

ANA PAULA LIMA PERDIGÃO

**COMPÓSITO DE HIDROXIAPATITA, FIBROÍNA DA SEDA E ÁCIDO
HIALURÔNICO EM DEFEITOS ÓSSEOS EXPERIMENTAIS NA ULNA DE
COELHOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

P433c
2015 Perdigão, Ana Paula Lima, 1988-
Compósito de hidroxiapatita, fibroína da seda e ácido
hialurônico em defeitos ósseos experimentais na ulna de coelhos
/ Ana Paula Lima Perdigão. – Viçosa, MG, 2015.
xii, 82f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Andréa Pacheco Batista Borges.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Medicina veterinária. 2. Ossos - Regeneração.
3. Engenharia de tecidos. 4. Materiais biomédicos.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária.
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.

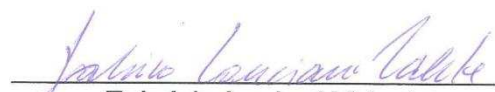
ANA PAULA LIMA PERDIGÃO

**COMPÓSITO DE HIDROXIAPATITA, FIBROÍNA DA SEDA E ÁCIDO
HIALURÔNICO EM DEFEITOS ÓSSEOS EXPERIMENTAIS NA ULNA DE
COELHOS**

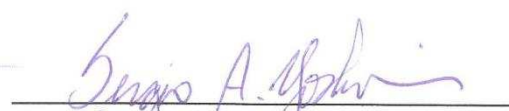
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 31 de julho de 2015.


Emily Correna Carlo Reis
(Coorientadora)


Fabrício Luciani Valente
(Coorientador)


Sheila Maria de C. Máximo Bicalho


Sergio Akinobu Yoshioka


Andréa Pacheco Batista Borges
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Os meus agradecimentos iniciais não poderiam ser para outro senão à Deus que me permitiu estar presente, com saúde e perseverança para a realização dessa pesquisa durante esses dois anos de dedicação.

Dedico esse trabalho aos meus pais, Marcelo e Neuza, pela confiança apoio e amor incondicional, e pela oportunidade de me permitirem lutar pelo meu crescimento profissional, mesmo estando longe, e com todas as nossas dificuldades. Vocês são a base e meu alicerce para toda a vida. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, compartilhando momentos de alegrias e de tristezas. Sem vocês eu definitivamente não chegaria aonde cheguei hoje.

Agradeço ao meu irmão Fabrício, por todo companheirismo e principalmente por ser aquele presente na vida da mamãe, todo esse tempo que estive fora de casa e também aos meus irmãos Cristiano e Marcelinho, que mesmo de longe sinto o apoio e a confiança depositada em mim.

Ao meu namorado, Fúlvio, que nesses anos separados pela distância, se manteve presente acima de tudo na minha vida, nunca deixando de acreditar nos meus sonhos, estando sempre ao meu lado em todos os momentos.

À minha orientadora Andréa, que pra mim é como uma mãe que tive em Viçosa. Obrigada pelos ensinamentos, conselhos, paciência e confiança durante todos esses anos de estudos. Seu incentivo e dedicação foram essenciais para o meu crescimento durante toda essa jornada.

Ao Fabrício, uma fonte inesgotável de bondade, paciência e dedicação. Exemplo de profissional dedicado, amigo, conselheiro, companheiro de gordices, agradeço por todo o incentivo e cuidado.

À Professora Emily, que com sua serenidade, paciência e experiência me orientou e me ajudou nesses estudos, sempre me auxiliando nos momentos mais críticos.

À minha querida Abadia, por sempre me incentivar e cuidar do meu pai todo esse tempo que estive longe, e aos meus sogros Mariana e Fernando, pelo apoio.

Às minhas amigas Lê e Tay e Naty, por me oferecerem um lar e ainda sim aguentarem minhas crises de mau humor matinal, e nunca me deixarem desistir, mesmo nos momentos mais difíceis. Amo muito vocês.

Livão, minha irmã mais velha abençoada, que sempre acreditou em mim e mesmo de longe se fez presente para me ouvir e aconselhar.

Às minhas amigas Mo, Nike, Paulistinha, Alice, Fer. Obrigado por encherem parte desse tempo com muitas risadas e companherismo.

Aos meus amigos de infância, Paty, Mari, Luis, Jesus, Babi, Cela, Grampo, que mesmo todo esse tempo longe, também acompanharam de perto essa trajetória, não permitindo em nenhum momento que essa distancia atrapalhasse nossa amizade que perdura a mais de 15 anos.

Aos colegas de pós graduação Rodrigo, Fernando, Dayana, Gustavo, João, Flávia, Luciana e todos os estagiários, por me ajudarem, nos momentos mais críticos de cirurgia e correria nos estudos. Obrigado pela força e dedicação.

À todos os funcionários do Departamento de Veterinária pelo apoio e pela amizade ao longo desse tempo: Maninha, Tatinha, Adão, Claudio, Luis Paulo, Fran. Um agradecimento em especial à Carmem, que se tornou uma grande amiga.

Ao Departamento de Solos, através do Laboratório de Mineralogia da UFV, pelo auxílio na realização da difração de raios-X.

Ao professor José Martins, da Universidade de Sorocaba, por permitir e auxiliar as análises pela microtomografia computadorizada em seu laboratório.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, e ao Professor Renê do departamento de Física, pelo auxílio na realização das análises de microscopia eletrônica.

À UFV por todo o ensinamento e aprendizado adquirido nesses sete anos de estudos e à CAPES pela concessão da bolsa.

À Professora Doutora Sheyla Maria Castro Máximo, ao seu laboratório JHS Laboratório Químico Ltda e ao professor Sergio Yoshioka pelas orientações e fornecimento dos compósitos.

Por fim, em uma mistura de sentimentos de gratidão e culpa, agradeço eternamente aos animais que participaram desse trabalho e contribuíram para todo o engrandecimento profissional e avanço das pesquisas na área.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO 1 – Engenharia tecidual óssea e os biomateriais: caracterização, aplicação e perspectivas.....	1
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. ENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA.....	3
3. HIDROXIAPATITA.....	6
4. FIBROÍNA DA SEDA.....	8
5. ÁCIDO HIALURÔNICO.....	9
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	11
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13
CAPITULO II– Caracterização in vitro e análise de biocompatibilidade in vivo do compósito formado por hidroxiapatita, fibroína da seda e ácido hialurônico.....	22
RESUMO.....	22
ABSTRACT	23
1. INTRODUÇÃO.....	24
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
2.1. Biomaterial.....	25
2.2. Difração de raios X.....	25
2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	26
2.4. Análise de biocompatibilidade <i>in vivo</i>	26

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4. CONCLUSÕES.....	40
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
CAPITULO III - Compósitos de hidroxiapatita, fibroína da seda e ácido hialurônico no tratamento de defeitos ósseos experimentais: aspectos clínicos, radiográficos, microtomográficos e histológicos.....	
	44
RESUMO.....	44
ABSTRACT.....	45
1. INTRODUÇÃO.....	46
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.1. Biomaterial.....	47
2.2. Modelo experimental.....	47
2.3. Procedimento cirúrgico.....	48
2.4. Pós- operatório.....	49
2.5. Exame clínico.....	50
2.6. Exame radiográfico.....	50
2.7. Tomografia microcomputadorizad.....	53
2.8. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	53
2.9. Avaliação histológica e histomorfométrica.....	54
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
3.1. Exame clínico.....	54
3.2. Avaliação radiográfica.....	58
3.3. Tomografia microcomputadorizada.....	63
3.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	66
3.5. Avaliação histológica e histomorfométrica.....	68
4. CONCLUSÕES.....	76
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II - CARACTERIZAÇÃO IN VITRO E ANÁLISE DE BIOCAMPATIBILIDADE IN VIVO DO COMPÓSITO FORMADO POR HIDROXIAPATITA, FIBROÍNA DA SEDA E ÁCIDO HIALURÔNICO.....	24
Figura 1 - Cirurgia de implantação do compósito no tecido subcutâneo dos animais.....	27
Figura 2 - Difratoograma correspondente ao compósito de hidroxiapatita sintética associada à fibroína de seda.....	28
Figura 3 - Difratoograma correspondente ao compósito de hidroxiapatita sintética associada à fibroína de seda e ácido hialurônico a 1% na avaliação de sua cristalinidade por difração de raios X.....	29
Figura 4 - Difratoograma correspondente ao compósito de hidroxiapatita sintética associada à fibroína de seda e ácido hialurônico a 3% na avaliação de sua cristalinidade por difração de raios X.....	29
Figura 5 - Micrografia da amostra de hidroxiapatita sintética associada à fibroína de seda obtida a partir da microscopia eletrônica de varredura.....	31
Figura 6 - Micrografia dos três compósitos em estudo obtida através da microscopia eletrônica de varredura.....	32
Figura 7- Micrografia da amostra do compósito de hidroxiapatita sintética associada à fibroína da seda e ácido hialurônico 1% obtida a partir da microscopia eletrônica de varredura, aumento de 3000x.....	33
Figura 8 - Representação histológica de tecidos coletados após 15 dias de implantação dos compósitos.....	35
Figura 9 - Representação histológica de tecidos coletados após 30 dias de implantação dos compósitos.....	37
Figura 10 - Representação histológica de tecidos coletados após 60 e 90 dias de implantação dos compósitos.....	39
CAPÍTULO III - COMPOSITOS DE HIDROXIAPATITA, FIBROÍNA DA SEDA E ÁCIDO HIALURÔNICO NO TRATAMENTO DE DEFEITOS ÓSSEOS EXPERIMENTAIS: ASPECTOS CLÍNICOS, RADIOGRÁFICOS, MICROTOMOGRÁFICOS E HISTOLÓGICOS.....	44
Figura 1 - Procedimento cirúrgico para a realização do defeito experimental no olecrano de coelho.....	49
Figura 2 - Imagens radiográficas de um animal do grupo controle, aos 30 dias de pós-operatório. A figura mostra a padronização das regiões a serem analisadas.....	51
Figura 3 - Representação gráfica das medianas obtidas na avaliação da claudicação em escala de 0 a 2, durante sete dias após o procedimento cirúrgico.....	56
Figura 4 - Representação gráfica das medianas obtidas na avaliação do edema em escala de 0 a 3, durante sete dias após o procedimento cirúrgico.....	56
Figura 5 - Representação gráfica das medianas obtidas na avaliação da sensibilidade dolorosa em escala de 0 a 3, durante sete dias após o procedimento cirúrgico.....	57

Figura 6 - Radiografias mediolaterais do olecrano de coelho submetido à realização de defeito na cortical lateral e implantação de compósitos no pós-operatório imediato.....	59
Figura 7 - Radiografias mediolaterais do olecrano de coelho submetido à realização de defeito na cortical lateral e implantação de compósitos aos 7 dias após a cirurgia.....	60
Figura 8 - Radiografias mediolaterais do olecrano de coelho submetido à realização de defeito na cortical lateral referentes ao grupo controle (sem tratamento) aos 30 dias após a cirurgia.....	61
Figura 9 - Radiografias mediolaterais do olecrano de coelho submetido à realização de defeito na cortical lateral e implantação de compósitos, aos 30 dias após a cirurgia.....	62
Figura 10 - Representação gráfica das médias e desvios-padrão obtidos na análise radiográfica dos olecranos dos animais tratados e não tratados.....	63
Figura 11 - Reconstrução em três dimensões das imagens tomográficas das amostras de tecido ósseo retirado do olecrano dos coelhos.....	65
Figura 12 - Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura pela técnica de retrodispersão referente ao grupo tratado com o compósito hidroxiapatita e fibroína da seda, após 30 dias de cirurgia.....	66
Figura 13 - Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura pela técnica de retrodispersão referente ao grupo tratado com o compósito hidroxiapatita, fibroína da seda e 1% de ácido hialurônico, após 30 dias de cirurgia.....	67
Figura 14 - Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura pela técnica de retrodispersão referente ao grupo tratado com o compósito hidroxiapatita, fibroína da seda e 3% de ácido hialurônico, após 30 dias de cirurgia.....	67
Figura 15 - Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura pela técnica de retrodispersão referente ao grupo controle, após 30 dias de cirurgia.....	68
Figura 16 - Micrografia representando a região do defeito realizado no olecrano de coelho do grupo controle, sete dias após a cirurgia.....	69
Figura 17 - Micrografia representando a região do defeito realizado no olecrano sete dias após a cirurgia, submetida à implantação dos compósitos.....	70
Figura 18 - Micrografia representando a região do defeito realizado no olecrano de coelho do grupo controle, 30 dias após a cirurgia.....	72
Figura 19 - Micrografia representando a região do defeito realizado no olecrano de coelho do grupo hidroxiapatita e fibroína da seda.....	73
Figura 20 - Micrografia representando a região do defeito realizado no olecrano trinta dias após a cirurgia, submetida à implantação do compósito hidroxiapatita, fibroína da seda e 1% de ácido hialurônico.....	74
Figura 21 - Micrografia representando a região do defeito realizado no olecrano trinta dias após a cirurgia, submetida à implantação do compósito hidroxiapatita, fibroína da seda e 3% de ácido hialurônico.....	74
Figura 22 - Imagem Distribuição relativa de tecido ósseo, medula óssea/tecido conjuntivo e biomaterial avaliados histomorfometricamente em defeito em olecrano de coelhas tratadas com combinações de hidroxiapatita, fibroína de seda e ácido hialurônico.....	76

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II - CARACTERIZAÇÃO IN VITRO E ANÁLISE DE BIOCOMPATIBILIDADE IN VIVO DO COMPÓSITO FORMADO POR HIDROXIAPATITA, FIBROÍNA DA SEDA E ÁCIDO HIALURÔNICO.....	24
Tabela 1 - Representação esquemática da localização das incisões e posteriores implantações no tecido subcutâneo realizadas no dorso de três animais.....	27

RESUMO

PERDIGÃO, Ana Paula Lima, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Compósito de hidroxiapatita, fibroína da seda e ácido hialurônico em defeitos ósseos experimentais na ulna de coelhos**. Orientadora: Andrea Pacheco Batista Borges. Coorientadores: Emily Correna Carlo Reis e Fabrício Luciani Valente.

As lesões ou perdas de tecido ósseo são condições que afetam diretamente a qualidade de vida dos seres humanos e animais. Os processos de reparação podem não ocorrer de maneira eficiente quando existirem condições clínicas desfavoráveis. Alguns compósitos, polímeros e proteínas são utilizados na formação de matrizes por promover maior eficiência nesse processo reparador. Entretanto, os biomateriais utilizados hoje no tratamento dessas afecções ainda apresentam algumas propriedades que devem ser adequadas ao uso do mesmo. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial reparador do compósito constituído de hidroxiapatita (HAP) e fibroína da seda (FS) na presença de ácido hialurônico (AH) em diferentes concentrações, utilizado para o tratamento de defeitos ósseos experimentais realizados na ulna de coelhos. Primeiramente, foram realizadas análises de difração de raios-X e microscopia eletrônica de varredura com o objetivo de caracterizar a topografia de superfície, porosidade e grau de cristalinidade de cada compósito. Posteriormente, foram realizados testes *in vivo* de biocompatibilidade e biodegradabilidade do compósito. Para tal, foram utilizados três coelhos que receberam, cada um, quatro implantes no subcutâneo de um mesmo compósito. O coelho número 1 recebeu quatro implantes referentes ao compósito 1 (HAP+FS). O coelho número 2 recebeu quatro implantes referentes ao compósito 2 (HAP+FS+1%AH). E por fim, o coelho número 3 recebeu quatro implantes referentes ao compósito 3 (HAP+FS+3%AH). Uma amostra de cada animal foi coletada em cada um dos dias 15, 30, 60 e 90 dias, após a cirurgia e processadas para avaliação histológica. Por fim, avaliou-se também a capacidade de osteocondução e osseointegração através da implantação dos compósitos 1, 2 e 3 em um defeito previamente criado no olecrano dos animais. As cirurgias de implantação no olecrano foram realizadas após divisão dos grupos experimentais, contendo 10 animais cada, em grupo tratado e controle, sendo o grupo controle não recebendo nenhum tipo de

tratamento. As avaliações clínicas foram realizadas durante os sete dias e depois aos 30 dias de pós-operatório. Radiografias dos membros operados foram realizadas no pós-operatório imediato, após sete e 30 dias de tratamento. Tomografia microcomputadorizada e as análises histológicas foram realizadas coletando-se as amostras aos sete e 30 dias de implantação do compósito no tecido ósseo e a microscopia eletrônica de varredura somente após 30 dias de implantação. Os resultados das análises de difração de raios-X revelaram três compósitos de alta cristalinidade, e as imagens de microscopia eletrônica de varredura demonstraram que o compósito HAP+FS+3%AH possuía uma topografia mais complexa e porosa, em relação aos outros dois compósitos HAP+FS e HAP+FS+1% AH, demonstrando ser uma superfície ideal para a adesão e proliferação celular. Ao teste de biocompatibilidade, os três compósitos apresentaram integração com o tecido, com proliferação tecidual, fragmentação do compósito e, ao final da avaliação, observou-se a formação de um tecido fibroso organizado ao redor do biomaterial. As avaliações clínicas demonstraram um compósito biocompatível e tolerado pelos animais, e as radiografias dos grupos tratados demonstraram diminuição da radiopacidade óssea, tornando-se semelhante ao osso adjacente aos 30 dias de pós-operatório. A tomografia microcomputadorizada demonstrou, através de imagens tridimensionais, uma perda maior na regularidade da borda do defeito no grupo tratado com HAP+FS+3%AH em comparação com os outros grupos, sugestivo de crescimento de tecido ósseo e demonstrando ser o melhor compósito para o tratamento do ponto de vista dessa análise. A histopatologia e a microscopia eletrônica de varredura revelaram uma interação compósito e tecido, com a formação de tecido ósseo ao redor do implante e a análise histomorfométrica revelou quantidade maior de trabéculas ósseas jovens no grupo tratado com HAP+FS+3%HA, demonstrando ser o melhor tratamento utilizado neste estudo para os defeitos criados nos olecranos de coelhos.

ABSTRACT

PERDIGÃO, Ana Paula Lima, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Composite of hydroxyapatite, silk fibroin and hyaluronic acid in experimental bonedefects in rabbits' ulna.** Adviser: Andrea Pacheco Batista Borges. Co-advisers: Emily Correna Carlo Reis and Fabrício Luciani Valente.

