafted periosteum", *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, v. 31, pp. 356-361.

URIST, M.R, 1965, "Bone: formation by autoinduction", *Science*, v.150, n.698, pp.893-899.

URIST, M. R., HUO, Y. K., BRWNELL, A. G. et al., 1984, "Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.81, pp.371-375.

VALENTINI, P., ABENSUR, D., 2003, "Maxillary sinus grafting with anorganic bovine bone: a clinical report of long-term results". *The international journal of oral and maxillofacial implants*, v. 18, pp. 556-560.

WALLACE, S. S., FROUM, S. J., CHO, S-C. et al., 2006, "Sinus augmentation utilizing inorganic bovine bone (Bio-os) with absorbable and nonabsorbable membranes placed over lateral window: histomorfometrics and clinical analyses". *Int J Periodontics Restaurative Dent*, v. 25, pp. 551-559.

WANG, H. L., CAROLL, W. J., 2001, "Guided bone regeneration using bone grafts and collagen membranes", *Quintessence Int.*, v.3, n.7, pp.504-515.

WENZ, B., OESCH, B., HORST, M., 2001, "Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone", *Biomaterials*, v.22, n. 12, pp.1599-1606.

WIKESJO, U.M.E., NILVEUS, R.E., SELVIG, K.A., 1992, "Significance of early healing on periodontal repair: a review", *J Periodontol*, v.63, n.3, pp.158-165.

WILSON, C.J., CLEGG, R.E., LEAVESLEY, D.I. et al., 2005, "Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review", *Tissue Eng*, v. 11, n.1, pp. 1-18.

WILSON, E., JACKSON, S., CRUWYS, S. et al., 2007, "An evaluation of de immunohistochemistry benefits of boric acid antigen retrieval on rat decalcified joint tissues", *Journal of immunological methods*, v. 322, pp. 137-142.

WOZNEY, J. M., ROWEN, V, CELESTE, A.J. et al., 1988, "Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities", *Science*, v.242, pp.1528-1534.

YAMASHITA, S., 2007, "Heat-induced antigen retrieval: Mechanisms and application to histochemistry", *Progress in histochemistry and cytochemistry*, v. 41, pp. 141-200.

YAMATE, J., TSUJINO, K., KUMAGAI, D. et al., 1997, "Morphological characteristic of a transplantable histiocytic sarcoma (HS-J) in F344 rats and appearance of renal tubular hyaline droplets in HS-J-bearing rats", *J. Comp. Path*, v. 116, pp. 73-86.

YANG, Y., DENNISON, D., ONG, J.L., 2005, "Protein adsorption and osteoblast precursor cell attachment to hydroxyapatite of different crystallinities". *The international journal of oral & maxillofacial implants*, v.20, pp.187-192.

YOUNG, C., SANDSTEDT, P., SKOGLUND, A., 1999, "A comparative study of anorganic xenogenic bone and autogenous bone implants for bone regeneration in rabbits", *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v.14, n.1, pp.72-76.

ZAMBUZZI, W. F., OLIVEIRA, R. C., PEREIRA, F. L et al., 2006, "Rat subcutaneous tissue response to macrogranular porous anorganic bovine bone graft", *Braz Dent J*, v. 17, n. 4, pp. 274-278.

ZAMBUZZI, W. F., SILVA, T. L., OLIVEIRA, R. C et al., 2006, "Avaliação bioquímica de xenoimplantes em subcutâneo de rato", *Cienc Odontol Bras,* v. 9, n.4, pp. 44-51.

ZITZMANN, N. U., NAEF, R., SCHARER, P., 1997, "Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration", *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v.12, pp.844-852.

ZDOLSEK, J., EATON, J.W., TANG, L., 2007, "Histamine release and fibrinogen adsorption mediate acute inflammatory responses to biomaterial implants in humans", *J Transl Med*, v. 5, pp.31.

10. APÊNDICE

10.1 - Produção dos grânulos de HA, procedimento cirúrgico e processamento histológico

10.1.1 - Produção dos grânulos de hidroxiapatita

Foram utilizados para a produção dos grânulos dois pós de hidroxiapatita (HA-1 e HA-2), preparados pelo método úmido no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), com razão molar Ca/P igual a 1,60 e 1,67 respectivamente e diferentes cristalinidades diferentes conforme demonstrado nos difratogramas. As diferenças nas cristalinidades dos materiais de partida foram obtidas por meio de um controle dos reagentes empregados, da temperatura e do tempo de processamento.