The lesions or bone loss are conditions that directly affect the quality of life of humans and animals. The repair process may not occur efficiently when there are unfavorable conditions. Some composites, polymers, and proteins are used to form matrices to promote higher efficiency in this repairing process. However, the biomaterials used today in the treatment of these diseases still have some properties so that these biomaterials could be suitable for use. The objective of this work was to evaluate the reparative potential of the composite consisting of hydroxyapatite (HAP) and fibroin silk (FS) in the presence of hyaluronic acid (HA) in different concentrations used for the treatment of experimental bone defects made in the rabbits ulna. First, diffraction of X-rays and scanning electron microscopy analyzes were performed in order to characterize the surface topography, porosity and degree of crystallinity of each composite. Later, *in vivo* biocompatibility and biodegradability of the composite tests were performed. To this end, three rabbits were used who received each four implants into the subcutaneous tissue of the same composite. The number one rabbit received four implants for the composite 1 (HAP + FS). The number 2 rabbit received four implants for the composite 2 (HAP + FS + 1% AH). Finally, the rabbit number 3 received four implants for the composite 3 (HAP + FS + 3% AH). A sample of each animal was collected in each of days 15, 30, 60 and 90 days after surgery and processed for histological evaluation. Finally, we assessed whether her ability to osteoconductive and osseointegration through the deployment of composite 1, 2 and 3 in a defect previously created in the olecranon animals. The implementation of the olecranon surgeries were performed after division of experimental groups of 10 animals each, in treated and control group, and the control group not receiving any kind of treatment. Clinical evaluations were performed 7 days and then at 30 days postoperatively. X-rays of operated limbs were performed in the immediate postoperative period, after 7 and 30 days of treatment. The microcomputadorizada tomography and

histological analyzes were performed by collecting samples at seven and 30 days of composite implantation into bone tissue and scanning electron microscopy only after 30 days of implantation. The results of the analysis of diffraction X-rays revealed three composite of high crystallinity, and scanning electron microscopy pictures show that the composite HAP + FS + 3% HA had a more complex porous topography another two composites HAP + FS e HAP+FS+ 1% AH, proving to be an ideal surface for cell adhesion and proliferation. When biocompatibility test, the three composites showed integration with the tissue with tissue proliferation, composite fragmentation and at the end of the evaluation was observed the formation of an organized fibrous tissue around the biomaterial. Clinical evaluations demonstrated a biocompatible composite tolerated by the animals, and radiographs of the treated groups showed decreased bone radiopacity, making it similar to the adjacent bone at 30 days postoperatively. The microcomputadorizada tomography demonstrated by means of three-dimensional images, a greater loss in the defect edge regularly in the group treated with HAP + FS + 3% HA in comparison with other groups, suggestive of bone growth and demonstrated to be the best composite to treating point of view this analysis. Histopathology and scanning electron microscopy revealed a composite and tissue interaction with the formation of bone tissue around the implant and histomorphometric analysis revealed a greater number of young trabecular bone in the group treated with PAH + FS + 3% HA, proving to be the best treatment used in this study for defects created in rabbits ulna.

CAPITULO I

Engenharia tecidual óssea e os biomateriais: caracterização, aplicação e perspectivas.

PERDIGÃO, A.P.L. *et al.*

RESUMO

A hidroxiapatita é um biomaterial com alta biocompatibilidade, sendo largamente explorada pela engenharia de tecidos. Possui também uma compatível taxa de degradação e osteocondutividade. Associada à fibroína da seda, as características mecânicas de ambos os biomateriais se tornam complementares, com o aumento da flexibilidade e resistência fornecida pelo polímero. O ácido hialurônico por sua vez é caracterizado como um importante componente da matriz extracelular e presente em todos os tecidos conjuntivos, exercendo uma função essencial na estrutura, organização e homeostase dessa matriz e das proteínas plasmáticas, importantes no processo de reparação óssea. Com o intuito de melhorar as características físicas e químicas dos biomateriais utilizados no tratamento das lesões ósseas, ele foi incorporado ao compósito por possuir diversas funções dentre elas de sinalizar e recrutar células que participam do processo de reparação tecidual. Este capítulo tem por objetivo descrever, através de uma revisão bibliográfica, as inovações apresentadas nas pesquisas que envolvem estudos na área da engenharia tecidual óssea, bem como caracterizar os biomateriais aplicados em forma de compósito, os quais foram avaliados durante esse trabalho.

Palavras-chave: regeneração óssea, engenharia de tecidos, compósitos, hidroxiapatita.

Bone tissue engineering and biomaterials: characterization, and application perspectives.

PERDIGÃO, A.P.L., *et al.*

ABSTRACT

Hydroxyapatite is biomaterials with high biocompatibility, being widely exploited for tissue engineering. It also has a compatible rate of degradation and osteoconductivity. Associated with silk fibroin, the mechanical characteristics of both biomaterials become complementary, with increased flexibility and toughness provided by the polymer. The hyaluronic acid in turn is characterized as an important component of the extracellular matrix and present in all connective tissues, exerting a key role in the structure, organization and homeostasis of this matrix and plasma, important proteins in the bone repair process. In order to improve the physical and chemical characteristics of biomaterials used in the treatment of bone lesions, it was incorporated into the composite by having different functions among them to signal and recruit cells that participate in tissue repair process. This chapter aims to describe, through a literature review, the innovations presented in the research involving bone tissue engineering as well as characterize biomaterials applied in the form of composite, which were evaluated during this work.

Key words: bone regeneration, tissue engineering, composites, hydroxyapatite.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, os estudos relacionados à ortopedia e regeneração óssea tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária estão bastante avançados. Porém, ainda há muitos desafios a serem vencidos e são esses desafios que impulsionam o desenvolvimento nas pesquisas e ampliam as expectativas em se criar um modelo de tratamento ideal que promova a regeneração de maneira eficiente. Dessa forma, os processos de reparação tecidual óssea tem sido o objetivo de diferentes procedimentos cirúrgicos desde a antiguidade até os dias atuais. A multidisciplinar engenharia de tecidos promove a aplicação de princípios e métodos da engenharia e das ciências da saúde para dar suporte e auxiliar o reparo de tecidos defeituosos ou danificados, acelerando esse processo (Tabata, 2009).

O elevado conhecimento diante do comportamento dos tecidos em condições fisiológicas, principalmente a compreensão científica sobre a composição natural óssea, fosfatos de cálcio e atuação biológica dos polímeros promovem uma fonte de grande interesse devido a esses méritos biomédicos (Yang *et al.*, 2015).

Assim, este trabalho tem por objetivo, por meio de uma revisão, ampliar os conhecimentos na área da bioengenharia, caracterizando métodos e processos de reparação tecidual na presença de compósitos elaborados, bem como avaliar e comparar as propriedades físico-químicas dos biomateriais descritos durante essa revisão bibliográfica.

2. ENGENHARIA TECIDUAL ÓSSEA

Uma das áreas emergentes no ramo das pesquisas é a engenharia de tecidos que desempenha um papel vital na medicina regenerativa. Trata-se de um campo interdisciplinar e multidisciplinar que visa o desenvolvimento de substitutos biológicos que restauram, mantêm ou melhoram a função do tecido bem como ampliam a qualidade de vida tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária (Ma, 2008; Guo *et al.*, 2015).

O processo natural de reparação óssea é suficiente para efetuar restauração oportuna da integridade do tecido para a maioria das fraturas ou injúrias teciduais, quando há um ambiente hormonal, metabólico e mecânico apropriado ou quando esse ambiente é desenvolvido por enxertos fixadores ou pelo processo de incorporação de enxertos, como, por exemplo, o osso esponjoso (Cancedda *et al.*, 2003). Os enxertos

ósseos autógenos são considerados os de primeira escolha na regeneração tecidual óssea, devido às suas propriedades osteogênicas, por não transmitirem doenças infecciosas e não desencadearem reações imunológicas. No entanto, a disponibilidade deste tipo de enxerto é restrita, havendo a necessidade de dois procedimentos cirúrgicos, podendo ainda ocorrer infecção no sítio doador, complicação que pode onerar os tratamentos (Zhang *et al.*, 2009). Diante dessas limitações, os aloenxertos (compostos de materiais de outro indivíduo da mesma espécie) e os xenoenxertos (materiais obtidos de outra espécie) surgiram como possíveis substitutos. Entretanto, eles também apresentam limitações importantes, como risco de rejeição ou de transmissão de doenças e quantidade ofertada limitada (Precheur, 2007).

A engenharia de tecidos tem emergido como uma promissora abordagem alternativa no tratamento de tecidos lesionados. Nesse contexto, terapias alternativas, como a utilização de biomateriais, podem ser utilizadas como um substrato que promove tanto a adesão de células implantadas, como um suporte físico para orientar a formação de novos tecidos. Para tal, o biomaterial deve ser biocompatível, biodegradável, altamente poroso, mecanicamente forte, maleável e, dessa forma, facilitar a adesão das células e promover o crescimento celular, (Chen *et al.*, 2002).

Em face de tais necessidades e limitações dos materiais hoje disponíveis, os estudos envolvidos nessa área são direcionados a procurar substitutos para o tecido ósseo que têm por função ocupar o espaço, mantendo redução apropriada e continuidade dos fragmentos ósseos, permitindo a adequada regeneração (Borges *et al.*, 2000; Boeret *et al.*, 2003). A aplicação de biomateriais sintéticos na regeneração do tecido ósseo, como uma alternativa aos enxertos ósseos, é relevante, pois eles pouco danificam tecidos saudáveis, não aumentam os riscos de contaminações virais e bacterianas, além de serem disponibilizados comercialmente. Podem, ainda, ser de fácil dissolução e absorção, ao mesmo tempo em que permitem e estimulam a formação óssea (Wanet *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2009). Algumas características são de extrema importância à aplicação desses compostos, uma vez que a reparação do tecido ósseo é complexa e exige algumas propriedades relevantes do material implantado. A avaliação da biocompatibilidade é importante, pois demonstra a resposta do organismo na presença de um material específico na interface do material com o tecido (ElBatal *et al.*, 2003). A biodegradabilidade está relacionada diretamente com a cristalinidade e a dureza do biomaterial. Quando mais duro e mais cristalino for, maior é o tempo de degradação do mesmo (Reis *et al.*, 2009a). Em especial, os biomateriais utilizados devem possuir características peculiares como biocompatibilidade, biodegradabilidade e

osteocondução a fim de garantir e promover o resultado esperado com o tratamento utilizado (Liu e Peter, 2004).

Diversos materiais têm sido empregados em defeitos ósseos, como o enxerto mineralizado ou desmineralizado liofilizado (Gomes *et al.*, 2007), as cerâmicas biocompatíveis e os polímeros (Carlo *et al.*, 2009a) além dos vidros bioativos (Tiomiset *et al.*, 2010).

O impacto da tecnologia de materiais avançados no campo de biomateriais é triplo. Novos tipos de materiais e compósitos podem ser criados com combinações de propriedades físicas e biológicas não possíveis de se obter anteriormente, novas técnicas de caracterização de biomateriais e suas interfaces estão agora disponíveis e métodos de previsão de tempo de vida em serviço dos materiais e próteses estão se tornando acessíveis. Contudo, permanece o desafio no uso de biomateriais que é a criação de um material que substitua o tecido vivo em sua plenitude, isto é, possua a capacidade de crescimento e reparação (Oréficeet *et al.*, 2006).

Neste contexto, por definição, biomaterial é qualquer substância ou combinação de substâncias, naturais ou não, que não sejam drogas ou fármacos, utilizado em aplicações biomédicas e que interagem com sistemas biológicos, que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo (VonRecumet *et al.*, 1995). Deve ser implantado e incorporado podendo servir ou não como matriz, veículo, suporte ou estimulador para o crescimento de novo tecido, onde houve perda de matéria viva ou de sua função. Torna-se assim evidente que os requisitos mecânicos de biocompatibilidade e biodegradabilidade variem de aplicação para aplicação (Cao e Wang, 2009).

A biocompatibilidade, o desempenho dos biomateriais e a resposta dos tecidos vivos à presença de materiais estranhos são influenciados pelas características intrínsecas dos materiais, pelas condições do paciente (idade, sexo, estado geral de saúde, estilo de vida, etc.) e pela qualidade das intervenções médicas (Silva, 2008). Por isso, a composição química, estrutura física, e porções biologicamente funcionais são todos atributos importantes dos biomateriais para a engenharia de tecidos (Ma, 2008).

Para a regeneração óssea, estudos têm-se centrado no desenvolvimento de nanopartículas inorgânicas reforçadas por biomateriais poliméricos (Kim *et al.*, 2014; Hickeyet *et al.*, 2015). Os compósitos promoveram grandes vantagens no que se refere à estrutura biomimética, osteocondutividade e resistência mecânica. Para melhorar ainda mais a capacidade de reparação do tecido, sugere-se a participação de fatores de

crescimento que podem ser empregados juntamente com os compósitos biomiméticos (Guo *et al.*, 2015).

Deste modo, essa ciência objetiva criar e aprimorar novas terapias e desenvolver novos biomateriais que restaurem, melhorem ou impeçam o agravamento da função tecidual comprometida (Kaigler *et al.*, 2001; Sachlos e Czernuszka, 2003; Marins *et al.*, 2004).

3. HIDROXIAPATIA (HAP)

A grande classe de biomateriais, as cerâmicas bioativas, compostas principalmente pela hidroxiapatita (HAP) e fosfatos de cálcio, vem sendo altamente utilizadas nos procedimentos para reparação óssea. Elas apresentam osteocondutividade e biocompatibilidade apropriadas, devido à fase química e estrutural similar com a fase mineral óssea. A HAP é um biomaterial osteocondutor, uma vez que a superfície de sua estrutura é irregular e complexa, facilitando a adesão e a proliferação celular. Adicionalmente, possui características que podem ser amplamente exploradas pois é um material extremamente biocompatível já que cerca de 65% em peso de osso é feito de HAP (Okamoto e John, 2013).

A HAP pertence ao grupo das cerâmicas de fosfato de cálcio. Sua estrutura química é representada pela fórmula $C_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, com razão Ca/P de 1,67, podendo ter origem nos corais e algas, ser derivado de mineral ósseo natural ou ainda desenvolvido sinteticamente (Schmitz *et al.*, 1999).

Quando sintetizada em laboratório fica livre de impurezas que retardam a osteogênese. Além disso, o tamanho, a forma e a porosidade do produto podem ser controlados e pré-determinados (Borges, 1998). É uma das cerâmicas mais biocompatíveis devido à semelhança com os constituintes minerais dos ossos e dentes humanos (Fook *et al.*, 2010). É um biomaterial, bioativo e osteocondutor, ou seja, tem a capacidade de servir como suporte para o crescimento de novo osso assim como novos vasos sanguíneos (Borges *et al.*, 2000; Franco *et al.*, 2001; Boer *et al.*, 2003; Duarte *et al.*, 2006; Vital *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2012). Pode ser reabsorvível quando fabricada pela sinterização (Fujita *et al.*, 2003) ou pela calcinação (Borges *et al.*, 2000).

Entretanto, uma avaliação importante deve ser considerada no que se refere as propriedades mecânicas dos biomateriais. Essas características podem influenciar significativamente a osteointegração entre os implantes e os tecidos circundantes, bem como os comportamentos de células. A taxa de degradação e os subprodutos de

materiais biodegradáveis também devem ser considerados, pois são críticos no papel de regeneração óssea. Nesse contexto, a integridade mecânica de um biomaterial será significativamente reduzida se a taxa de degradação for rápida, resultando assim eliminação do biomaterial antes da regeneração tecidual acontecer (Wu *et al.*, 2014). Além da osteocondução, o processo de reabsorção da hidroxiapatita contribui para que ela seja um excelente substituto para o tecido ósseo, uma vez que é realizada por osteoclastos, com as mesmas características que ocorre no processo natural de remodelação óssea (Borges *et al.*, 2000; Rumpel *et al.*, 2006). Quando implantada em tecidos moles, como subcutâneo, ela é encapsulada por tecido conjuntivo fibroso apresentando lenta reabsorção (Carlo *et al.*, 2007), o que pode torná-la útil em cirurgias reconstrutivas para promover correção de depressões congênitas ou traumáticas.

Estudos têm centrado em replicar as propriedades mecânicas da hidroxiapatita que são anisotrópicas ao osso, por meio do uso do biomaterial em forma de placas ou de partículas de HAP (Converse *et al.*, 2007), e também, são feitos estudos com a utilização de nanopartículas para melhorar o reforço mecânico, a distribuição e aumentar a atividade biológica (Shi *et al.*, 2009).

A nanohidroxiapatita (nHAP) pode ter outras propriedades especiais devido ao seu pequeno tamanho e grande área superficial específica. Um aumento significativo de adsorção de proteínas e adesão de osteoblastos sobre os materiais cerâmicos nanométricos foi relatado por Webster *et al.* (2000).

Os nanocompósitos baseados em partículas e biopolímeros com HAP têm atraído a atenção por sua boa osteocondutividade, osteoindutividade, biodegradabilidade e elevada resistência mecânica (Okamoto e John, 2013). GHANNAM *et al.* (2004) reproduziram uma escala do tamanho de HAP encontrada nos tecidos ósseos e mostrou que a incorporação de nHAP melhorou as características mecânicas e de adsorção de proteína dos compósitos suportes, mantendo simultaneamente uma elevada porosidade e microarquitetura adequadas.

Contudo, a HAP não possui coesão nem resistência mecânica e tenacidades suficientes para ser usada na fabricação de implantes ou na utilização em locais que requeiram sustentação de peso, pois é um material duro, com baixa capacidade de deformação, o que a torna frágil, especialmente em ambientes úmidos sob condições fisiológicas (Carlo *et al.*, 2009(b); Li *et al.*, 2013). Além disso, a migração de partículas para fora do defeito ósseo é um problema comum (Borges *et al.*, 2000; Rupprecht *et al.*, 2003).

Assim, para minimizar ou até eliminar esses problemas, ou seja, reduzir sua dureza e promover a coesão entre as partículas, a principal abordagem estudada é a formação de compósitos de HAP com polímeros (Carlo *et al.*, 2009(a); Carlo Reis *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013).

4. FIBROÍNA DA SEDA (FS)

As sedas são polímeros protéicos, produzidos na forma de fibras por alguns artrópodes, que as utilizam para diversas funções, como estrutura de suporte, reprodução e captura de alimentos (Altman *et al.*, 2003; Hakimi *et al.*, 2007). As sedas mais estudadas são as produzidas pelo bicho-da-seda domesticado. São produzidas no interior de glândulas especializadas, onde são armazenadas e posteriormente processadas na forma de fibras (Altman *et al.*, 2003). A seda produzida pelo bicho-da-seda domesticado é composta por dois tipos de proteínas: (1) fibroína, apresentada em forma de filamentos de seda e (2) sericina, proteína que envolve os filamentos. A organização estrutural da fibroína possui regiões cristalinas dispostas em folha- β e regiões amorfas, responsáveis pela elasticidade da seda (Altman *et al.*, 2003). Ambas as proteínas apresentam estruturas e propriedades completamente diferentes devido à composição de aminoácidos diferentes. Fibroína da seda, não se dissolve em água, devido aos aminoácidos hidrofóbicos incluindo glicina e alanina, ao passo que a sericina da seda é hidrófilo e mais viscoso (Ko *et al.*, 2013). Alguns casos de hipersensibilidade à seda já foram relatados e atribuídos à sericina, porém sabe-se que se a mesma for retirada, é possível obter amostras adequadas para utilização como biomaterial (Altman *et al.*, 2003).

A Fibroína da seda (FS) pode ser manipulada em diversos formatos (filmes, fibras, redes, malhas, membranas, fios e esponjas), funcionando como um suporte para adesão celular *in vitro*, além de promover a reparação de tecidos *in vivo* (Wang *et al.*, 2006). É um polímero que se tornou alvo de pesquisa para aplicações biomédicas e biotecnológicas, principalmente por apresentar propriedades adequadas como: elasticidade, flexibilidade e resistência a tensão; biocompatibilidade e biodegradabilidade; permeabilidade e fácil absorção; mobilização de enzimas; baixa trombogenicidade e mínima resposta inflamatória; estabilidade térmica; oxigenação adequada e propriedade hemostática (Hardy *et al.*, 2008; Kundu *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2012; Ko *et al.*, 2013). Além disso, o aumento da capacidade de controlar a morfologia e estrutura molecular desse polímero, através de inúmeras opções de processamento e modificação de superfície, expandiu sua utilidade e ampliou suas aplicações como biomaterial em diversas áreas da medicina,

sendo alvo das pesquisas no ramo da engenharia de tecidos (Wang *et al.*, 2006; Correia *et al.*, 2012).

Chao *et al.* (2010) publicaram dados que sugerem que os hidrogéis de seda podem ser utilizadas como uma ferramenta para o estudo dos fatores e mecanismos relacionados na formação da cartilagem, bem como um biomaterial tolerável e totalmente degradável para engenharia de tecidos de cartilagem. Já em 2011, Saitow *et al.*, utilizaram um biomaterial à base de seda para determinar a capacidade da aplicação de enxertos vasculares heparinizados em promover a formação de elastina. Os biomateriais de seda também têm sido estudados como suporte para a mobilização de enzimas, cicatrização de feridas e na regeneração de ossos (Vepari *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2012). Adicionalmente, estudos mostram a participação desse polímero na distribuição de medicamentos (Wang *et al.*, 2009), reparação de feridas (Zhou *et al.*, 2013), tratamentos de pele (Bellas *et al.*, 2012), entre outras aplicações.

5. ÁCIDO HIALURÔNICO (AH)

O ácido hialurônico foi descoberto, após o isolamento no corpo vítreo de bovinos (Meyer e Palmer, 1934), mas a sua estrutura foi apenas determinada cerca de vinte anos depois, em 1958. Ambos propuseram o nome, vindo da junção entre o termo grego hialóide (vítreo) e ácido urônico. O AH é frequentemente referenciado por hialuronato. Isso se deve ao fato de que, sob condições fisiológicas, essa molécula está presente na forma de um poliânion (hialuronato de sódio) e não de um ácido (McDonald e Hascall, 2002). Estruturalmente, o AH é descrito como um polissacarídeo linear formado a partir de unidades alternadas dos dissacarídeos *N*-acetil-glicosamina e ácido *D*-glicurônico, ligadas entre si por meio de ligações glicosídicas β 1,4 e β 1,3 e pode atingir um peso molecular que varia entre 10^4 e 10^7 DA (Kogan *et al.*, 2007).

A síntese das moléculas de AH ocorrem na membrana plasmática das células, que possuem proteínas enzimáticas integradas chamadas hialurônico sintetases. Em mamíferos, essas enzimas apresentam três formas que são expressas e denominadas: *hyaluronic acid synthases 1* (HAS-1), *hyaluronic acid synthases 2* (HAS-2) e *hyaluronic acid synthases 3* (HAS-3). As HAS catalisam o AH através de adições repetitivas dos dissacarídeos descritos acima, promovendo o alongamento da cadeia, e à medida que é sintetizado, o produto final é extraído da membrana para o espaço extracelular (Itano e Kimata, 2002).

Em contrapartida, a degradação do AH é regulado por uma classe de enzimas denominadas hialuronidase (HYALs) que podem ser diferenciadas de acordo com suas atividades bioquímicas e seus produtos de degradação (Kreil, 1995).

O AH é um dos glicosaminoglicanos mais onipresentes em nosso corpo. Sob condições fisiológicas, interage com outras macromoléculas tais como o colágeno para promover a formação da matriz extracelular (Tsai *et al.*, 2006). Essas e outras interações ocorrem por meio de diversos receptores de membranas descritos, dentre eles o CD44 e RAHMM (Receptor de AH mediador da mobilidade), sendo o CD44 presente na maioria dos tipos celulares e, portanto, o mais estudado (Turley *et al.*, 2002). Esse receptor, uma vez ativado, é responsável por diversos efeitos biológicos, tais como modulação dos processos angiogênicos (Slevin *et al.*, 2009), indução da expressão de metaloprotease pró-inflamatória (Morra, 2005), e aumento da motilidade e distribuição celular (Lindwall *et al.*, 2013). É um componente essencial da matriz extracelular e exerce muitos papéis importantes na formação e reparo dos tecidos, atuando na proliferação e migração celular (Jha *et al.*, 2011). Também atua na manutenção da homeostase da matriz extracelular e das proteínas plasmáticas (Lisignoli *et al.*, 2005). Durante a fase inicial inflamatória da cicatrização, uma grande quantidade de AH acumula-se na ferida e passa a modular a resposta inflamatória e a atividade dos fibroblastos (Chen e Abatangelo, 1999).

Huang *et al.* (2006) demonstraram, em cultura de células mesenquimais derivadas da calota craniana de ratos, que o AH foi capaz de induzir a proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos. Sasaki *et al.* (1995) observaram que o AH acelerou a formação de novo osso por meio da diferenciação e migração de células mesenquimais, em defeitos ósseos criados em ratos. Aslan *et al.* (2006), utilizando o modelo de reparo ósseo em tibia de coelho, verificaram que a associação de enxertos com o gel de AH apresentou maior formação óssea que os defeitos tratados somente com enxerto. Dessa forma e considerando suas características não-imunogênicas, o AH vem sendo utilizado no tratamento de doenças degenerativas e inflamatórias das articulações e dos ossos (Echigo *et al.*, 2006; Nganvongpanit *et al.*, 2013)

Tendo em vista a importância do seu papel exercido no processo de cicatrização, formação e reparo dos tecidos, as propriedades físicas e bioquímicas do AH, em associação com os outros biomateriais, são adequadas para que o mesmo desenvolva papel importante nos eventos iniciais do processo de reparação óssea, promovendo a formação de um microambiente mais favorável para a migração e adesão celulares, que culmine com a formação de matriz óssea.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os grandes defeitos e falhas ósseas ocorrem em situações em que a perda de osso é causada por doença, trauma ou ressecção de tumor e, dessa forma, representam um problema em cirurgias reconstrutivas, principalmente quando os processos de reparação e de remodelação estão prejudicados clinicamente nos pacientes. A necessidade de novos materiais mais acessíveis e novas técnicas para utilização na medicina humana e veterinária é evidente, sendo os modelos experimentais em animais, essenciais para uma aplicação segura e eficaz de tais técnicas.

O objetivo da medicina regenerativa é reparar e regenerar tecidos danificados e, através da elaboração de biomateriais realizada pela engenharia de tecidos, os utiliza, também forma de compósitos, como auxílio no tratamento desses tecidos. Estes são utilizados para mimetizar as funções biológicas da estrutura tecidual e da matriz extracelular que a compõe, ocorrendo naturalmente em condições fisiológicas. Os biomateriais devem desempenhar também um papel importante no quadro estrutural do tecido, conduzindo à adesão celular e a secreção de proteínas da matriz extracelular para apoiar a regeneração do tecido danificado (Kim *et al.*, 2015).

Além disso, a associação de materiais visando o agrupamento de características ideais complementares nos tratamentos para regeneração tecidual óssea está sendo pesquisada a cada dia mais se tornando uma alternativa promissora para a evolução da engenharia de tecidos. Polímeros e cerâmicas, especialmente, têm uma participação abrangente nesses estudos.

A adição de materiais orgânicos pode modificar e melhorar as propriedades mecânicas bem como as taxas de degradação dos materiais (Wu *et al.*, 2014). A fibroína da seda (FS) é um polímero que apresenta propriedades mecânicas únicas, além de possuir fatores de adesão e alta capacidade de adaptar ao ambiente em que é implantada. Dessa forma, é possível realizar estudos adicionais para a exploração dessa família de proteínas fibrosas e suas aplicações como biomateriais (Altman *et al.*, 2003). Wang *et al.* (2010) relataram excelentes resultados com a união da hidroxiapatita com o polímero fibroína da seda, devido a uma interação que ocorre entre as estruturas desses biomateriais, o que favorece ainda mais o processo de mineralização, similar ao tecido ósseo. Além disso, a FS é considerada um polímero importante no processo de biomineralização e para a engenharia de tecido ósseo por induzir a formação de apatita nas superfícies de proteínas em de soluções que se assemelham ao fluido corporal e por apresentar propriedades significativas de biocompatibilidade (Kirschbauer, 2009; Zhang *et*

al., 2009). Tais fatos levantam o interesse dos pesquisadores e o desenvolvimento de biomateriais que explorem essas associações com o intuito de melhorar a aplicabilidade desses compósitos promovendo pesquisas nessa área do conhecimento.

Estudos demonstram excelentes resultados da regeneração óssea com a associação das propriedades mecânicas da FS (Kim *et al.*, 2005) com as excelentes características de osteocondução e bioatividade da HAP (Dorozhkin e Epple, 2002) em compósitos formados por esses dois biomateriais (Okabayashi *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2011; Kweon *et al.*, 2011). Em 2011, Bhumiratana *et al.*, criou um modelo experimental no qual incorporou HAP em suportes porosos de seda para avaliar a formação de tecido ósseo, o qual demonstrou a capacidade de adesão celular e osteocondução ao final da análise. Não só para melhorar a resistência mecânica da HAP, mas também por ser biocompatível, a FS pode ser trabalhada juntamente com a HAP para fornecer excelentes resultados para a regeneração tecidual óssea (Chen *et al.*, 2014). Outras pesquisas apresentadas por Yan *et al.* (2013), mostraram a associação da FS e do fosfato de cálcio na tentativa de produzir biomateriais adequados para aplicações envolvendo engenharia tecidual óssea.

Dessa forma, os estudos de avaliação biológica de compostos FS e HAP também se têm concentrado essencialmente na sua biocompatibilidade, a nível celular, a proliferação e a viabilidade das células a nível de tecido, e o uso como material de absorção e formação de osso novo (Lin *et al.*, 2015).

Além disso, um compósito aplicável utilizado na engenharia de tecidos deve não só possuir propriedades mecânicas apropriadas, estruturas porosas e biocompatibilidade que facilitem a adesão, crescimento e proliferação de células do tecido, mas também possuir capacidade de liberação de fatores bioativos para proporcionar um ambiente mais favorável para a indução do crescimento tecidual (Lu *et al.*, 2007). Dessa forma, os compósitos produzidos deverão também promover um espaço adequado para o crescimento de células e tecidos novos, adesão dos fatores de crescimento envolvidos, bem como uma excelente interação tecidual com as células hospedeiras (Wu *et al.*, 2014). A incorporação de produtos biológicos tais como citocinas e fatores de crescimento em compósitos é uma área de pesquisa em expansão, servindo de interesse para pesquisadores que trabalham na área de regeneração de tecidos. (Fuentes *et al.*, 2009).

Contudo, novas pesquisas utilizando compósitos multifuncionais são importantes e necessárias, na tentativa de se desenvolver e criar novos produtos que permitam regeneração tecidual semelhante à regeneração fisiológica, associando a biocompatibilidade a osteocondutividade, a regulação e a expressão celular de diferentes

materiais, acelerando e amenizando efeitos adversos durante a recuperação dos pacientes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTMAN, G.H.; DIAZ, F.; JAKUBA, C.; CALABRO, T.; HORAN, R.L.; CHEN.J.LU, H.; RICHMOND, J.; KAPLAN, D.L. Silk-based biomaterials. **Biomaterials**, v. 24, p. 401-416, 2003.
- ASLAN, M.; SIMSEK, G. e DAYI, E. The effect of hyaluronic acid supplemented bone graft in bone healing: experimental study in rabbits. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 20, p. 209-220, 2006.
- BELLAS, E.; SEIBERG, M.; GARLICK, J.; KAPLAN, D.L. In vitro 3D Full- Thickness Skin-Equivalent Tissue Model Using Silk and Collagen. **Biomaterials Macromolecules Bioscience**, v. 12, p. 1627–1636, 2012.
- BHUMIRATANA, S.; GRAYSON, W.; CASTANEDA, A.; ROCKWOOD, D.; GIL, E.S.; KAPLAN, D.L.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Nucleation and Growth of Mineralized Bone Matrix on SilkHydroxyapatite Composite Scaffolds. **Biomaterials**, v. 32, p. 2812-2820, 2011.
- BOER, F.C.; WIPPERMANN, B.W.; BLOKHUIS, F.J.; PATKA, P.; BAKKER, F.C; HAARMAN, H.J.T.M. Healing of segmental bone defects with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenicprotein-1 ou autologous bone marrow. **Journal of Orthopaedic Research**, v.21, p. 521-528, 2003.
- BORGES, A.P.B. O efeito da hidroxiapatita sintética na regeneração óssea de defeito provocado experimentalmente no terço proximal da tíbia de cães: estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico por microscopia de luz e microscopia eletrônica de retrodisperção. 1998. **Tese de Doutorado**- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- BORGES, A.P.B.; REZENDE, C.M.F.; RIBEIRO, M.F.B.; MELO, E.G.; NETO, P.I.N. Hidroxiapatita sintética (HAP-91) como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia em cão: aspectos à microscopia eletrônica de transmissão. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, p. 616-620, 2000.
- CANCEDDA, R.; DOZIN, B.; GIANONNI, P.; QUARTO, R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. **Matrix Biology**, v. 22, p. 81-91, 2003.

- CAO, Y. e WANG, B. Biodegradation of Silk biomaterials. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 1514-1524, 2009.
- CARLO, E.C.; BORGES, A.P.B.; REZENDE, C.M.F.; MOREIRA, J.C.L.; FONSECA, C.C.; PONTES, K.C.S.; DUARTE, T.S. Avaliação do efeito osteoindutor da hidroxiapatita e do biovidro implantados em tecido subcutâneo de cão. **Revista Ceres**, v. 54, p. 492-500, 2007.
- CARLO, E.C.; BORGES, A.P.B.; DEL CARLO, R.J.; MARTINEZ, M.M.M.; OLIVEIRA, P.M.; MORATO, G.O.; ELEOTÉRIO, R.B.; REIS JÚNIOR, M.S. Comparison of in vivo properties of hydroxyapatite/polyhydroxybutyrate composites assessed for bone substitution. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 20, p. 853-859, 2009 (a)
- CARLO, E.C.; BORGES, A.P.B.; VARGAS, M.V.I.; MARTINEZ, M.M.; ELÓTERIO, R.B.; DIAS, A.R.; RODRIGUES, M.C.D. Resposta tecidual ao compósito 50% hidroxiapatita: 50% poli-hidroxibutirato para substituição óssea em coelho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 844-852, 2009 (b)
- CARLO REIS, E.C.; BORGES, A.P.B.; OLIVEIRA, P.M.; BICALHO, S.M.C.M.; REIS, A.M.; SILVA, C.L. Desenvolvimento e caracterização de membranas rígidas, osteocondutoras e reabsorvíveis de polihidroxibutirato e hidroxiapatita para regeneração periodontal. **Polímeros**, v. 22, p. 73-79, 2012.
- CHAO, P.G.; YODMUANG, S.; WANG, X.; SUN, L.; KAPLAN, D.L.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Silk hydrogel for cartilage tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 95, p. 84-90, 2010.
- CHEN, G., USHIDA, T., TATEISHI, T. Scaffold Design for Tissue Engineering. **Macromolecular Bioscience**, v. 2, p. 67-77, 2002.
- CHEN, K.Y.; SHYU, P.C.; DONG, G.C.; CHEN, Y.S.; KUO, W. W.; YAO, C.H. Reconstruction of calvarial defect using a tricalcium phosphate-oligomeric proanthocyanidins cross-linked gelatin composite. **Biomaterials**, v. 30, p. 1682-1688, 2009.
- CHEN, L.; HU, J.; RAN, J.; SHEN, X.; TONG, H. Preparation and evaluation of collagen-silk fibroin/hydroxyapatite nanocomposites for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 65, p. 1-7, 2014.
- CHEN, W.Y.J. e ABATANGELO, G. Functions of hyaluronan in wound repair. **Wound Repair and Regeneration**, v. 7, p. 79-89, 1999.
- CONVERSE, G.L.; YUE, W.; ROEDER, R.K. Processing and tensile properties of hydroxyapatite whiskers reinforced polyetheretherketone. **Biomaterials**, v. 28, p. 927-935, 2007.

- CORREIA, C.; BHUMIRATANA, S.; YAN, L.; OLIVEIRA, A.L.; GIMBLE, J.M.; ROCKWOOD, D.; KAPLAN, D.L.; SOUSA, R.A.; REIS, R.L.; VUNJAK-NOVAKOVICA, G. Development of silk-based scaffolds for tissue engineering of bone from human adipose derived stem cells. **Acta Biomaterials**, v. 8, p. 2483-2492, 2012.
- DOROZHKIN, S.V. e EPPLE, M. Biological and medical significance of calcium phosphates. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, p. 3130-3146, 2002.
- DUARTE, T.S.; BORGES, A.P.B.; LAVOR, M.S.L.; FILGUEIRAS, R.; TSIMOIS, A.C.; OLIVEIRA F.L.; FONSECA, C.C.; PONTES, K.C.S. Osteointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães: aspectos histológicos. **Revista Ceres**, v. 58, p. 849-853, 2006.
- ECHIGO, R.; MOCHIZUKI, M.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N. Mechanisms of action and potential uses of hyaluronan in dogs with osteoarthritis. **Journal Veterinary Medicine Sciences**, v. 68, p. 899-902, 2006.
- ELBATAL, H.A.; AZOOZ, M.A.; KHALI, E.M.A.; MONEM, A.S.; HAMDY, Y.M. Characterization of some bioglass-ceramics. **Materials Chemistry and Physics**, v. 80, p. 599-609, 2003.
- FOOK, A.C.B.M.; APARECIDA, A.H.; FOOK, M.V.L. Desenvolvimento de biocerâmicas porosas de hidroxiapatita para utilização como scaffolds para regeneração óssea. **Revista Matéria**. v. 15, p. 392–399, 2010.
- FRANCO, K.L.; BORGES, A.P.B.; VILÓRIA, M.I.C.; FERNANDES, E.S.; FEHLBERG, A.F. Hidroxiapatita sintética pura, hidroxiapatita sintética associada ao colágeno e hidroxiapatita sintética associada ao lipossoma como substitutos ósseos em defeitos provocados na tíbia de cães: aspectos da osteointegração à microscopia de luz transmitida. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 431-436, 2001.
- FUENTES, M.G.; MEINEL, A.J.; HILBE, M.; MEINEL, L.; MERKLE, H.P. Silk fibroin/hyaluronan scaffolds for human mesenchymal stem cell culture in tissue engineering. **Biomaterials**, v. 30, p. 5068-5076, 2009.
- FUJITA, R.; YOKOYAMA, A.; KAWASAKI, T.; KOHGO, T. Bone Augmentation Osteogenesis Using Hydroxyapatite and Tricalcium Phosphate Blocks. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 61, p. 1045-1053, 2003.
- GHANNAM, A.E.; NING, C.Q.; MEHTA, J. Cyclosilicatenanocomposite: A novel resorbable bioactive tissue engineering scaffold for BMP and bone-marrow cell delivery. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 71A, p. 377-390, 2004.