Foram produzidas pastilhas de hidroxiapatita, com massa de 2,0g, com o auxílio de uma matriz de aço, onde foi depositado o pó de HA misturado com ácido esteárico (polímero) em uma razão de 60/40% respectivamente. As pastilhas, com 2 cm de diâmetro (figura 10.1) foram obtidas após a compactação uniaxial dos pós a frio, sob uma pressão de 15,5 MPa por 15 minutos. Após a remoção das pastilhas da matriz, foi realizado o tratamento térmico com temperaturas controladas. O início do processo ocorreu com um aquecimento lento (10h) até alcançar a temperatura de 450°C para retirada do polímero e, após esse período, as pastilhas permaneceram no forno para a calcinação na temperatura de 450°C por mais 6h.



Figura 10.1 – Imagens das pastilhas de HA após a prensagem e dos grânulos produzidos (CONZ, 2006).

Após a calcinação, as pastilhas foram moídas em gral e pistilo para obtenção dos grânulos que foram selecionados, por meio de peneiramento, na faixa granulométrica entre 250 a 1000 μ m. Os grânulos foram lavados sob agitação por 10 vezes, durante 2 minutos, utilizando água deionizada. Posteriormente foram secos em estufa a uma temperatura de 500° C por 48 hs, embalados em recipientes contendo 2,4 g e esterilizados por radiação Gama a 25 kGy conforme preconiza a norma ISO 11137 (MILLER e HANSEN, 2002).

10.1.2- Procedimento cirúrgico

O experimento foi realizado no biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru (USP) em conformidade com os princípios e aprovado pela comissão de ética no ensino e pesquisa em animais (CEEPA-proc. No. 18/2004).

Os animais foram mantidos durante o período experimental em boas condições de alimentação, com ração e água *ad libitum*, temperatura, ciclo claro-escuro de 12 horas e higiene.

O procedimento de implantação foi realizado nos animais sob anestesia geral intramuscular, com mistura de Ketamina 5% (Ketalar, fabricado por Achë Laboratórios Farmacêuticos S.A, Butatã, SP, Brasil), relaxante muscular e Xilazina 2% (Rompun, Bayer-S.A, São Paulo, SP, Brasil), sedativo de uso animal., na proporção 1:1. A dose utilizada foi de 0,2 ml para cada 100g de peso. Após a anestesia foi realizada a tricotomia da região frontoparietal da cabeça do animal com auxílio de tesoura e lâmina de barbear com posterior anti-sepsia vigorosa utilizando álcool iodado. Foi realizada uma incisão na pele e periósteo., com uma lâmina de bisturi nº10, em formato de meialua (com vértice voltado para anterior) na calota craniana, com auxílio de um perióstomo de Molt e cinzel de Oshsenbein nº1 (SSWHITE), os retalhos de espessura total foram elevados expondo amplamente a cortical óssea da região. A seguir, foi removido um fragmento da porção mediana dos ossos parietais, com auxílio de um motor cirúrgico e um contra-ângulo redutor 16:1, por meio de uma broca trefina cirúrgica de 8 mm de diâmetro interno e 8,5 de diâmetro externo (Wellfare S.A) sob irrigação abundante e contínua com solução fisiológica. A dura-máter foi mantida íntegra. Após a remoção das tábuas corticais externa e interna, os defeitos críticos transfixados com 8,5mm de diâmetro foram preenchidos apenas com coágulo no grupo controle, enquanto nos grupos experimentais os defeitos foram preenchidos com os biomateriais HA-1 e HA-2. Os retalhos, a seguir, foram reposicionados e suturados com linha de seda preta nº 3-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 10.2).



Figura 10.2 – **Seqüência do procedimento cirúrgico dos animas experimentais.** Anestesia, tricotomia, incisão, perfuração para remoção da cortical., colocação do biomaterial e sutura (CONZ, 2006).

10.1.3- Obtenção das biópsias e processamento histológico

Os animais (n=5/período) foram mortos ao término dos períodos de 1, 3, 6 e 9 meses após as cirurgias por dose excessiva de anestésico hidrato de cloral 10%. Em seguida foram coletadas as calotas cranianas com a pele sobreposta com auxílio de uma serra elétrica que posteriormente foram submetidas ao processo de fixação em formol 10% tamponado¹ durante uma semana.

O objetivo da fixação é imobilizar, matar e preservar as células. Torna as células permeáveis aos corantes e produz uma ligação cruzada entre suas macromoléculas, de maneira que sejam estabilizadas e presas à sua posição (ALBERTS et al., 2004). A desmineralização das peças procedeu-se em solução de EDTA pH 7,2 (solução contendo 4,13% de Titriplex III *Merck*® e 0,44% de hidróxido de sódio) a temperatura ambiente, por um período aproximado de cento e vinte dias com trocas semanais da solução desmineralizadora.

Em seguida, as peças foram submetidas ao procedimento histotécnico padrão do laboratório de Histologia da UFF/RJ, sendo incluídas em blocos de parafina (Figura 10.3). Cortes semi-seriados de 5µm de espessura, no sentido latero-lateral (micrótomo Jung-Leica RM2045) foram obtidos, sendo alguns imunomarcados e outros corados pela técnica da Hematoxilina-Eosina - H/E, pois a hematoxilina cora em azul ou violeta o núcleo das células e outras estruturas ácidas (como porções do citoplasma ricas em RNA e a matriz da cartilagem hialina). A eosina, por outro lado, cora o citoplasma e o colágeno em cor-de-rosa (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).



Figura 10.3: Peças anatômicas inseridas nos blocos de parafina

¹ Formol 10% Tamponado	
Formaldeído 40%	10 ml
Tampão Fosfato de Sódio [*] , pH 7,0	90 ml
* Tampão fosfato de sódio:	
Monofosfato de sódio hidratado (NaH ₂ PO ₄ H ₂ O)	4,02g
Difosfato de sódio hidratado (NaHPO ₄ .12H ₂ O)	16,37g
Água destilada q.s.p.	1000ml

10.2- Imunohistoquímica - anticorpos

Anticorpos primários

Anticorpos policlonais

Os anticorpos policionais são produzidos injetando antígenos purificados em animais (Figura 10.4). Como a purificação de antígenos sem proteínas contaminadas é muito difícil, a especificidade do soro sanguíneo contendo anticorpos deve ser cuidadosamente caracterizada por diversos métodos como immunoblots, ELISA (Enzime Linked Immuno Sorbent Assay), imunoprecipitação e imunohistoquímica. O soro contém diferentes classes e subclasses de imunoglobulinas, com diferentes afinidades para os antígenos injetados. Além do mais, os animais devem ter anticorpos naturais para outras proteínas em seu soro, que devem apresentar reação cruzada ou ligação inespecífica com as proteínas teciduais (YAMASHITA, 2007).



Figura 10.4: Diagrama esquemático de ligações de anticorpos policionais com vários epítopos do antígeno. (1) anticorpos; (2) antígeno; (3) epítopos.

Anticorpos monoclonais

São as únicas moléculas que reconhecem um único epítopo (o sítio exato de ligação do anticorpo na molécula do antígeno) de um antígeno (Figura 10.5). Mesmo se o antígeno não for puro, um hibridoma (célula híbrida resultante da fusão de um linfócito B com uma célula de mieloma e cada hibridoma tem a capacidade de produzir um único tipo de anticorpo, sendo este um anticorpo monoclonal) secretando um anticorpo para um determinado antígeno pode ser selecionado e clonado (YAMASHITA, 2007).



Figura 10.5: Um específico clone de anticorpo monoclonal reage com um específico epítopo do antígeno. (1) anticorpos; (2) antígeno; (3) epítopos.

Anticorpos secundários

Método avidina-biotina

Avidina é uma glicoproteína obtida a partir da clara do ovo. É uma molécula quadrivalente e cada lado da molécula contém um par de receptores para a biotina (vitamina H), com uma afinidade muito forte. No método streptavidina-biotina (LSAB-labelled streptavidin biotin), o anticorpo biotinilado é utilizado como secundário (Figura 10.6) (YAMASHITA, 2007). O uso do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) é o mais difundido, embora a substituição de avidina por estreptoavidina aumente a

sensibilidade do método e promova um número menor de ligações não específicas (CARTUN e PEDERSEN, 1998).