- GOMES, K, PIPPI, N. L.; BRAGA, F.V.A.; KROLIKOWISKI, G.; SOARES, A.V.; PIGATTO, G.M.; POHL, V.H.; NOVOSAT, D.; BERTOLETTI, B.; MÖRSCHBÄCHER, P.D.; SOUZA, S.G.; DALMOLIN, F. Lyophilized inorganic bovine bone cancellous block for iatrogenic oronasal fistula repair in dogs. **Ciência Rural**, v. 31, p.1 59-164, 2007.
- GUO, B.; LEI, B.; LI P.; MA, P.X. Functionalized scaffolds to enhance tissue regeneration. **Regenerative Biomaterials**, v. 2, p. 47-57, 2015.
- HAKIMI, O.; KNIGHT, D.P.; VOLLRATH, F.; VADGAMA, P. Spider and mulberry silkworm silks as compatible biomaterials. **Composites: Part B**, v. 38, p. 324-337, 2007.
- HARDY, J.O.; ROMER, L.M. e SCHEIBEL, R.T. Polymeric materials based on silk proteins. **Polymer**, v. 49, p. 4309-4327, 2008.
- HICKEY, D.J.; ERCAN, B.; SUN, L.; WEBSTER, T.J. Adding MgO nanoparticles to hydroxyapatite–PLLA nanocomposites for improved bone tissue engineering applications. **Acta Biomaterialia**, v. 14, p. 175-184, 2015.
- HO, M.; WANG, H.; LAU, K. Effect of degumming time on silkworm silk fibre for biodegradable polymer composites. **Applied Surface Science**, v. 258, p. 3948-3955, 2012.
- HUANG, W.C.; CHENB, S. e CHENA, T. The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, p. 239-243, 2006.
- ITANO, N. e KIMATA, K. Mammalian Hyaluronan Synthases. **Iubmb Life**, v. 54, p. 195-199, 2002.
- JHA, A.K.; XU, X.; DUNCAN, R.L.; JIA, X. Controlling the adhesion and differentiation of mesenchymal stem cells using hyaluronic acid-based, doubly crosslinked networks. **Biomaterials**, v. 32, p. 2466-2578, 2011.
- KAIGLER, D., MOONEY, D. Tissue engineering's impact on dentistry. **Journal of Dental Education**, v. 65, p. 456-462, 2001.
- KIM, B.S.; PARK, K.E.; KIM, M.H.; YOU, H.K.; LEE, J.; PARK, W.H. Effect of nanofiber content on bone regeneration of silk fibroin/poly(ϵ -caprolactone) nano/microfibrous composite scaffolds. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 485-502, 2015.
- KIM, H.H.; PARK, J.B.; KANG, J.M.; PARK, Y.H. Surface-modified silk hydrogel containing hydroxyapatite nanoparticle with hyaluronic acid–dopamine conjugate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 70, p. 516-522, 2014.

- KIM, H. J.; KIM, U. J.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; MIN, B. H.; KAPLAN, D.L. Influence of macroporous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells. **Biomaterials**, v. 26, p. 4442-4452, 2005.
- KIRSCHBAUER, K.G. Mineralização in vitro de matrizes colagênicas derivadas de tendões calcâneos bovinos e de avestruz. 2009. 80f. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo. Instituto de Química, São Carlos.
- KO, J.S. YOON, K.; KI, C.S.; KIM, H.J.; BAE, D.G.; LEE, K.H.; PARK, Y.H.; UM, I.C. Effect of degumming condition on the solution properties and electrospinnability of regenerated silk solution. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 55, p. 161-168, 2013.
- KOGAN, G.; SOLTÉS, L.; STERN, R.; GEMEINER, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 17-25, 2007.
- KREIL, G. Hyaluronidases -A group of neglected enzymes. **Protein Science**, v. 4, p. 1666-1669, 1995.
- KUNDU, B. e KUNDU, S.C. Osteogenesis of human stem cells in silk biomaterial for regenerative therapy. **Progress in Polymer Science**, v. 35, p. 1116-1127, 2010.
- KWEON, H.Y.; LEE, K.G.; CHAE, C.H.; BALAZSI, C.; MIN, S.K.; KIM, J.Y.; CHOI, J.Y.; KIM, S.G. Development of nano-hydroxyapatite graft with silk fibroin scaffold as a new bone substitute. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 69, p. 1578-1586, 2011.
- LI, X.; WANG, LU.; FAN, Y.; FENG, Q.; CUI, F.; WATARI, F. Nanostructured scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 101A, p. 2424-2435, 2013.
- LIN, L.; HAO, R.; XIONG, W.; ZHONG, J. Quantitative analyses of the effect of silk fibroin/nano-hydroxyapatite composites on osteogenic differentiation of MG-63 human osteosarcoma cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, p. 591-595, 2015.
- LINDWALL, C.; OLSSON, M.; OSMAN, M.A.; KUHN, H.G.; CURTIS, M.A. Selective expression of hyaluronan and receptor for hyaluronan mediated motility (Rhamm) in the adult mouse subventricular zone and rostral migratory stream and in ischemic cortex. **Brain research**, v. 1503, p. 62-77, 2013.
- LISIGNOLI, G.; CRISTINO, S.; PIACENTINI, A.; TONEGUZZI, S.; GRASSI, F.; CARVALHO, C.; ZINI, N.; SOLIMANDO, L.; MARALDI, N. M.; FACCHINI, A. Cellular and molecular events during chondrogenesis of human mesenchymal stromal cells

- grown in a three-dimensional hyaluronan based scaffold. **Biomaterials**, v. 26, p. 5677-5686, 2005.
- LIU, X. E PETER, X. MA. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. **Annals of biomedical engineering**, v. 32, p. 477-486, 2004.
- LU, Q.; ZHANG, S.; HU, K.; FENG, Q.; CAO, C.; CUI, F. Cytocompatibility and blood compatibility of multifunctional fibroin/collagen/heparin scaffolds. **Biomaterials**, v. 28, p. 2306-2313, 2007.
- MA, P.X., Biomimetic Materials for Tissue Engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 184-198, 2008.
- MARINS, L. V.; CESTARI, T. M.; SOTTOVIA, A. D.; GRANJEIRO, J. M.; TAGA, R. Radiographic and histological study of perennial bone defect repair in rat calvaria after treatment with blocks of porous bovine organic graft material. **Journal of Applied Oral Science**, v. 12, p. 62- 69, 2004.
- MCDONALD, J. e HASCALL, V. C. Hyaluronan mini review series. **The journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 4575-4579. 2002.
- MEYER, K. e PALMER, J.W. The polysaccharide of the vitreous humor. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 107, p. 629–634, 1934.
- MORRA M. Engineering of biomaterials surfaces by hyaluronan. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 1205-1223, 2005.
- NGANVONGPANIT, K.; BOONSRI, B.; SRIPRATAK, T.; MARKMEE, P. Effects of one-time and two-time intra-articular injection of hyaluronic acid sodium salt after joint surgery in dogs. **Journal of veterinary science**, v. 14, p. 215-222, 2013.
- OKABAYASHI, R.; NAKAMURA, M.; OKABAYASHI, T.; TANAKA, Y.; NAGAI, A.; YAMASHITA, K. Efficacy of polarized hydroxyapatite and silk fibroin composite dressing gel on epidermal recovery from full-thickness skin wounds. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials**, v. 90B, p. 641-646, 2009.
- OKAMOTO, M. e JOHN, B. Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 1487-1503, 2013.
- OREFICE, R. L.; PEREIRA, M.M. e MANSUR, H.S. **Biomateriais-Fundamentos e Aplicações**. Rio de Janeiro, 2006.548p.
- PRECHEUR, H. V. Bone graft materials. **The Dental Clinics of North American**, v. 51, p. 729-746, 2007.

- RUMPEL, E.; WOLF, .E.; KAUSCHKE, E.; BIENENGRBER, V.; BAYERLEIN, T.; GEDRANGE, T.; PROFF, P. The biodegradation of hydroxyapatite bone graft substitutes *in vivo*. **Folia morphologica**, v. 65, p. 43-48, 2006.
- RUPPRECHT, S.; MERTEN, H.A.; KESSLER, P.; WILTFANG, J. Hydroxyapatite cement (BoneSource™) for repair of critical sized calvarian defects- an experimental study. **Journal Cranio- Maxillofacial Surgery**, v.3, p. 149-153, 2003.
- SACHLOS, e CZERNUSZKA, J.T. Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. **European Cells and Materials**, v. 5, p. 29-40, 2003.
- SAITOW, C.; KAPLAN, D.L. e CASTELLOT, J.J.J. Heparin stimulates elastogenesis: Application to silk-based vascular grafts. **Matrix Biology**, v. 30, p. 346-355, 2011.
- SASAKI, T. e WATANABE, C. Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid. **Bone**, v.16, p. 9-15,1995.
- SCHMITZ, J.P.; HOLLINGER, J.O. e MILAM, S. B. Reconstruction of bone using calcium phosphate bone cements: a critical review. **Journal Oral MaxillofacialSurgery**, v. 57, p. 1122-1126, 1999.
- SHI, Z.; HUANG, X.; CAI, Y.; TANG, R.; YANG, D. Size effect of hydroxyapatite nano particles on proliferation and apoptosis of osteoblast-likecells. **Acta Biomaterialia**, v. 5, p. 338-345, 2009.
- SILVA, C.D. Adsorção de Albumina Bovina e Ácido Hialurónico em Cerâmicos de Titânio. 74f. 2008. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- SILVA, E.C.; BORGES, A.P.B.; NEVES, C.D.; CARLO, E.C.; BARROS, R.E.; HAGE, M.C.F.N.S.; DE SOUZA, R.L.; BARUD, H.S.; BICALHO, S.M.C.M. Utilização experimental de hidroxiapatita sintética em alvéolos dentários de gatos domésticos (*Felis canis*): estudo clínico radiográfico e histomorfométrico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, p. 873-880, 2012.
- SLEVIN, M.; KRUPINSKI, J.; GAFFNEY, J.; MATOU, S.; WEST, D.; DELISSER, H.; SAVANI, R.C. e KUMAR, S. Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: Uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. **Matrix Biology**, v. 26, p. 58-68, 2009.
- TABATA,Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 6, p. 311-324, 2009.
- TSAI, S.; LIU, R.; HSU, F.; CHEN, C.A Study of the Influence of Polysaccharides on Collagen Self-Assembly: Nanostructure and Kinetics.**Biopolymers**, v. 83, p. 381-388, 2006.

- TIOMIS, A.C.; BORGES, A.P.P.; DAIBERT, A.P.F.; DUARTE, T.S.; PONTES, K.C.S.; CARVALHO, T.B.; CARLO REIS, E.C. Avaliação histológica do biovidro particulado na reparação de defeito experimental em mandíbula de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 80-85, 2010.
- TURLEY, E.A.; NOBLE, P.W. e BOURGUIGNON, L.W. Signaling Properties of Hyaluronan Receptors. **The journal of biological chemistry**, v. 277, p. 4589-4592, 2002.
- VEPARI, C. e KAPLAN, D.L. Silk as a biomaterial. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 991-1007, 2007.
- VITAL, C.C; BORGES, A.P.B.; FONSECA, C.C.; TSIOMIS, A.C.; CARVALHO, T.B.; FONTES, E.B.; SENA, M.P.; FÓFANO, G. Biocompatibilidade e comportamento de compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p. 175-183, 2006.
- VON RECUM, A. F. e LABERGE, M. Educational goals for biomaterials science and engineering: perspective view. **Journal of Applied Biomaterials**, v. 6 p. 137-144, 1995.
- WAN, D.C.; NACAMULI, R.P.E e LONGAKER, M.T. Craniofacial bone tissue engineering. **Dental Clinics of North America**, v. 50, p. 175-190, 2006.
- WANG, G.; YANG, H.; LI, M.; LU, S.; CHEN, X.; CAI, X. The use of silk fibroin/hydroxyapatite composite co-cultured with rabbit bone- marrow stromal cells in the healing of a segmental bone defect. **The journal of bone and joint surgery**, v. 92B, p. 320- 325, 2010.
- WANG, X., YUCEL T.; LU, Q.; HU, X.; KAPLAN, D.L. Silk nanospheres and microspheres from silk/pva blend films for drug delivery. **Biomaterials**, v. 31, p. 1025–1035, 2009.
- WANG, Y.; KIM, H.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; KAPLAN, D.L. Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. **Biomaterials**, v. 27, p. 6064-6082, 2006.
- WEBSTER, T.J.; ERGUN, C.; DOREMUS, R.H.; SIEGEL, R.W.; BIZIOS, R. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. **Biomaterials**, v. 21, p. 1803-1810, 2000.
- WEI, K.; LI, Y.; KIM, K. O.; NAKAGAWA, Y.; KIM, B. S.; ABE, K.; CHEN, G. Q.; KIM, I. S. Fabrication of nano-hydroxyapatite on electrospun silk fibroin nanofiber and their effects in osteoblastic behavior. **Journal of Biomedical Material Research. Part A**, v. 97A, p. 272-280, 2011.
- WU, S; LIU, X.; YEUNG, K.W.K.; LIU, C.; YANG, X. Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering R**, v. 80, p. 1-36, 2014.

- YAN, L.; CORREIA, J.S.; CORREIA, C.; CARIDADE, S.G.; FERNANDES, E.M.; SOUSA, R.A.; MANO, J.F.; OLIVEIRA, J.M.; OLIVEIRA, A.L.; REIS, R.L. Bioactive macro/micro porous silk fibroin/ nano-sized calcium phosphate scaffolds with potential for bone-tissue-engineering applications. **Nanomedicine**, v. 8, p. 359-378, 2013.
- YANG, Y.; WANG, H.; YAN, F.; QI, Y.; LAI, Y.; ZENG, D.; CHEN, G.; ZHANG, K. Bioinspired Porous Octacalcium Phosphate/Silk Fibroin Composite Coating Materials Prepared by Electrochemical Deposition. **Applied Materials Interfaces**, v. 7, p. 5634-5642, 2015.
- ZHANG, Q.; YAN, S. E LI, M. Silk Fibroin Based Porous Materials. **Materials**, v. 2, p. 2276-2295, 2009.
- ZHANG, Y.; WU, C.; LUO, T.; LI, S.; CHENG, X.; MIRON, R.J. Synthesis and inflammatory response of a novel silk fibroin scaffold containing BMP7 adenovirus for bone regeneration. **Bone**, v. 51, p. 704–713, 2012.
- ZHOU, Y.S.; YANG, H.J.; LIU, X.; MAO, J.; GU, S.J.; XU, W.L. Electrospinning of carboxyethyl chitosan/poly(vinyl alcohol)/silk fibroin nanoparticles for wound dressings. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 53, p. 88-92, 2013.

CAPÍTULO II

Caracterização e análise de biocompatibilidade *in vivo* do compósito formado por hidroxiapatita, fibroína da seda e ácido hialurônico.

PERDIGÃO, A.P.L. *et al.*

RESUMO

A engenharia tecidual busca criar e aprimorar novas terapias e desenvolver novos biomateriais que restaurem, melhorem ou impeçam o agravamento da função tecidual comprometida. Para comprovar a eficácia destes biomateriais, análises e testes *in vivo* podem ser realizados como uma forma adequada de se avaliar a característica de topografia de superfície, cristalinidade e a análise de biocompatibilidade, antes de sua aplicação. Nesse contexto objetivou-se analisar três compósitos formados por hidroxiapatita (HAP), fibroína da seda (FS) e diferentes concentrações de ácido hialurônico (AH), sendo o compósito formado por HAP+FS, o compósito 2 formado por HAP+FS+1%AH e o compósito 3 formado por HAP+FS+3%AH. Foi avaliado o grau de cristalinidade de cada compósito através da difração de raios-X, bem como suas características de superfície através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Além dessas análises, realizou-se também o teste de biocompatibilidade, através da avaliação histopatológica dos tecidos coletados após 15, 30, 60 e 90 dias de implantação no tecido subcutâneo de coelhos. Os três compósitos apresentaram alto grau de cristalinidade. A MEV revelou superfícies complexas dos compósitos. Cristais de hidroxiapatita foram visualizados, bem como filamentos de fibroína da seda e ácido hialurônico, o aumentando assim a complexidade da topografia de superfície do compósito, e facilitando a adesão celular. O teste de biocompatibilidade revelou uma interação tecidual em resposta à presença do compósito, por meio de uma formação de tecido fibroso ao redor do biomaterial ao último dia de avaliação.

Palavras chave: Biomaterial, topografia de superfície, engenharia de tecidos, difração de raios-X.

CHARACTERIZATION AND BIOCOMPATIBILITY *IN VIVO* ANALYSIS OF THE COMPOSITE CONSISTING OF HYDROXYAPATITE, SILK FIBROIN AND HYALURONIC ACID.

PERDIGÃO, A.P.L. *et al.*

ABSTRACT

Tissue engineering seeks to create and improve new therapies and develop new biomaterials that restore, improve or prevent the deterioration of the compromised tissue function. To prove the effectiveness of these biomaterials, analysis and *in vivo* tests can be performed as an appropriate way of evaluating the surface topography characteristic, crystallinity and biocompatibility analysis before implantation. In this context, this study aimed at analyzing three composites consisting of hydroxyapatite (HAP), silk fibroin (SF) and different concentrations of hyaluronic acid (HA), the composite 1 made of HAP + FS, the composite 2 formed by HAP + FS + 1% HA and the composite 3 formed from HAP + FS + 3% HA. We evaluated the degree of crystallinity of each composite through the diffraction of x-rays as well as their surface features by scanning electron microscopy (SEM). In addition to these analyzes, biocompatibility test was also conducted by histopathologic evaluation of tissues collected after 15, 30, 60 and 90 days of implantation in the subcutaneous tissue of rabbits. The three composites showed high degree of crystallinity. SEM revealed the composite complex surfaces. Hydroxyapatite crystals were visualized as well as the silk fibroin filaments and hyaluronic acid which helps improve the complexity of the topography, and the presence of pores in all three composites. The biocompatibility test revealed little tissue interaction in response to the composite presence, leading to encapsulation of biomaterials by fibrous tissue at the last evaluation date.

Key words: biomaterial, surface topography, tissue engineering, X-ray diffraction.

1. INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos utiliza conhecimentos nos domínios da ciência dos materiais, biologia, química, medicina, e de engenharia para criar materiais que podem servir temporariamente como suporte, veículo ou matriz e atuar de forma estrutural e/ou funcional durante a regeneração de um defeito (Sun *et al.*, 2011).

Algumas estratégias são utilizadas para se produzir um biomaterial com características que forneçam resultados satisfatórios. Para isso, no momento de desenvolvimento desses compósitos, deve-se levar em consideração de vários fatores: a biocompatibilidade e uma interação positiva entre os biomateriais que fazem parte do compósito e entre o compósito e o leito receptor; a porosidade, tamanho de poros apropriados e uma elevada e complexa área de superfície que favorecem a adesão, crescimento e migração celular ao longo do processo regenerativo promovendo a osteointegração e a osteocondução; integridade mecânica, importante para a própria fabricação dos implantes e suporte de carga mecânica *in vivo*, além da biodegradabilidade e uma taxa de degradação adequada para se igualar a taxa de formação do novo tecido (Ma, 2004).

Diversos materiais hoje são alvos de pesquisas no ramo da bioengenharia. Cerâmicas bioativas, como a hidroxiapatita, têm sido largamente estudadas devido a suas características relacionadas com a reparação de defeitos ósseos. São extremamente biocompatíveis, devido a sua composição semelhante à dos tecidos ósseo, possui propriedades osteocondutoras que permitem o direcionamento do crescimento do tecido ósseo além de ser um biomaterial bioativo (Guastaldi *et al.*, 2010; Mostafa *et al.*, 2015). Adicionalmente, a estrutura porosa e cristalina da hidroxiapatita favorece e auxilia o processo de regeneração caracterizado por sua capacidade de biodegradação e proporciona o crescimento de vasos e transporte celular através dos poros durante o desenvolvimento tecidual em formação (Woodard *et al.*, 2007).