Figura 10.6: Utilização do LSAB onde a enzima streptavidina reage com o anticorpo secundário biotinilado. (1) streptavidina; (2) anticorpo secundário biotinilado; (3) anticorpo primário; (4) antígenos.

10.3 - Protocolo utilizado nas reações de Imunomarcações

Secções semi-seriadas de $5\mu m$ (cortes histológicos) foram obtidas do material coletado incluso em blocos de parafina (Figura 10.7). Estas foram colocadas sobre lâminas silanizadas Dako - cod. S3003 (Figura 10.8) e, em seguida, desparafinizadas em estufa a 60° C por 30 minutos, sendo os últimos 15 minutos mergulhadas no xilol (Figura 10.9).



Figura 10.7 – Materiais coletados (setas) inclusos em blocos de parafina.



Figura 10.8 – Lâminas com os cortes histológicos sobrepostos. Ficam armazenadas em baixa temperatura (freezer).


Figura 10.9: Estufa utilizada a 60° C, possuindo no seu interior as cubas com xilol.

Após saírem da estufa, as lâminas foram banhadas em xilol à temperatura ambiente, por 20 minutos divididos em 4 banhos de 5 minutos (Figura 101.10).





Figura 10.10: Cubas com xilol utilizadas para os banhos.

Os cortes foram hidratados em álcool 99% (2 banhos de 5 minutos cada), álcool 90% (2 banhos de 5 minutos cada) e água destilada (2 minutos) (Figura 10.11).



Figura 10.11: Bateria de hidratação com as cubas de álcool 99% e álcool 90%.

O bloqueio de íons foi realizado com banho no bórax a 2% em água destilada por 15 minutos (Figura 10.12).



Figura 10.12: Balança digital utilizada para pesar o borax para posterior diluição na água destilada.

Normalmente ocorre atividade de peroxidase em algumas células (por ex. hemácias) ou tecidos (sistema nervoso central) do ser que é objeto de estudo, esta é a peroxidase endógena. As peroxidases endógenas produzem produtos de reação com o corante (DAB), por isto o seu bloqueio deve ser procedimento de rotina. No protocolo utilizado, o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio 3% diluído em água destilada, por 15 minutos, depois as lâminas foram lavadas em água destilada e mergulhadas em solução tampão (Figura 10.13).



Figura 10.13: Frasco com peróxido de hidrogênio diluído para realizar o bloqueio da peroxidase endógena.

Os cortes, com exceção daqueles utilizados para o biomarcador anti-PCNA, sofreram recuperação antigênica, para exposição dos epítopos facilitando assim a capacidade de interação antígeno/anticorpo, utilizando tampão citrato (pH 6,0) na panela de pressão Dako (Figura 10.14). Água destilada é inserida em seu interior (1/2 litro), a cuba com as lâminas mergulhadas no citrato é colocada dentro da panela e então tampada. Quando ligada, leva em torno de 12 minutos para atingir a temperatura de 125°C e pressão entre 18 e 24 psi, permanecendo assim por 30 segundos e depois leva em torno de 17 minutos para abaixar a temperatura e pressão, podendo então ser aberta. Posteriormente, a cuba com citrato é deixada esfriar por 20 minutos em temperatura ambiente, as lâminas são lavadas em água destilada e colocadas em tampão TBS (Trisbuffered-saline solution) com pH 7,4-7,6 por 5 minutos.



Figura 10.14: Panela de pressão utilizada para fazer a recuperação antigênica.

O pré-tratamento (da alta temperatura e pressão) quebra pontes químicas formadas entre as proteínas durante a fixação por formol. Estas pontes mudam a conformação das proteínas, impedindo que os anticorpos reconheçam os antígenos. Quando quebradas as pontes, as proteínas voltam a sua conformação original., permitindo assim o reconhecimento de antígenos por anticorpos usados na imunohistoquímica. O pré-tratamento também aumenta a permeabilidade das células, facilitando a passagem de anticorpos e outros reagentes imunohistoquímicos através das membranas celulares. O pH da solução de citrato é um fator essencial e insignificantes degradações das pontes químicas ocorrem em outros valores de pH (YAMASHITA, 2007).

No trabalho realizado houve grande dificuldade com a perda de cortes histológicos, quando o material era levado em altas temperaturas no banho maria (protocolo da rotina do Laboratório de Imunohistoquímica do Hospital Universitário Antônio Pedro), pois os cortes eram pequenos e compostos por osso, com isto soltavam das lâminas mesmo estando silanizadas, o que é descrito na literatura (WILSON et al., 2007). Por isto foi feita a opção em trabalhar na panela de pressão, pois o tempo que o material fica submetido ao elevado calor é menor.

Os conjugados de peroxidase são proteínas básicas que podem se ligar de modo inespecífico a sítios aniônicos teciduais, por isto utiliza-se proteínas inertes (como BSA) para competir com os sítios de ligação, reduzindo assim a absorção inespecífica. No protocolo utilizado, a inibição de ligações inespecíficas foi realizada na incubação com BSA (albumina de soro bovino) e leite desnatado por 15 minutos, reduzindo assim a possibilidade de surgimento de "fundo" (Figura 10.15).

O "fundo" é uma coloração sem especificidade e indesejável em imunohistoquímica. É resultante da atividade de enzimas endógenas, da ligação inespecífica de anticorpos a componentes teciduais quer por ligações hidrofóbicas ou interações iônicas.

Os anticorpos primários são armazenados de 4º a 8º C, evitando-se o congelamento e descongelamento freqüentes, pois tem efeito deletério sobre as proteínas (ALVES et al., 1999).

Os tecidos foram incubados por 30 minutos com o anticorpo primário através de pipetas com concentrações específicas para cada proteína (Tabela 10.1), lavados em tampão TBS (1 banho de 10 minutos) e incubados com o anticorpo secundário biotinilado, para a imunomarcação com anti-PCNA (Figura 10.16). Para tal., foi utilizado o kit LSAB de rato (código K0609, Dako) com o anticorpo secundário por 30 minutos e o conjugado de streptavidina e peroxidase por 30 minutos, com uma etapa de lavagem (1 banhos de 10') em TBS entre essas etapas e uma no final. Para os cortes imunomarcados com anti-lisozima e anti-fator VIII, no lugar do kit LSAB foi utilizado o Envision (código K4003, Dako), que é um polímero de peroxidase/dextrano conjugado com anticorpo secundário, sendo um método mais sensível, aumentando a detecção da presença de antígenos em menores concentrações de anticorpo (KAMMERER et al., 2001). Seu tempo de incubação também é de 30 minutos.



Figura 10.15: Incubação com BSA e leite desnatado. (a) Lâminas mergulhadas no tampão TBS; (b) o cronômetro, fundamental para todas as etapas da técnica de imunohistoquímica; (c) leite com BSA utilizado para pingar sobre os cortes a fim de inibir ligações inespecíficas e (d) caneta (DAKO, código S 2002) utilizada para delimitar os cortes, impedindo que o leite e posteriormente os anticorpos pingados sobre estes escorram pela lâmina.



Figura 10.16: Lâminas sobre as quais os cortes foram incubados com os anticorpos, dentro da câmara úmida.

Anticorpos	Diluição	Código	Fabricantes	Tipo	Localização
primários					
Lisozima	1:600	EC	Dako	Policlonal	Citoplasma
		3.2.1.17	(Dinamarca)		
PCNA	1:400	JM	MBL (EUA)	Policlonal	Núcleo
		3350R-			
		100			
Fator	1:400	A 0082	Dako	Policlonal	Citoplasma
VIII			(Dinamarca)		

O imuno-complexo contendo peroxidase será detectado, pela coloração marrom, utilizando o cromógeno 3,3- diaminobenzidina-HCl / substrato - DAB (Código K3468, Dako) seguido pela contra-coloração com Hematoxilina de Harris (Figura 10.17). A Hematoxilina de Harris é um corante nuclear e sua solução deve ser filtrada antes de cada utilização.



Figura 10.17: Bateria de contra-coloração de Harris.

Como o DAB é hidrofóbico, é necessária a desidratação os cortes antes da montagem da lamínula (Figura 10.18). Assim, foram desidratados em banhos de álcool 90% (2x, de 1 minuto cada), álcool 99% (2x, 1 minuto cada) e xilol (4x, 1 minuto cada).