Os polímeros podem melhorar principalmente as propriedades mecânicas presentes na hidroxiapatita. A adição de compostos orgânicos como a fibroína da seda pode não só melhorar a flexibilidade produzindo um biomaterial com maior módulo de elasticidade, mas também controlar o tempo de degradação e equilibrar a velocidade de reabsorção dos compósitos frente à taxa de remodelação e crescimento tecidual ósseo (Ming *et al.*, 2015). Outro polímero que também possui diversas características e propriedades interessantes e funciona como alternativa para compor os diversos biomateriais utilizados na regeneração óssea é o ácido hialurônico. É um dos

componentes essenciais da matriz extracelular, que desempenha um papel preponderante na morfogênese do tecido, migração celular, diferenciação, e adesão devido a presença de receptores celulares que estimulam essas junções (Aslan *et al.*, 2006).

O presente capítulo tem como objetivo caracterizar os compósitos HAP+FS (hidroxiapatita e fibroína da seda); HAP+FS+1%AH (hidroxiapatita, fibroína da seda e 1% de ácido hialurônico) e HAP+FS+3%AH (hidroxiapatita, fibroína da seda e 3% de ácido hialurônico), através da identificação das possíveis fases minerais presentes utilizando a difração de raios X, bem como analisar a topografia de sua superfície com auxílio da microscopia eletrônica de varredura. Adicionalmente, será descrito o processo de análise *in vivo*, a biocompatibilidade do biomaterial e seu processo de reabsorção.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Biomaterial

Os compósitos estudados foram desenvolvidos pelo JHS Laboratório Químico Ltda., em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Foram avaliados três compósitos, os quais eram constituídos de hidroxiapatita sintética (HAP-91® Plus), fibroína da seda (FS) e ácido hialurônico (AH). As proporções de AH nas amostras foram de, respectivamente 0, 1 e 3%, sendo então representadas como: HAP+FS+0%AH; HAP+FS+1%AH; HAP+FS+3%AH.

A proporção entre os biomateriais HAP e FS foi de 80% e 20% em peso, respectivamente, em todos os compósitos. O método de fabricação de cada compósito não pode ser informado, pois se encontra em processo de patente.

2.2. Difração de raios X

A cristalinidade das membranas foi analisada por difração de raios X. As análises de cada amostra foram realizadas em um difratômetro da marca Rigaku D-Max modelo Geiger Flex equipado com tubo de cobalto (radiação Co-K α , $\lambda = 1,79026 \text{ \AA}$), e um monocromador de cristal curvo de grafite no feixe difratado, operado com diferença de potencial de 40 kV e corrente elétrica de 30 mA. As varreduras foram realizadas no modo

passo a passo em intervalo de 15 a 50° 2 θ com 0.05° de incremento e 2 segundos de contagem de tempo em cada passo.

2.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para análise morfológica, foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura (MEV) da marca LEO 1430VP, a voltagens de 15 kV. Para tal, as superfícies foram cobertas por uma camada de 20 nm de carbono, utilizando um sistema de deposição “sputtering balzers” (Electron Microscopy Sciences, modelo 550x), e, através de uma fita dupla face, foram fixados na superfície dos “stubs” e colocados no interior do microscópio para leitura e análise.

Foram obtidos dados qualitativos das fotografias, analisando-se a topografia das superfícies pela: 1) distribuição e formato dos cristais de hidroxiapatita expostos na superfície das amostras, se existentes; 2) presença ou não de poros.

2.4. Análise de biocompatibilidade *in vivo*

O presente trabalho experimental obteve sua metodologia aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFV sob protocolo número 61/14.

Para as análises de biocompatibilidade *in vivo*, foram utilizados três coelhos da raça Nova Zelândia provenientes da Coelheira do Departamento de Zootecnia da UFV. Os animais obtiveram um mês para aclimatação a adaptação ao ambiente e foram alojados em gaiolas individuais, recebendo ração duas vezes ao dia e água *ad libitum*.

Foi realizada para implantação três compósitos HAP+FS (hidroxiapatita e fibroína da seda); HAP+FS+1%AH (hidroxiapatita, fibroína da seda e 1% de ácido hialurônico) e HAP+FS+3%AH (hidroxiapatita, fibroína da seda e 3% de ácido hialurônico). Assim, quatro incisões foram feitas na região dorsal de cada animal, duas incisões craniais, direita e esquerda, e duas incisões caudais, direita e esquerda. As quatro incisões de um mesmo animal receberam o mesmo compósito, na quantidade de 0,2mg em forma de pó, no tecido subcutâneo de um mesmo animal. O compósito HAP+FS foi implantado no animal 1, o compósito HAP+FS+1%AH foi implantado no animal 2 e o compósito HAP+FS+3%AH foi implantado no animal 3 (Figura 1A e B), como esquematizado na tabela abaixo (tabela 1). Todos os compósitos foram umedecidos com 0,5mL de solução salina estéril, moldados em forma de comprimidos de 5mm de diâmetro e fixados sob a fáscia muscular, dissecada no momento da implantação, suturada com um fio de náilon 4-

0. Após a implantação, a pele foi suturada com fio de náilon 2-0, padrão simples separado.

Tabela 1: Representação esquemática da localização das incisões e posteriores implantações no tecido subcutâneo realizadas no dorso de três animais.

ANIMAL 1 COMPÓSITO HAP+FS	Região crânio-dorsal direita <i>Incisão 1</i>	Região crânio-dorsal esquerda <i>Incisão 2</i>
	Região dorso-caudal direita <i>Incisão 3</i>	Região dorso-caudal esquerda <i>Incisão 4</i>
ANIMAL 2 COMPÓSITO HAP+FS+1%AH	Região crânio-dorsal direita <i>Incisão 1</i>	Região crânio-dorsal esquerda <i>Incisão 2</i>
	Região dorso-caudal direita <i>Incisão 3</i>	Região dorso-caudal esquerda <i>Incisão 4</i>
ANIMAL 3 COMPÓSITO HAP+FS+3%AH	Região crânio-dorsal direita <i>Incisão 1</i>	Região crânio-dorsal esquerda <i>Incisão 2</i>
	Região dorso-caudal direita <i>Incisão 3</i>	Região dorso-caudal esquerda <i>Incisão 4</i>



Figura 1: Cirurgia de implantação do compósito HAP+FS+3%AH (seta preta) no tecido subcutâneo do animal 3. A: Compósito implantado na região dorso-caudal esquerda. B: Três dias de pós-operatório de cirurgia de implantação. Observar a disposição das incisões, como esquematizado na tabela 1.

Posteriormente, os animais foram submetidos às cirurgias para coleta do material, envolvendo pele, tecido subcutâneo, compósito, se houver, e tecido muscular. Aos 15, 30, 60 e 90 dias foram coletados uma amostra de cada grupo e ao final da última coleta foi realizada eutanásia por sobredose de propofol e administração de cloreto de potássio, ambos por via intravenosa. As quatro amostras obtidas de cada um dos animais foram

encaminhadas para o processamento histológico de rotina (fixação, desidratação, inclusão em parafina, microtomia e coloração por hematoxilina-eosina). Foi avaliada a presença do compósito, sua morfologia e os tecidos e as células em contato com o compósito, os quais foram caracterizados. Foi avaliada e descrita a presença ou ausência da cápsula fibrosa. A presença de infiltrado inflamatório foi caracterizada como discreto moderado ou intenso. Outras características também foram avaliadas e descritas como a irrigação sanguínea, presença de regiões hemorrágicas, infiltração tecidual dentro do biomaterial e evidências de fagocitose.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O difratograma de cada compósito está representado na figura 2 (HAP+FS), figura 3 (HAP+FS+1%AH) e figura 4 (HAP+FS+3%AH).

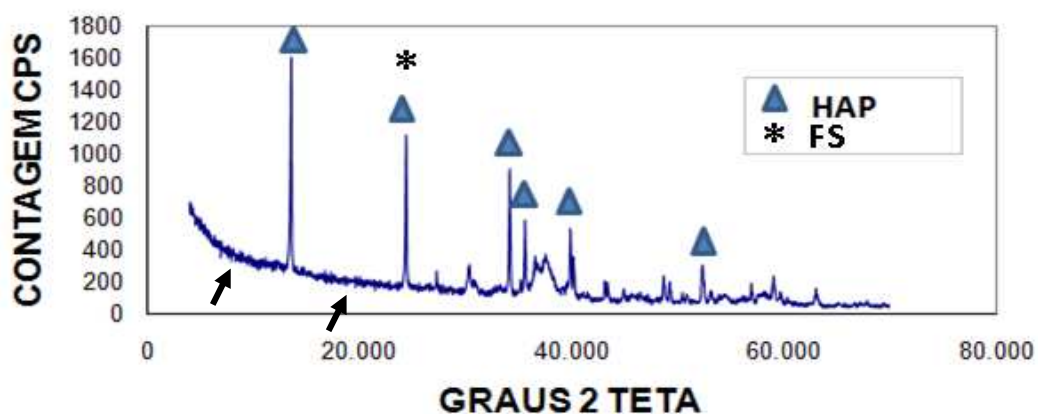


Figura 2: Difratograma do compósito de hidroxiapatita sintética associada à fibroína de seda (HAP+FS) na avaliação de sua cristalinidade por difração de raios X. Notar os picos de hidroxiapatita sintética (HAP) representados por ▲ e picos de fibroína da seda (regiões folha β) representados por asterisco(*). Notar, regiões amorfas (seta preta) representando as fases amorfas dos polímeros presentes nos compósitos (fibroína da seda e ácido hialurônico).

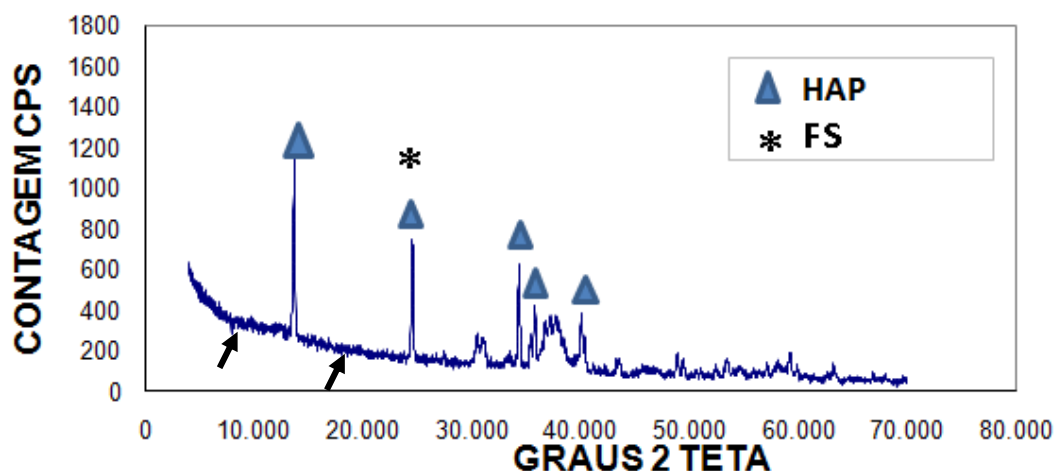


Figura 3: Difratoograma do compósito de hidroxiapatita sintética associada à fibroína de seda e ácido hialurônico a 1% (HAP+FS+1%AH) na avaliação de sua cristalinidade por difração de raios X. Notar os picos de hidroxiapatita sintética (HAP) representados por ▲ e picos de fibroína da seda (regiões folha β) representados por asterisco(*).Notar regiões amorfas (seta preta) representando as fases amorfas dos polímeros presentes nos compósitos (fibroína da seda).

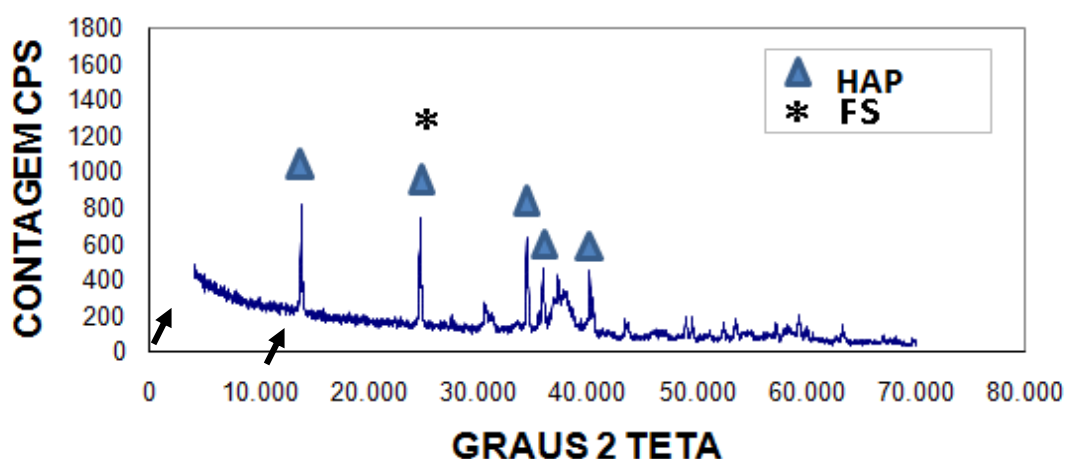


Figura 4: Difratoograma do compósito de hidroxiapatita sintética associada à fibroína de seda e ácido hialurônico a 3% (HAP+FS+3%AH) na avaliação de sua cristalinidade por difração de raios X. Notar os picos de hidroxiapatita sintética (HAP) representados por ▲ e picos de fibroína da seda (regiões folha β) representados por asterisco(*).Notar regiões amorfas (seta preta) representando as fases amorfas dos polímeros presentes nos compósitos (fibroína da seda).

É possível observar picos agudos e altos nos gráficos referentes às figuras 2 e 3, representando a elevada cristalinidade do biomaterial. Os picos identificados são referentes à hidroxiapatita condizentes com seu respectivo *CPDS Card* (Myncrist, 2015). Sabe-se que a fibroína da seda é um biomaterial composto por regiões cristalinas e

amorfos. Os picos relacionados a estruturas cristalinas de folha β das fibras da seda foram demonstrados nesses gráficos (Asakura *et al.*, 1985; Altman *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2014).

Regiões amorfas foram visualizadas nos três gráficos, relacionadas tanto a fibroína da seda quanto ao ácido hialurônico. Essas regiões são importantes, pois podem ser responsáveis por melhorar as características mecânicas do compósito. Regiões altamente cristalinas são frágeis, devido ao seu menor módulo de elasticidade e conseqüentemente, menor grau de deformação frente a um impacto. Além disso, os materiais cristalinos possuem lenta taxa de reabsorção, e a presença de materiais amorfos podem acelerar esse processo equilibrando a taxa de reabsorção frente a uma taxa de remodelação óssea (Ha *et al.*, 2003; Conz *et al.*, 2005; Carlo Reis *et al.*, 2012).

A técnica de microscopia eletrônica de varredura revelou neste estudo algumas propriedades específicas do compósito como a presença de cristais de hidroxiapatita entremeados nas estruturas fibrosas e irregulares dos polímeros fibroína da seda e ácido hialurônico, caracterizando assim uma superfície complexa dos compósitos avaliados nas figuras referentes à microscopia eletrônica de varredura.

Observaram-se estruturas com um alto grau de interação entre os biomateriais, resultado também observado nas análises realizadas por Chen *et al.*(2014). A figura 5 representa qualitativamente essa estreita ligação e interação entre grânulos de hidroxiapatita e filamentos de seda e ácido hialurônico, o que beneficia as propriedades mecânicas dos compósitos. Resultados semelhantes foram apresentados também por Kweon *et al.*(2011), no qual as micrografias revelaram uma distribuição uniforme das partículas de hidroxiapatita precipitadas na superfície do compósito formado pela fibroína da seda. Bhumiratana *et al.*(2011) descreveram qualitativamente em seus estudos a formação da rugosidade de superfície, devido a presença da hidroxiapatita. Além disso, esses autores também descreveram que, em contato com a fibroína da seda, essas partículas de HAP ficam aderidas aos filamentos, semelhante ao que revela a microscopia eletrônica de varredura representada pela figura 5.

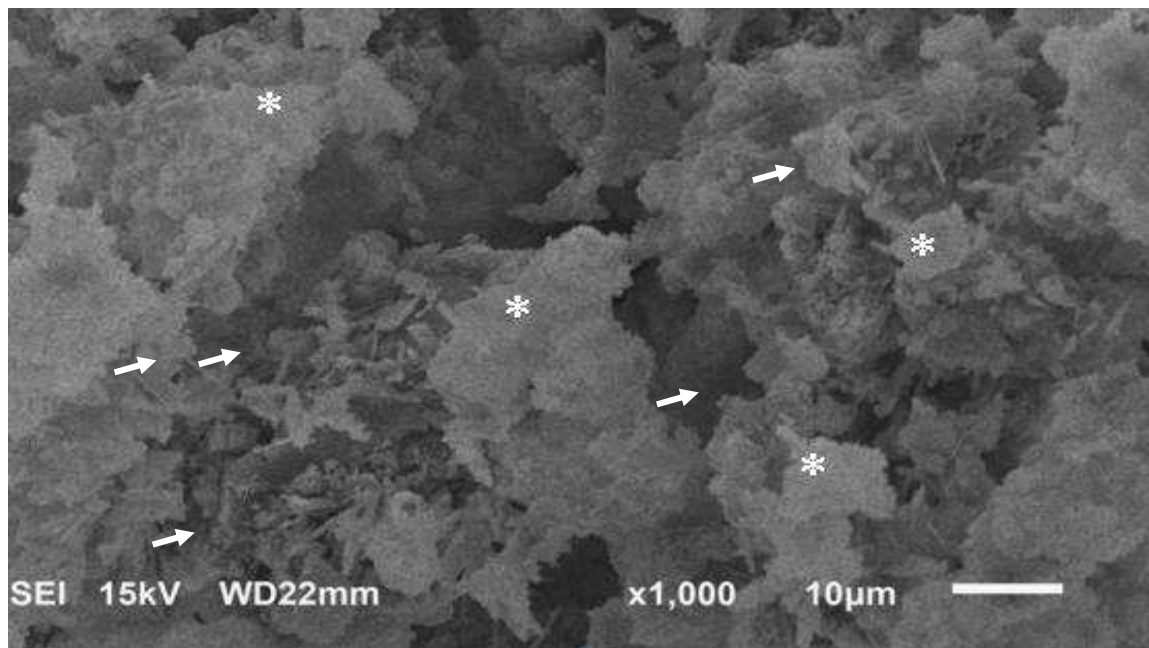


Figura 5: Micrografia da amostra de hidróxiapatita sintética associada à fibroína de seda (HAP+FS) obtida a partir da microscopia eletrônica de varredura. Observar a presença dos cristais de hidróxiapatita (asterisco), aderidas à rede fibrosa de fibroína da seda (setas), revelando a não sobreposição dos biomateriais, e sim a sua interação.

Adicionalmente, os compósitos que apresentaram ácido hialurônico em sua composição também possuíam essa matriz tridimensional com grânulos de HAP recobertos por fibras de FS e AH (Figura 6). Pouyaniet *al.* (1994) realizou uma análise morfológica das superfícies de hidrogéis de AH nativo e AH conjugado com outros biomateriais. Os resultados da micrografia do hidrogel AH nativo revelaram, nesse estudo, uma superfície na qual as estruturas eram predominantemente fibrosas e irregulares, semelhantes ao observado nesse estudo. Observou-se que à medida que se aumentava a concentração de ácido hialurônico, a complexidade da superfície do compósito e a presença de uma rede fibrosa eram maiores. A matriz tridimensional revelou ser um suporte com grande potencial para a interação de compostos biologicamente ativos, como no ácido hialurônico, que se interagiu com os outros biomateriais.