Figura 10.18: Bateria de desidratação com as cubas de álcool 90% , álcool %99 e xilol.

Finalmente, foi colocada uma gota de entelan no meio do corte e coberto com uma lamínula com cuidado, para evitar a formação de bolhas de ar (Figura 10.19).



Figura 10.19: Posicionamento da lamínula. Gota de entelan sendo pingada no centro da lâmina e posteriormente a lamínula é posicionada sobre a lâmina.

10.4- Protocolos utilizados nas análises histomorfométricas 10.4.1 – Contagem celular

A contagem de todas as células inflamatórias analisadas foi feita manualmente e por identificação morfológica, sendo realizada como descrito a seguir:

- a) Abre-se o programa Image-Pro Plus ®;
- b) Abre a imagem na qual será realizada a contagem (Figura 10.20);



Figura 10.20: Tela do programa Image-Pro Plus ® mostrando a imagem na qual será realizada a contagem.

c) Escolhe a calibração de acordo com a objetiva do microscópio que foi obtida



Figura 10.21: A) e B) Escolha da calibração.

 d) Abre uma janela chamada "Manual Tag", na qual serão nomeadas as classes das células que serão identificadas (Figura 10.22);



Figura 10.22: A) e B) Escolha dos nomes das classes a serem contadas.

e) Clica sobre "Tag points", abrindo assim outra janela e escolhe a classe que será contada (Figura 10.23);



Figura 10.23: A) e B) Escolha da classe a ser contada.

 f) Posiciona o mouse sobre as células que serão contadas, clicando sobre elas. Ao final da marcação de todas as células desejadas sobre cada imagem, clica em OK voltando assim para a janela anterior (Figura 10.24);



Figura 10.24: Contagem da classe concluída.

g) Clica em "File" e "DDE to Excel", para enviar os dados obtidos na contagem desta imagem para uma planilha do Excel aberta previamente (Figura 10.25);



Figura 10.25: Exportação dos dados para o Excel.

 h) Clica em "File" e "Save Points", para salvar quais pontos da imagem foram contados (Figura 10.26);



Figura 10.26: A) e B) Salvamento dos pontos.

i) Finalmente, fecha a imagem.

10.4.2 – Quantificação das áreas de tecido conjuntivo, osso e biomaterial

A quantificação das áreas de tecido conjuntivo, osso e biomaterial analisada foi feita manualmente e por identificação morfológica, sendo realizada como descrito a seguir:

- a) Abre-se o programa Image-Pro Plus ®;
- b) Abre a imagem na qual será realizada a contagem (Figura 10.27);



Figura 10.27: Tela do programa Image-Pro Plus ® mostrando a imagem na qual será realizada a contagem.

c) Escolhe a calibração de acordo com a objetiva do microscópio que foi obtida a imagem (Figura 10.28);



Figura 10.28: A) e B) Escolha da calibração.

 d) Abre uma janela chamada "Grid Mask", na qual será nomeada a grade que será utilizada na contagem (Figura 10.29);



Figura 10.29: Formatação da grade a ser utilizada.

 e) Clica nas "abas" das janelas e depois "Save As" nomeando o arquivo criado (Salvar este arquivo dentro da pasta "Grid" do programa), voltando assim para a janela anterior (Figura 10.30);



Figura 10.30: A) e B)Formatação da grade a ser utilizada.



Figura 10.30: C) e D) Formatação e salvamento da grade a ser utilizada.

f) Clica em "Apply" (Figura 10.31);



Figura 10.31: Aplicando os pontos sobre a imagem.



g) Clica em "Measure" > "Manual Tag" > cria as 4 classes (Figura 10.32);

Figura 10.32: Aplicando os pontos sobre a imagem

- h) Clica sobre "Tag points", abrindo assim outra janela;
- i) Posiciona o mouse sobre os pontos que serão contados, clicando sobre eles. Ao final da marcação de todos os pontos desejados sobre cada imagem, clica em OK voltando assim para a janela anterior (Figura 10.33);