A figura 6 ilustra essa interação e o aumento da rede fibrosa em ambos os compósitos HAP+FS+1%AH e HAP+FS+3%AH em comparação com o biomaterial que não possui AH em sua composição. Como descrito por Carlo Reis *et al.* (2012), a topografia complexa de um compósito é essencial no processo regenerativo, pois ela permite a adesão, proliferação e sinalização de células envolvidas na reparação, responsáveis pela formação tecidual.

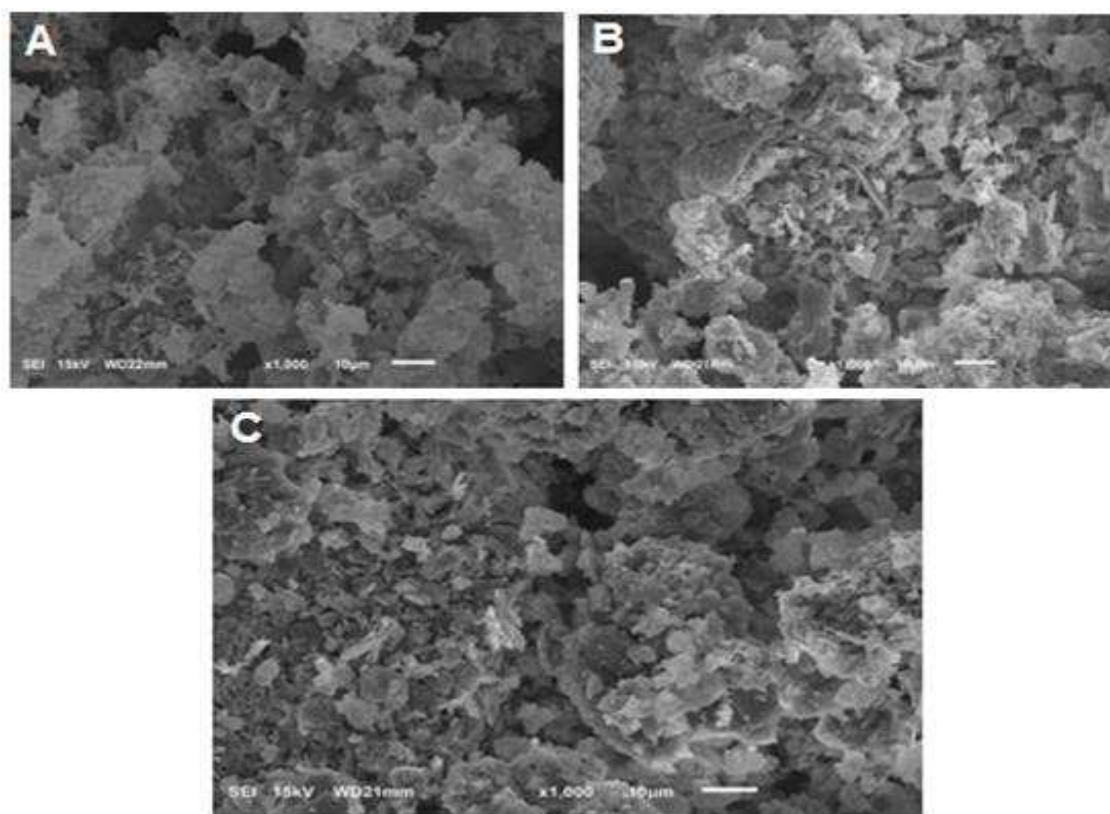


Figura 6: Micrografia dos três compósitos em estudo obtida através da microscopia eletrônica de varredura. (A), (B) e (C) representam as estruturas dos compósitos HAP+FS, HAP+FS+1%AH e HAP+FS+3%AH, respectivamente, com um aumento de 1000x. É possível notar a complexidade das superfícies dos três compósitos, bem como o aumento da rede fibrosa à medida que se aumenta a concentração de ácido hialurônico.

A porosidade do compósito também foi observada e avaliada e observada nesse estudo, sendo extremamente relevante no processo de reparação tecidual, uma vez que esses espaços permitem o crescimento de novos vasos sanguíneos e, conseqüentemente, o transporte de células e nutrientes necessários à regeneração óssea. A figura 7 mostra detalhadamente a presença desses poros, aparentemente não conectados, e recobrendo uniformemente toda a superfície do compósito HAP+FS+AH.

Recentemente, Gholipourmalekabadi *et al.* (2015) avaliando algumas propriedades de compósito preparado a partir de HAP e FS também observaram a presença de poros, caracterizando-o como um biomaterial altamente capacitado a promover adesão, migração celular e crescimento tecidual. Entretanto, também relataram em suas pesquisas que o aumento da quantidade de fibroína da seda pode comprometer o diâmetro dos poros e conseqüentemente apresentarem uma barreira para o desenvolvimento de vasos e transporte celular no interior da matriz. Entretanto, apesar da presença de fibroína da seda nos compósitos avaliados neste estudo, a apresentação em

forma de pó favorece a formação de poros e, conseqüentemente, a migração de células e nutrientes no interior do implante.

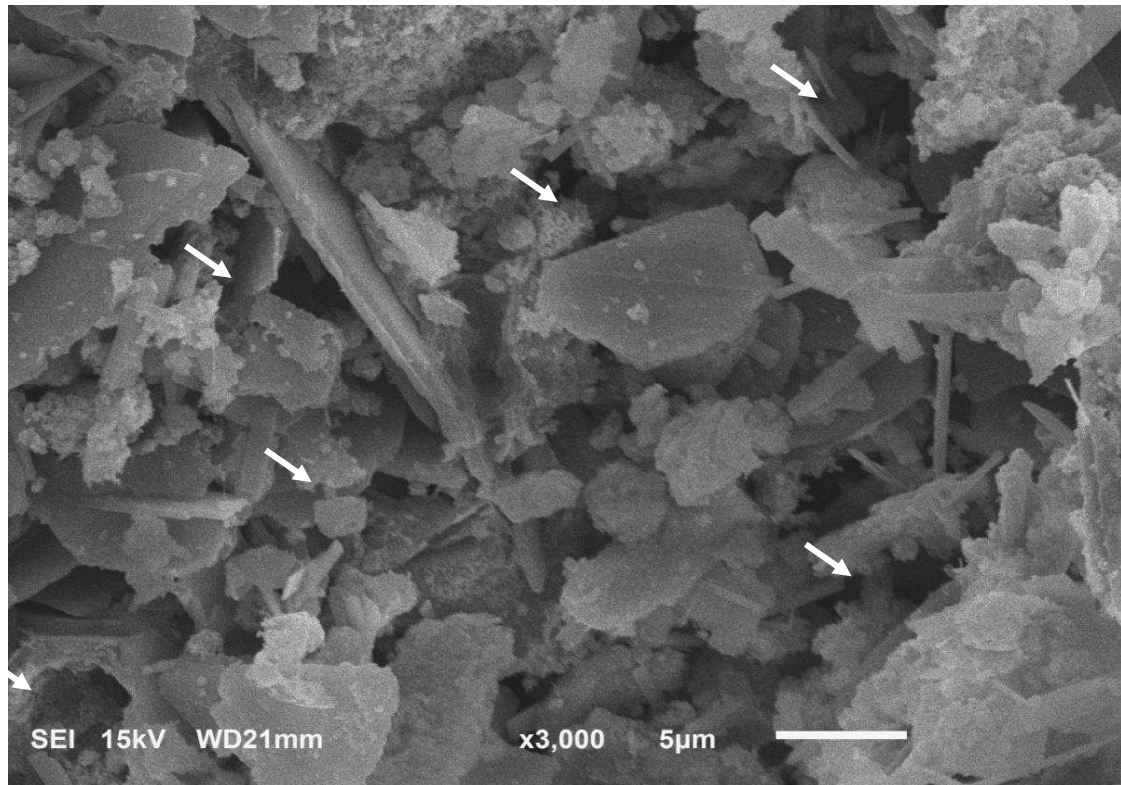


Figura 7: Micrografia da amostra do compósito de hidroxiapatita sintética associada à fibroína da seda e ácido hialurônico (HAP+FS+1%AH) obtida a partir da microscopia eletrônica de varredura, aumento de 3000x. Observar a presença de pequenos poros (setas) sobre a superfície do biomaterial, aparentemente não interconectados e topografia de superfície complexa.

Os resultados das avaliações histopatológicas foram semelhantes para os três compósitos (HAP+FS; HAP+FS+1%AH e HAP+FS+3%AH), referente aos quatro tempos de análise, 15, 30, 60 e 90 dias. Segundo Rogero *et al.* (2003) e Lopes, (2012), tais avaliações são de grande importância, pois os testes de biocompatibilidade que possuem resultados positivos permitem a utilização *in vivo* de qualquer material usado para auxiliar a formação de tecidos novos. Para Calixto *et al.*(2001), todo e qualquer material implantado nos tecidos provoca uma reação, e sua intensidade e duração determinará a biocompatibilidade desse biomaterial testado. Ainda, para Willians, (2008), a análise de biocompatibilidade dos biomateriais é necessária para otimizar a taxa e a qualidade de deposição óssea em relação a eles, minimizar a taxa de liberação de produtos de

degradação, a resposta tecidual, e para otimizar a biomecânica ambiente a fim de minimizar a perturbação da homeostasia do osso e do tecido mole circundante.

No grupo HAP+FS, aos 15 dias, observou-se intensa proliferação de células inflamatórias da linhagem monocítica ao redor dos três biomateriais implantados (Figura 8A). Além da presença de quantidade moderada de células inflamatórias, é possível observar a presença de vasos sanguíneos, com infiltração de tecido conjuntivo indiferenciado dentro do biomaterial. Não foram observados nessa amostra pontos hemorrágicos nem formação de cápsula fibrosa envolvendo o compósito. Nos grupos HAP+FS+1%AH e HAP+FS+3%AH, aos 15 dias, foi possível notar uma quantidade moderada de células inflamatórias da linhagem monocítica, presença de vasos sanguíneos e infiltração de tecido conjuntivo indiferenciado dentro do biomaterial (Figura 8B e C). Observou-se também uma organização celular ao redor do biomaterial tanto na figura 8B quanto na figura 8C, porém não foi possível caracterizar o tipo de tecido formado. Também não foram observados nessas amostras pontos hemorrágicos nem formação de cápsula fibrosa. De acordo com Anderson *et al.*, (2008), a resposta inicial à implantação de um biomaterial é a observação de um infiltrado inflamatório agudo neutrofílico, presente por até uma semana. Após esse período, ocorre então a chamada fase inflamatória crônica. Essa resposta é caracterizada pela presença de células da linhagem monocítica, normalmente de curta duração e está confinada no local do implante, caso haja biocompatibilidade, como no presente estudo.

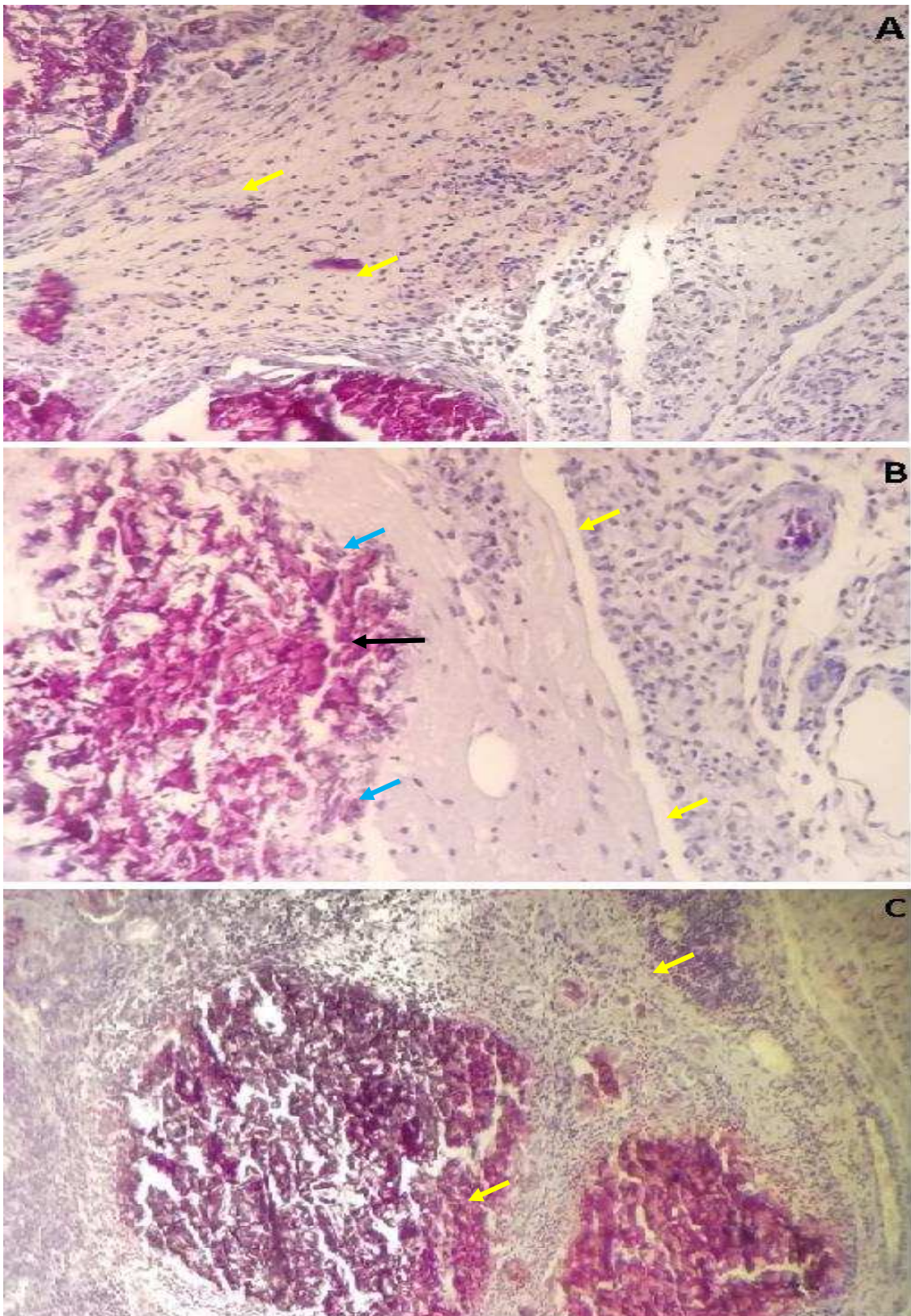


Figura 8: Micrografia dos tecidos coletados após 15 dias de implantação dos compósitos. A- compósito HAP+FS; B- compósito HAP+FS+1%AH e C- compósito HAP+FS+3%AH. Observar o infiltrado inflamatório monocítico envolvendo o compósito (Setas amarelas) a organização de um tecido com células indiferenciadas ao redor do compósito na figura 8B (Setas azuis) e a interface, compósito tecido (Seta preta).

Nos três grupos, aos 30 dias de avaliação, observou-se uma fragmentação dos compósitos e uma infiltração de tecido conjuntivo indefinido no interior desses biomateriais. O infiltrado inflamatório monocítico diminuiu, bem como o número de vasos sanguíneos, mas ainda encontravam-se presentes, de forma discreta. Houve certa organização com tendência a formação de tecido fibroso ao redor dos compósitos, mas ainda não foi possível observar diferenciação celular. Tais características podem ser observadas nos cortes histológicos referentes aos compósitos HAP+FS; HAP+FS+1%AH e HAP+FS+3%AH representados pelas figuras 9A, B e C, respectivamente. Não foram visualizados pontos hemorrágicos em nenhuma amostra.

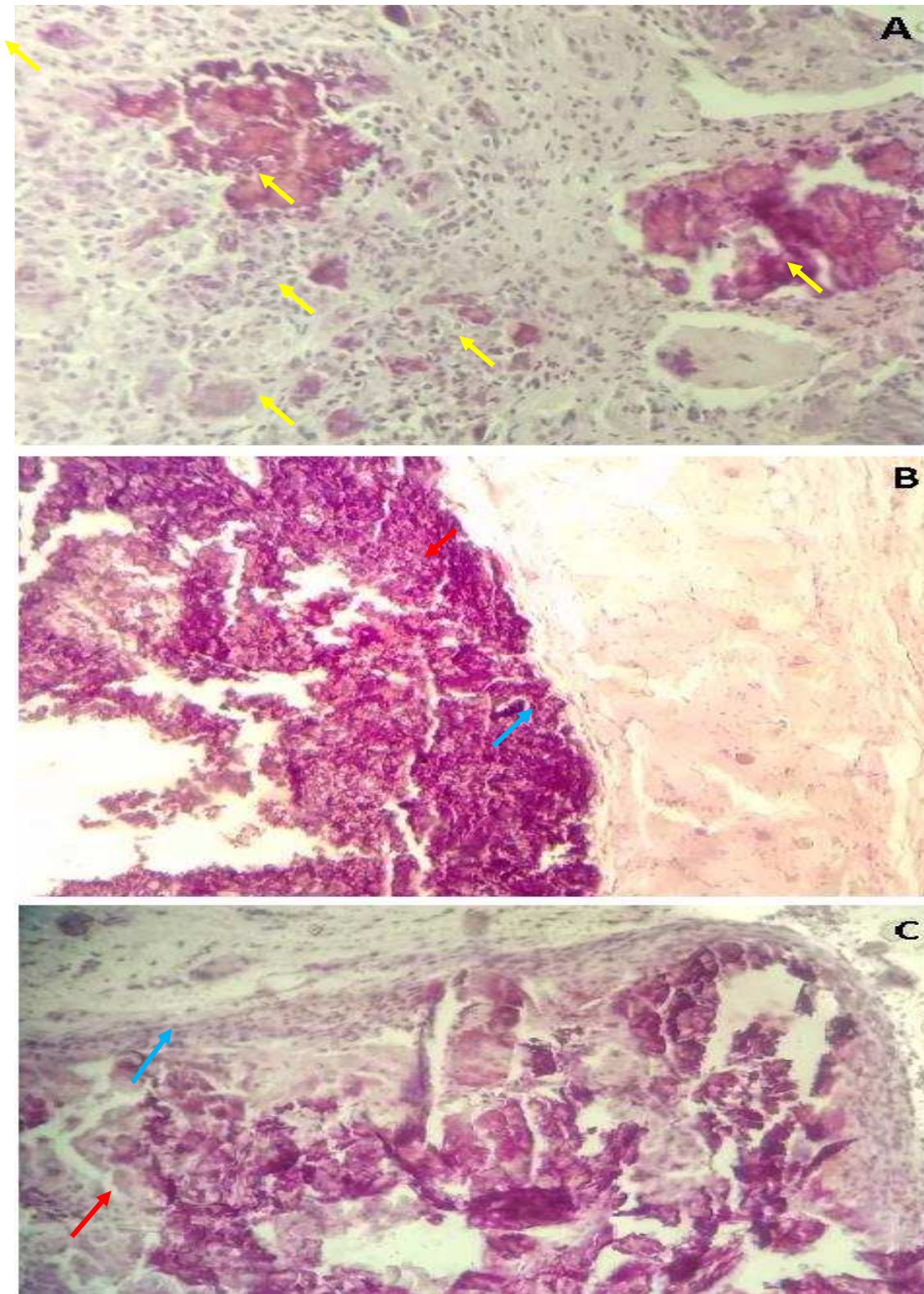


Figura 9- Micrografia dos tecidos coletados após 30 dias de implantação dos compostos. A- composto HAP+FS; B- composto HAP+FS+1%AH e C- composto HAP+FS+3%AH. Observar a fragmentação do composto em A (setas amarelas) e o processo inicial de uma formação de tecido indiferenciado ao redor dos compostos em B e C (setas azuis representam o tecido indiferenciado e setas vermelhas representam o composto implantado).