🚺 image-Pro P	lus - DSC07517.jpg (1	/1)					_ 3 ×
File Edit Acquir	e Enhance Process Mea	asure Macro Windo	w Help				
🔓 🖬 🖩 🕯	• 🗘 🖨 📕 😫		ଓ 🚖 🖉 ९ १	୭│₩ <u>₩</u> ₩	≝ 🖬 🏥 :	±ž 🖬 📗 🕫 🖁	🛚 AI 🗽 🖄 🖾 🐼 🖉
실 DSC07517.					Gr	id mask	🔳 🗖 🔜
	⊕ _4	97	Ф <mark>.</mark>	917	Grand	rid files: ineRand.grd nsgOtth.grd nsgRand.grd eusa.grd	Preview Grid Settings
¢	+ <u>+</u> 5	C+ 6	2		the second secon	ntsConc.grd ntsOrth.grd ntsRand.grd ec conj osso e biome	Draw Measure units Color Pixels Writely
No.	* 42	* ₂₉	10	915		New Delete Save Save As ibration unit µm	Image: Save a grid file without prompt Summary: Count = 42, Length = 0.000000
* 1 38	*37	*30	wy.	d 14	21	Apply Rem	ove Create mask OK
*39	* L 56	*31	*28	Ф ₁₂	¢ 23	File View Option	s Update Vame Count Tecido conjuntivo 24
*40_	* 35	* ₃₂	*27	*	+	Delete Points Delete All	Osso 0 # Biomaterial 18 Outros 0
* 41	*34	* 33	*26	*25	¢_24	Total Count:	
Sele	ct from menu.		2524,1572	228 210 249		W,H: 2592,1944	µm (Tec conj osso e bio) 1GB
🦺 Iniciar	📕 🙆 🕲 😂 🚺	2 🖸 😫	🛄 Lar	mina 42 mod	Dissertação 10	0 🚺 Image-Pro F	Plus 🛛 PT 🔇 📕 🏉 🚷 🍟 10:49 PM

Figura 10.33: Quantificação das áreas de tecido conjuntivo, osso e biomaterial.

- j) Clica em "File" e "DDE to Excel", para enviar os dados obtidos na contagem desta imagem para uma planilha do Excel aberta previamente;
- k) Clica em "File" e "Save Points", para salvar quais pontos da imagem foram contados;
- l) Finalmente, fecha a imagem.

10.4.3 - Contagem de densidade de microvasos

A contagem da densidade de mivrovasos foi feita manualmente com auxílio de grade, sendo realizada como descrito a seguir:

- a) Abre-se o programa Image-Pro Plus ®;
- b) Abre a imagem na qual será realizada a contagem;
- c) Escolhe a calibração de acordo com a objetiva do microscópio que foi obtida a imagem;
- d) Abre uma janela chamada "Grid Mask", na qual será nomeada a grade que será utilizada na contagem (Figura 10.34);



Figura 10.34: Formatação da grade a ser utilizada.

 e) Clica em "New" > "Grid" > "Lines" > "Orthogonal" > Spacing Horizontal" seleciona 50 > "Spacing Vertical" seleciona 50 > "Save As" nomeando o arquivo criado (salvar este arquivo dentro da pasta "Grid" do programa), voltando assim para a janela anterior (Figura 10.35);



Figura 10.35: A) Formatação da grade a ser utilizada.

Pro Plus - IMG_3053.jpg (1/1)	Marco Window Hala				_ @ X
		⊘ � ⊕ Ħ 🖭 Ħ	≝ ∎ ∰ ‡	📭 📗 📣 🚼 🕅	📕 🖄 🗃 🚱 🖊
🚺 IMG_3053.jpg (1/1)			_ 🗆 🗙	Grid mask	
				Grid files: Curchand, grd CurcOth, grd CurcOth, grd CurcOth, grd CurcOth, grd LineConcl, grd LineConcl, grd LineConcl, grd LineConcl, grd LineConcl, grd LineConcl, grd Cancel Save Save Save As Calibration unit rus	Preview Grid Settings Objects C Points C Lines segments C Curcleids C Opcleids C Opcleids C Opcleids C Spacing Horg 50 == Vert 50 == Vert 50 ==
Select from menu.	Sativar como Sativar como Sativar como Sativar Grad CrcCont Cr	VIII mask files (*.grd)		Cancelar	
🛃 Iniciar 📄 🖉 🚳 😂 🕅 💆 😋	1	1 5 Microsoft Office	- Image-Pro Pl	us - IMG	PT 🔇 🗞 🌀 10:47 AM