Os resultados apresentados nos dias 60 e 90 foram semelhantes em todos os cortes histológicos para os três compósitos. A figura 10(A, B e C) mostra imagens de três cortes histológicos coletados aos 60 dias de implantação dos compósitos HAP+FS+3%AH e HAP+FS+1%AH e aos 90 dias de implantação dos compósitos HAP+FS, respectivamente. É possível observar fragmentação do compósito bem como a presença de organização tecidual sugerindo a formação de um tecido fibroso, com um discreto infiltrado inflamatório com células da linhagem monocítica também presente, ao redor dos três compósitos representando a interação do compósito com o tecido. Carlo *et al.*(2007) em um estudo de biocompatibilidade para os biomateriais hidroxiapatita e biovidro, observaram a presença de tecido conjuntivo fibroso adjacente à hidroxiapatita bem como uma reação proliferativa e não exsudativa. Para MacNeill *et al.* (1999), é comum a formação de tecido fibroso ao redor dos grânulos de hidroxiapatita mesmo quando implantada em tecido ósseo, o que foi confirmado pelos achados de Gao *et al.*(1995), Borges *et al.* (2000), Fehlberg (2001), Duarte (2003)e Vital *et al.* (2006).

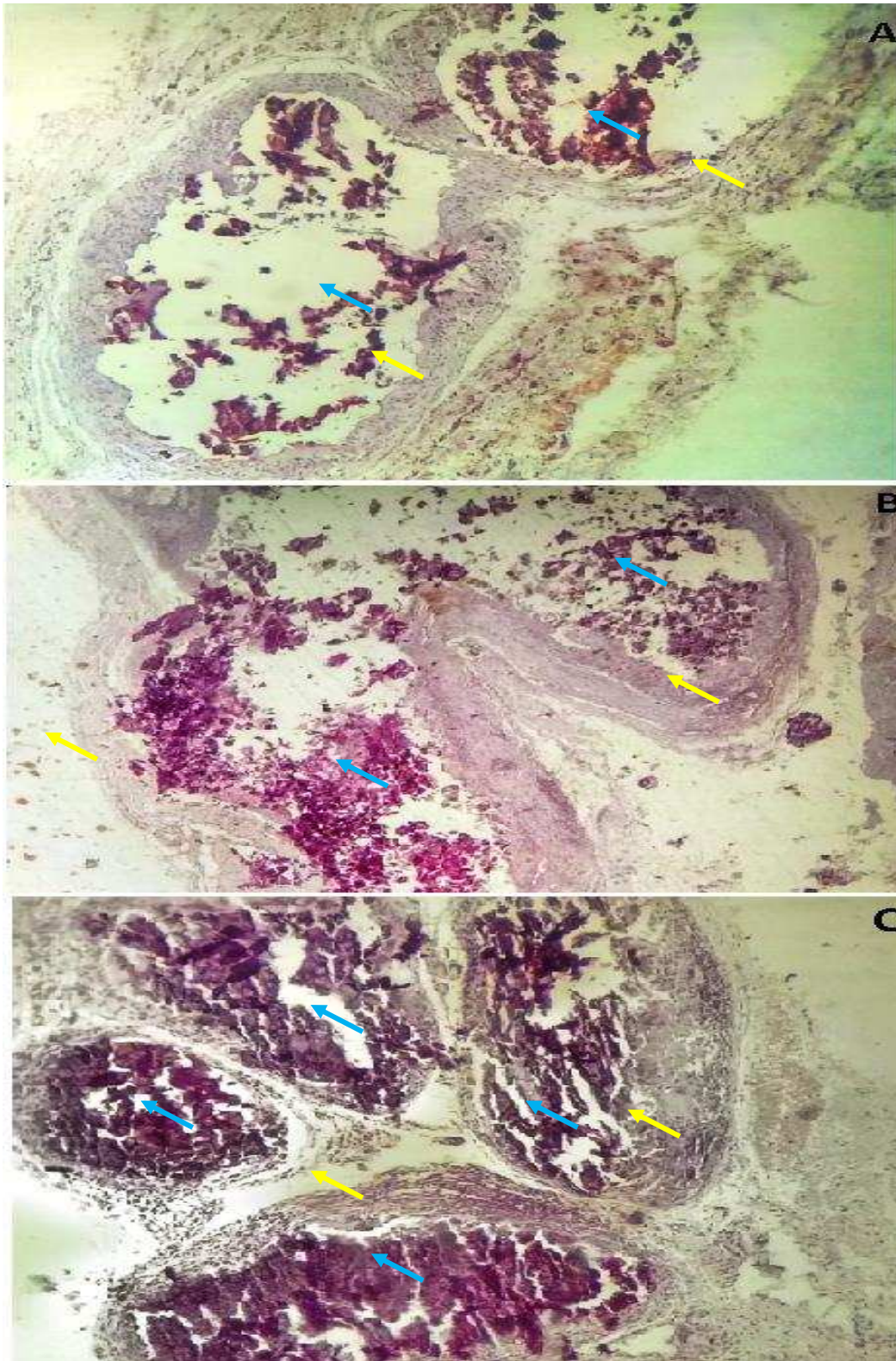


Figura 10: Micrografia dos tecidos coletados após a implantação dos compósitos. A- 60 dias de implantação do compósito HAP+FS+3%AH; B- 60 dias de implantação do compósito HAP+FS+1%AH e C- 90 dias de implantação do compósito HAP+FS. Observa-se a formação de uma organização tecidual sugestiva de origem fibrosa (setas amarelas) ao redor do biomaterial (setas azuis).

4. CONCLUSÕES

Os três compósitos analisados apresentaram elevada cristalinidade, sendo identificadas as fases correspondentes à hidroxiapatita e fibroína da seda. Apresentaram também superfície complexa e porosa com grânulos de hidroxiapatita na superfície avaliada. A adição de ácido hialurônico sugeriu um aumento da complexidade da superfície dos compósitos.

Os três compósitos se mostraram biocompatíveis, incitando respostas toleráveis ao organismo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, J.M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D.T. Foreign body reaction to biomaterials **Seminars in Immunology**, v. 20, p. 86-100, 2008.
- ASAKURA, T.; KUZUHARA, T.A.; TABETA, R.; SAIT, H. Conformatio Characterization of *Bombyxmori*Silk Fibroin in the Solid State by High-Frequenc 13C Cross Polarization-Magic Angle Spinning NMR, X-ray Diffraction, and Infrared Spectroscopy. **Macromolecules**, v. 18, p. 1841-1845, 1985.
- ASLAN, M.; SIMSEK, G. E DAYI, E. The effect of hyaluronic acid supplemented bone graft in bone healing: experimental study in rabbits. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 20, p.209-220, 2006.
- ALTMAN, G.H.; DIAZ, F.; JAKUBA, C.; CALABRO, T.; HORAN, R.L.; CHEN, J.; LU, H.; RICHMOND, J.; KAPLAN, D.L. Silk-based biomaterials. **Biomaterials**, v. 24, p. 401-416, 2003.
- BHUMIRATANA, S.; GRAYSON, W.; CASTANEDA, A.; ROCKWOOD, D.; GIL, E.S.; KAPLAN, D.L.; VUNJAK-NOVAKOVIC¹, G. Nucleation and Growth of Mineralized Bone Matrix on SilkHydroxyapatite Composite Scaffolds. **Biomaterials**, v. 32, p. 2812-2820, 2011.
- BORGES,A.P.B.; REZENDE, C.M.F.; RIBEIRO, M.F.B.; MELO, E.G.; NETO, P.I.N. Hidroxiapatita sintética (HAP-91) como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia em cão: aspectos à microscopia eletrônica de transmissão. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, p. 616-620, 2000.

- CALIXTO, R. F. E.; TEÓFILO, J. M.; BRENTGANI, L. G.; LAMANO CARVALHO, T. L. Implante de um floculado de resina de mamona em alvéolo dental de rato. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 15, p. 257-262, 2001.
- CARLO, E.C.; BORGES, A. P. B.; REZENDE, C. M. F.; MOREIRA, J. C. L.; FONSECA, C. C.; PONTES, K. C. S.; DUARTE, T. S. Avaliação do efeito osteoindutor da hidroxiapatita e do biovidro implantados em tecido subcutâneo de cão. **Revista Ceres**, v.54, p.492-500, 2007.
- CARLO REIS, E.C.; BORGES, A.P.B.; OLIVEIRA, P.M.; BICALHO, S.M.C.M.; REIS, A.M.; SILVA, C.L. Desenvolvimento e caracterização de membranas rígidas, osteocondutoras e reabsorvíveis de polihidroxibutirato e hidroxiapatita para regeneração periodontal. **Polímeros**, v. 22, p. 73- 79, 2012.
- CHEN, L.; HU, J.; RAN, J.; SHEN, X.; TONG, H. Preparation and evaluation of collagen-silk fibroin/hydroxyapatite nanocomposites for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 65, p. 1-7, 2014.
- CONZ, M. B.; GRANJEIRO, J. M. E SOARES, G. A. Physicochemical characterization of six commercial hydroxyapatites for medicaldental applications as bone graft. **Journal of Applied Oral Science**, v. 13, p.136-140, 2005.
- DUARTE, T.S. Osteointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães. 50f. 2003. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- FEHLBERG, A.F. Hidroxiapatita sintética na regeneração de falha óssea provocada em fratura completa de terço intermédio de tíbia imobilizada pela fixação percutânea em cães. 42f. 2001. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- GAO, T.J.; LINDHOM, B.; KOMMONEN, P.; RAGNI, P.; PARONZINI, A.; LINDHOLM, T.C. Microscopic evaluation of bone implant contact between hydroxyapatite, bioactive glass and tricalcium phosphate implanted in sheep diaphyseal defects. **Biomaterials**, v. 16, p. 1175-1179, 2005.
- GHOLOUPOURMALEKABADI, M.; MOZAFARI, M.; GHOLOUPOURMALEKABADI, M.; NAZM, B.M.; HASHEMI-SOTEH, M.B.; SALIMI, M.; REZAEI, N.; SAMENI, M.; SAMADIKUCHAKSARAEI, A.; GHASEMI, H.H. In vitro and in vivo evaluations of three-dimensional hydroxyapatite/silk fibroin nanocomposite scaffolds. **Biotechnology and applied biochemistry**, p. 1-10, 2015.

- GUASTALDI, A.C. e APARECIDA, A.H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química nova**, v. 33, p. 1352-1358, 2010.
- HA, S.W.; PARK, Y.H.; HUDSON, S.M. Dissolution of Bombyx mori Silk Fibroin in the Calcium Nitrate Tetrahydrate-Methanol System and Aspects of Wet Spinning of Fibroin Solution. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 488-496, 2003.
- KIM, H.H.; PARK, J.B.; KANG, M.J.; PARK, Y.H. Surface-modified silk hydrogel containing hydroxyapatite nanoparticle with hyaluronic acid-dopamine conjugate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 70, p. 516-522, 2014.
- KWEON, H.Y.; LEE, K. G.; CHAE, C. H.; BALAZSI, C.; MIN, S. K.; KIM, J. Y.; CHOI, J. Y.; KIM, S. G. Development of nano-hydroxyapatite graft with silk fibroin scaffold as a new bone substitute. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 69, p. 1578-1586, 2011.
- LEE, K.H.; BAEK, D.H.; KI, C.S.; PARK, Y.H. Preparation and characterization of wet spun silk fibroin/ poly(vinyl alcohol) blend filaments. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, p. 168-172, 2007.
- LOPES, J.F.S. Avaliação da biocompatibilidade da hidroxiapatita nanoparticulada no subcutâneo de ratos. 127f. 2012. **Tese (Doutorado em Ciência da reabilitação)**; Universidade de São Paulo, Bauru-SP.
- MA, P.X. Scaffolds for tissue fabrication. **Materials today**, v. 7, p. 30-40, 2004.
- MACNEILL, S.R.; COBB, C.M. e RAPLEY, J.W. In vivo comparison of synthetic osseous graft materials. A preliminary study. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 26, p. 239-245, 1999.
- MINCRYST. **Crystallographic and Crystallochemical Database for Minerals and their Structural Analogues**: banco de dados, "CPDS-2086". Disponível em: <http://database.iem.ac.ru/mincryst/s_carta.php?HYDROXY-LAPATITE>. Acesso em: 28 maio de 2015.
- MING A.B.J.; ZHIJUAN, J.B.; WANG, B.P.; SHIYU, B.B.; ZUO, B. Silk fibroin/sodium alginate fibrous hydrogels regulated hydroxyapatite crystal growth. **Materials Science and Engineering C**, v. 51, p. 287-293 2015.
- MOSTAFA, A.A.; OUDADESSE, H.; EL-SAYED, M.M.H. A quantitative approach for studying the bioactivity of nanohydroxyapatite composites. **Journal of Biomedical Materials Research: Part A**, p. 1-35, 2015.

- POUYANI, T.; HARBISON, G.S. e PRESTWICHT, G.D. Novel hydrogels of hyaluronic acid: synthesis, surface morphology, and solid-state NMR. **Journal American Chemical Society**, v. 116, p. 7515-7522, 1994.
- ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**, v. 6, p. 317-320, 2003.
- SUN, F.; ZHOU, H.; LEE, J. Various preparation methods of highly porous hydroxyapatite/polymer nanoscalebiocomposites for bone regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 7, p. 3813-3828, 2011.
- VITAL, C.C; BORGES, A.P.B.; FONSECA, C.C.; TSIOMIS, A.C.; CARVALHO, T.B.; FONTES, E.B.; SENA, M.P.; FÓFANO, G. Biocompatibilidade e comportamento de compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p. 175-183, 2006.
- WILLIAMS, D.F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, p. 2941-2953, 2008.
- WOODARD, J.R.; HILLDORE, A.R.; LAN, S.K.; PARK, C.J.; MORGAN, A.W.; EURELL, J.A.C.; CLARK, S.G.; WHEELER, M.B.; JAMISON, R.D.; JOHNSON, A.J.W. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. **Biomaterials**, v.28, p. 45-54, 2007.

CAPÍTULO III

Compósitos de hidroxiapatita, fibroína da seda e ácido hialurônico no tratamento de defeitos ósseos experimentais: aspectos clínicos, radiográficos, microtomográficos e histológicos

PERDIGÃO, A.P.L. *et al.*

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a utilização de um compósito formado por hidroxiapatita, fibroína da seda e ácido hialurônico, foram realizados defeitos ósseos na ulna de coelho. Foram utilizados 40 animais, divididos em grupos controle e tratados, cada um contendo dez animais. Os compósitos implantados no defeito foram divididos cada um em três grupos tratados com HAP+FS; HAP+FS+1%AH e HAP+FS+3%AH. Foram feitas avaliações clínicas e radiográficas aos sete e 30 dias de pós-operatório. Amostras contendo o defeito foram coletadas aos sete e 30 dias para histologia e tomografia microcomputadorizada. A análise de microscopia eletrônica de varredura foi realizada aos 30 dias de pós-operatório. As avaliações clínicas e histopatológicas demonstraram um compósito biocompatível, e as radiografias demonstraram diminuição da radiopacidade dos grupos tratados e aumento da radiopacidade do grupo controle, até se manter semelhante à do osso adjacente. A tomografia microcomputadorizada demonstrou através de imagens tridimensionais uma diminuição maior do diâmetro do defeito no grupo tratado com HAP+FS+3%AH em comparação com os outros grupos, sugerindo ser o melhor tratamento para o crescimento de tecido ósseo. A histologia e a microscopia eletrônica de varredura revelaram uma interação compósito e tecido, com a formação de tecido ósseo ao redor do implante e a análise histomorfométrica revelou quantidade de trabéculas ósseas jovens maior no grupo tratado com HAP+FS+3%HA, demonstrando ser o melhor tratamento analisado neste estudo para os defeitos criados nos olecranos de coelhos.

Palavras chave: Biomaterial, engenharia de tecidos, osseointegração.

Composites of hydroxyapatite, silk fibroin, and hyaluronic acid in the treatment of experimental bone defects: clinical, radiographic, histologic and microtomography

PERDIGÃO, A.P.L. *et al.*

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the use of a composite consisting of hydroxyapatite, silk fibroin, and hyaluronic acid in bone defects in rabbit ulna. 40 animals were divided into control and treated groups, each containing ten animals. The composites implanted in the defect were divided into three groups each treated with HAP + FS; HAP + FS + 1% AH and HAP + FS + 3% AH. Clinical and radiographic evaluations were made at seven and 30 days postoperatively. Samples containing the defect were collected at seven and 30 days for histology and microtomography. Analyses of scanning electron microscopy were performed at 30 days postoperatively. Clinical evaluations demonstrated a biocompatible composite, and radiographs showed decreased radiopacity of the treated groups and increased radiopacity in the control group, all to become similar to the adjacent bone. The microcomputed tomography revealed three-dimensional images through a greater decrease in defect diameter in the group treated with PAH + FS + 3% HA in comparison with other groups, suggesting better treatment for bone tissue growth. Histopathology and scanning electron microscopy revealed a composite interaction and tissue with the formation of bone tissue around the implant and the histomorphometric analysis showed larger amount of young trabecular bone in the group treated with PAH + FS + 3% HA, proving to be the best treatment analyzed in this study for defects created in rabbits ulna.

Keywords: Biomaterial, tissue engineering, osseointegration.

1. INTRODUÇÃO

As modalidades de tratamento convencional utilizadas na reparação óssea podem levar a diminuição da qualidade de vida por aumentar a possibilidade de morbidades associadas, frequência maior em consultas médicas e maiores despesas financeiras (Carlo *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2005). Dessa forma, a bioengenharia tecidual óssea tem por objetivo desenvolver novos biomateriais que restaurem, melhorem ou impeçam o agravamento da função tecidual comprometida, superando as limitações dos tratamentos convencionais (Sachlos e Czernuszka, 2003). Atualmente, existem diversos biomateriais disponíveis. Eles podem ser classificados em relação à sua origem, composição química, resistência mecânica e configuração espacial (Giannoudis *et al.*, 2005; Abukawa *et al.*, 2006).

A hidroxiapatita, pertencente ao grupo das cerâmicas, possui excelentes propriedades para atuar como um biomaterial capaz de auxiliar o processo de regeneração óssea. Isso porque apresenta alta similaridade à composição mineral do osso, bioatividade e osteocondutividade, sendo uma alternativa potencialmente útil na engenharia de tecidos para reparação tecidual óssea (Borges *et al.*, 2000; Legeros, 2002).

A fibroína da seda tem atraído grande interesse em engenharia de tecidos devido à sua excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade e reação inflamatória mínima. Além disso, suas propriedades mecânicas de alta flexibilidade podem, em conjunto com a hidroxiapatita, oferecer uma resistência mecânica desejável e, dessa forma, atuar como um biomaterial promissor para a engenharia de tecidos, na forma de compósito (Meinel *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2015).