Figura 10.35: B) Salvamento da grade criada.

f) Clica em "Apply" > "Settings" > "Full Size" > "Apply";

g) Clica em "Process" > "Grid Mask" > seleciona o arquivo novo criado > "Apply" (Figura 10.36);



Figura 10.36: Aplicando a grade sobre a imagem

 h) Clica em "Measure" > "Manual Tag" > cria uma classe, conforme descrito no item anterior (Figura 10.37);



Figura 10.37: Aplicando a grade sobre a imagem.

- i) Clica sobre "Tag points", abrindo assim outra janela;
- j) Posiciona o mouse sobre os vasos que serão contados, clicando sobre eles. Serão selecionados apenas aqueles vasos que apresentarem a luz com menos de 50 μm. Como cada lado do quadrado da grade tem 50 μm serão computados apenas aqueles cujo menor diâmetro couber dentro deste quadrado. Ao final da marcação de todos os vasos desejados sobre cada imagem, clica em OK, voltando assim para a janela anterior (Figura 10.38);



Figura 10.38: Contagem da densidade de microvasos.

- k) Clica em "File" e "DDE to Excel", para enviar os dados obtidos na contagem desta imagem para uma planilha do Excel aberta previamente;
- Clica em "File" e "Save Points", para salvar quais pontos da imagem foram contados;
- m) Finalmente, fecha a imagem.

10.4.3 - Segmentação de imagem - PCNA

A contagem da área ocupada pelas células em proliferação foi feita por segmentação de imagem, sendo realizada como descrito a seguir:

- a) Abre-se o programa Image-Pro Plus ®;
- b) Abre a imagem para ser feita a calibração do programa;
- c) Clica sobre a ferramenta "lupa" e dá o zoom de 400x para facilitar a demarcação da célula que será marcada (Figura 10.39);



Figura 10.39: Zoom de 400x sobre a imagem sobre a célula que será marcada.

 d) Clica sobre a ferramenta "Irregular AOI" e demarca a célula, selecionando assim a cor que será usada para fazer a segmentação da imagem (Figura 10.40);



Figura 10.40: Área escolhida para servir de padrão para a cor da segmentação.

- e) Clica em "Measure" > "Histogram" > e anota as variações das cores vermelho (R), verde (G) e azul (B) e fecha a imagem; (Figura 10.41)
- f) Para padronizar melhor, repetir o procedimento acima para 3 imagens diferentes e fazer uma média dos valores obtidos;



Figura 10.41: A) e B) Padronizando os níveis RGB

 g) Após a definição dos intervalos de cor, abre outra imagem e clica em "Perform Segmentation" (Figura 10.42);



Figura 10.42: Criação de arquivo com os dados obtidos dos níveis de RGB.

 h) Abrirá uma janela, nela clicar sobre a aba "Histogram based" > selecionar "1x1" e colocar os valores obtidos para RGB (Figura 10.43);



Figura 10.43: Criação de arquivo com os dados obtidos dos níveis de RGB.



i) Clica em "File" > "Save file" > e nomeia o novo arquivo (Figura 10.44);

Figura 10.44: A) e B) Criação de arquivo com os dados obtidos dos níveis de RGB.

j) Para aplicar a "máscara" sobre a imagem que será feita a segmentação:
 "Perform Segmentation" > "File" > "Load File" > clica sobre o último arquivo criado > "abrir" > "sim" (Figura 10.45)



Figura 10.45: A) Aplicação da máscara para contagem.


Figura 10.45: B) Aplicação da máscara para contagem.

k) Clica em "Measure" > "Count Size" > "Count" > "View" > "Statistic" (Figura 10.46);





Figura 10.46: A) e B) Aplicação da máscara para contagem.



Figura 10.46: C) Aplicação da máscara para contagem.

"File" > "DDE to Excel" (o Excel deverá ser aberto previamente) (Figura 10.47);



Figura 10.47: Salvando os dados no Excel.

- m) Fecha a imagem;
- n) Para continuar o processo de segmentação em outras imagens, repetir os passos de "j" à "l".