Adicionalmente, é importante salientar que o osso é um tecido responsável pelo suporte mecânico de toda a atividade muscular. A sua matriz extracelular (MEC) tem uma composição única, de minerais de fosfato de cálcio, principalmente sob a forma de hidroxiapatita, que proporcionam resistência e suporte para o tecido ósseo. Além disso, a matriz extracelular possui outros componentes em intensa atividade, necessários para manter o equilíbrio e a homeostasia do ambiente (Holzwarth e Ma, 2011 e Bose e Bandyopadhyay, 2012). O ácido hialurônico é um glicosaminoglicano presente na MEC e no fluido sinovial das articulações. Ele fornece flexibilidade e lubrificação tecidual sendo o principal componente da MEC nas articulações de suporte de carga (Leach e Schmidt, 2005; Price *et al.*, 2007; Collins e Birkinshaw, 2013). Também atua na manutenção da homeostase da matriz extracelular e das proteínas plasmáticas (Lisignoli *et al.*, 2005) e

exerce muitos papéis importantes na formação e reparo dos tecidos, atuando na proliferação e migração celular (Jha *et al.*, 2011).

Dessa forma, busca-se a união desses três biomateriais em um compósito tendo este capítulo como objetivo avaliar a resposta da hidroxiapatita e fibroína da seda, associado a concentrações diferentes de ácido hialurônico. Além disso, objetivou-se também avaliar e descrever se o compósito possui ou não propriedade osteocondutora e seu potencial em auxiliar a formação e regeneração de tecido ósseo, comparando os diferentes biomateriais testados quanto a essas características. Espera-se avaliar a interação osso-compósito, a partir da caracterização de tecidos e células envolvidas na resposta do organismo.

2. MATERIAL E METODOS

O presente trabalho experimental obteve sua metodologia aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFV sob protocolo número 61/14.

2.1. Biomaterial

Os compósitos estudados foram desenvolvidos pelo JHS Laboratório Químico Ltda., em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Foram avaliados três compósitos, os quais eram contituidos por hidroxiapatita sintética (HAP-91® Plus), fibroína da seda (FS) e ácido hialurônico (AH). As proporções de AH nas amostras eram de respectivamente 0, 1 e 3%, sendo então representadas, na forma de pó, como: HAP+FS+; HAP+FS+1%AH; HAP+FS+3%AH.

A proporção entre os biomateriais HAP e FS foi de 80% e 20% em peso, respectivamente, em todos os compósitos. O método de fabricação de cada compósito não pode ser informado, pois o mesmo encontra em processo de patente.

2.2. Modelo experimental

Foram utilizados 40 coelhos da raça Nova Zelândia, fêmeas, com aproximadamente 3,0 Kg de peso vivo e idade entre cinco e seis meses. Cada animal recebeu uma aplicação de ivermectina na dose de 0,4 mg/Kg por via subcutânea. Os animais foram acondicionados em gaiolas individuais, previamente higienizadas onde permaneceram por dois meses para aclimatação. Foi fornecido a cada um deles ração comercial e água *ad libitum*.

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais e tratados de forma correspondente a cada compósito, sendo os grupos denominados GI, GII, GIII e GIV. Cada grupo era composto por 10 animais. Os animais pertencentes ao grupo IV, também denominado grupo controle, não receberam nenhum tipo de tratamento, ou seja, o defeito foi preenchido com coágulo que se formou espontaneamente.

2.3. Procedimento cirúrgico

Como medicação pré-anestésica, os animais foram sedados com acepromazina na dose de 0,25 mg/kg pela via intramuscular e a anestesia foi induzida com associação de tiletamina e zolazepam na dose de 30 mg/kg, pela via intramuscular. Cada animal recebeu imediatamente antes da indução anestésica, 20 mg/Kg de cefazolina sódica, por via intramuscular, como profilaxia antimicrobiana. O anestésico usado para manutenção foi o isoflurano, administrado por via inalatória com o auxílio de máscaras, diluído em oxigênio 100% em quantidade suficiente para a realização do procedimento. Para melhor conforto trans e pós-operatório, foi realizado bloqueio regional, com 1,5 mL de lidocaína a 2%, na região do plexo braquial.

O campo operatório foi preparado com rigorosa assepsia necessária à cirurgia ortopédica. Foi feita a tricotomia do membro torácico direito desde a região proximal da diáfise do úmero até o carpo e a antissepsia (Figura 1A) seguiu os padrões adotados pelo Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa (HVT-UFV).

Foi realizada uma incisão curva de pele na superfície lateral da articulação úmero radio ulnar e posterior incisão na fáscia muscular do tríceps braquial, permitindo assim afastar parte do ventre da cabeça lateral e do tendão do músculo tríceps braquial em direção proximal ao olecrano e liberando parte da inserção lateral do tendão com uma lâmina de bisturi nº 10. Em seguida, foi realizada uma incisão reta de aproximadamente três centímetros de comprimento na bolsa tricipital, expondo assim, a superfície lateral do olecrano. Uma falha óssea foi realizada na cortical lateral do olecrano (Figura 1B), com o auxílio de uma broca trefina de 5 mm de diâmetro, acoplada a uma perfuratriz elétrica. Durante a perfuração, o local foi irrigado com solução fisiológica estéril para evitar aquecimento. Os animais pertencentes aos grupos I, II e III foram tratados com os compósitos HAP+FS, HAP+FS+1%AH e HAP+FS+3%AH, respectivamente, apresentados na forma de pó previamente preparados. Uma quantidade de 0,2 mg de compósito era umedecia com solução salina estéril e moldada em forma de comprimido de aproximadamente 5 mm de diâmetro, com o auxílio de uma seringa estéril. O defeito

então foi preenchido pelos compósitos 1, 2 e 3, de acordo com cada grupo (Figura 1C), sendo que os animais do grupo IV não receberam nenhum tipo de tratamento, ou seja, o defeito foi preenchido com coágulo que se formou espontaneamente. A musculatura foi suturada com fio não absorvível de náilon 2-0 em padrão Sultan. A pele foi aproximada em padrão simples separado, também com fio não absorvível de náilon 2-0.

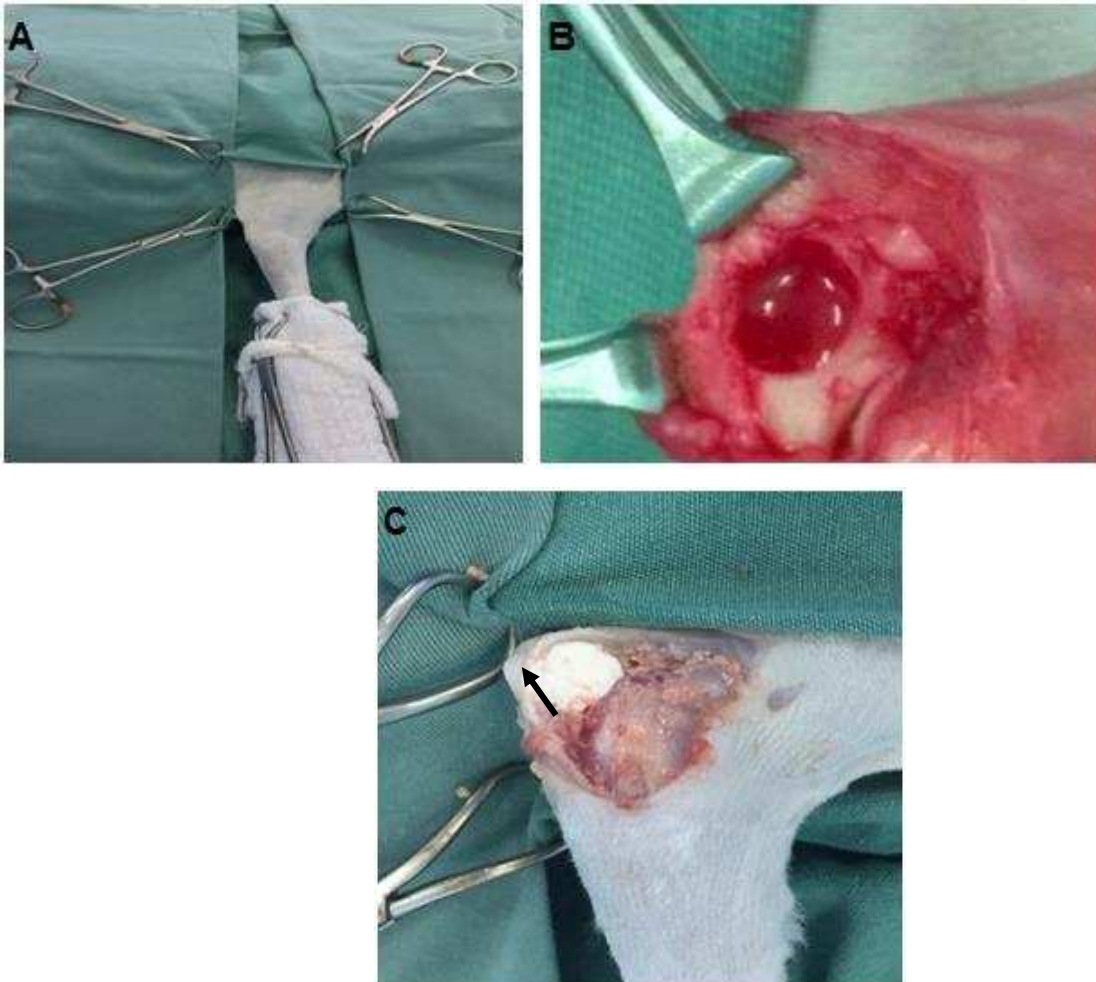


Figura 1: Procedimento cirúrgico para a realização do defeito experimental no olecrano de coelho. (A) Preparação do campo cirúrgico. (B) defeito ósseo no olecrano direito de coelho (seta preta), (C) defeito ósseo preenchido com o compósito HAP+FS+3%AH (seta preta).

2.4. Pós-operatório

A analgesia pós-operatória foi realizada com morfina (1 mg/kg) pela via subcutânea, sendo aplicada posteriormente ao procedimento cirúrgico e durante três dias consecutivos, a cada oito horas.

2.5. Exame clínico

Os animais foram avaliados clinicamente, seguindo o modelo proposto por Carlo *et al.* (2010), quanto a claudicação, edema, sensibilidade dolorosa, deiscência e infecção, durante os sete primeiros dias após a cirurgia e depois aos 30 dias.

Durante as avaliações clínicas, cada animal foi retirado da gaiola e colocado em um espaço apropriado, com o objetivo de deixá-lo o mais a vontade possível. A observação ocorreu num intervalo de 5-10 minutos e os escores de claudicação foram anotados, com base no apoio da extremidade do membro operado e a locomoção e movimentação de cada animal. A classificação dos escores era realizada da seguinte forma: 0 - sem claudicação, 1 - apoio com claudicação, 2 – ausência completa de apoio.

O edema do membro também foi avaliado e classificado como: 0- ausente; 1- discreto, quando limitou-se ao local da incisão cirúrgica; 2- moderado, quando notou-se aumento de volume também na face medial do membro, envolvendo toda a articulação; 3- intenso, quando estendeu-se por todo o membro.

Com relação à ferida cirúrgica, eram avaliados os padrões de sensibilidade dolorosa, deiscência e infecção. A sensibilidade dolorosa foi avaliada mediante a reação do animal ao toque da ferida cirúrgica e flexão e extensão da articulação úmero radioulnar, atribuindo-se os escores: 0 – Ausente, quando os animais não demonstraram nenhum tipo de reação ao toque da área operada; 1 - discreta, quando houve manifestação de dor após o toque da área operada; 2– moderada, quando o animal relutou em movimentar-se e 3- intensa quando, além das características de dor discreta e moderada, o animal apresentou-se prostrado e sem interesse pelo alimento. A deiscência da sutura foi avaliada em presente ou ausente, assim como a infecção da ferida cirúrgica, pela presença ou não de secreção purulenta no sítio cirúrgico.

Os dados clínicos obtidos foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunnett em caso de significância.

2.6. Exame radiográfico

Para análise radiográfica, foram realizadas radiografias de cada membro operado na posição mediolateral ao olecrano em todos os animais, imediatamente após a cirurgia, aos sete e aos 30 dias de pós-operatório.

Com o auxílio do programa ImageJ 1.47v, foi realizada uma comparação entre o local do defeito ósseo e o osso circunvizinho, com relação ao grau de radiopacidade

óssea. Duas regiões de interesse foram padronizadas em cada radiografia mediolateral analisada, com uma ampliação de 150%, compreendendo duas circunferências de escalas padronizadas: uma envolvendo a região do defeito (60 pixels) e outra envolvendo a região do osso circunvizinho (30 pixels) (Figura 2).

Em seguida, com o auxílio do programa ImageJ 1.47v, foi realizado o cálculo dos “graus de cinza” para cada região de interesse previamente selecionada e os dois resultados apresentados para cada radiografia foram avaliados através do coeficiente gerado entre eles: valores referentes ao “grau de cinza” da região do defeito e valores referentes ao “grau de cinza” do osso circunvizinho.

Seguindo o raciocínio de que 1 seria o valor padrão a ser encontrado (a radiopacidade entre as regiões deveria ser ou próxima de 1), os valores apresentados superiores a 1 representam uma maior radiopacidade comparada ao osso circunvizinho, que é caracterizado como osso normal. Os valores apresentados iguais a 1 sugerem a mesma radiopacidade entre as duas regiões avaliadas e os valores inferiores a 1 sugerem uma radiopacidade menor da região do defeito em relação ao osso circunvizinho.

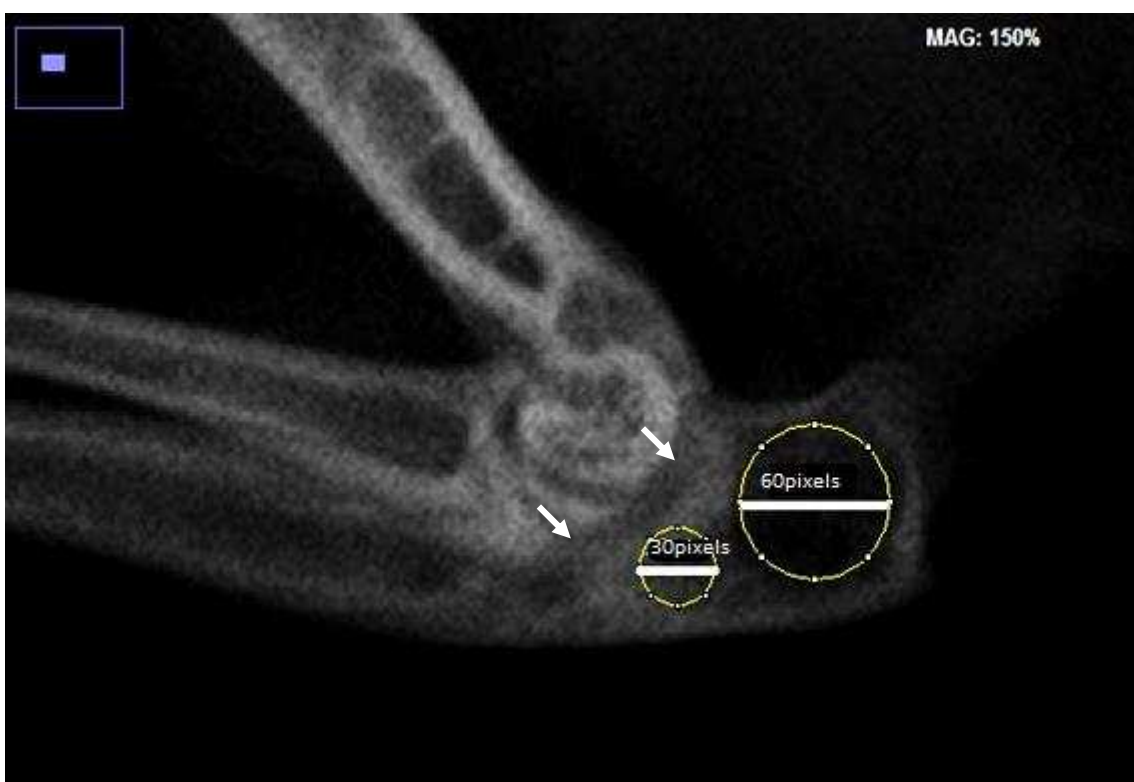


Figura 2: Imagens radiográficas de um animal do grupo controle, aos 30 dias de pós-operatório. A figura mostra a padronização das regiões a serem analisadas. As setas mostram a região selecionada do osso circunvizinho, com tamanho padrão de 30 pixels de diâmetro, e a região selecionada do defeito, com tamanho padrão de 60 pixels de diâmetro.

As análises radiográficas foram submetidas à análise de variância com dois fatores, considerando tratamento (grupos tratados e controle) e tempo (pós-operatório, sete e 30 dias) como variáveis independentes. Todas as análises foram feitas no programa estatístico SigmaPlot 11.0, considerando nível de significância de 5%.

2.7. Tomografia microcomputadorizada

Os animais sofreram eutanásia nos dias sete e 30 de pós-cirúrgico, com sobredose de propofol e cloreto de potássio de acordo com as normas exigidas pela Resolução 1000/2012 do CFMV. Então, foi realizada a coleta das amostras, as quais foram mantidas e fixadas em formol 10%.

Para as análises tomográficas, foram utilizadas quatro amostras de cada grupo, sendo duas amostras colhidas aos sete dias e outras duas colhidas aos 30 dias de pós-operatório. Por se tratar de uma avaliação não destrutiva, posteriormente essas amostras foram utilizadas para análise histológica.

Avaliaram-se, de forma qualitativa, características sugestivas de crescimento ósseo, como irregularidade de borda do defeito realizado no olecrano. As imagens bidimensionais foram obtidas pela tomografia microcomputadorizada (SkyScan 1174) em 33 kV e 34,1 mA, construídas posteriormente em formato tridimensional e descritos de forma qualitativa no estudo.

2.8. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise por microscopia eletrônica de varredura foi feita no Departamento de Física da UFV, utilizando um microscópio eletrônico de varredura marca JSM-6010LA, a voltagens de 15 kV. Para tal, primeiramente cada amostra foi fixada em parafina com a superfície lixada e posteriormente recoberta por uma camada de 20 nm de carbono, utilizando um sistema de deposição “sputteringbalzers” (ElectronMicroscopySciences, modelo 550x).

Foi utilizada uma amostra de cada grupo, coletadas aos 30 dias após a realização do procedimento cirúrgico as quais foram analisadas através da microscopia eletrônica de varredura por elétrons retroespalhados (MEV-R). As amostras para esse tipo de análise não são descalcificadas e, dessa forma, é possível os grânulos de hidroxiapatita e avaliar sua interação com o tecido ósseo. Parâmetros como a presença e interação do

biomaterial com o osso, identificação de crescimento tecidual ósseo, a partir de características como a presença de trabéculas neoformadas na região do defeito, foram identificados e descritos.

2.9. Avaliação histológica e histomorfométrica

O material colhido foi fixado em formol, descalcificado em solução de ácido fórmico e citrato de sódio e submetido a processo histológico de rotina para obtenção de lâminas com seções de 5 µm de espessura que foram coradas em hematoxilina e eosina. A avaliação foi realizada em cinco amostras de cada grupo aos sete dias após a cirurgia e outras quatro amostras aos 30 dias, coletando-se materiais contendo o defeito, biomaterial e tecidos adjacentes. Os tecidos e células presentes em toda a amostra foram caracterizados de forma descritiva, com ênfase na reação tecidual ao biomaterial. Quando presente, infiltrado inflamatório foi caracterizado.

A proporção entre a área na lâmina histológica ocupada pelo biomaterial, tecido conjuntivo e tecido ósseo foi mensurada por planimetria por contagem de pontos, totalizando 100 pontos analisados. A quantidade de osso e de biomaterial obtidos na análise histomorfométrica foram avaliados por ANOVA para dois fatores, considerando o tratamento e o momento da coleta como variáveis independentes, seguido pelo teste de Holm-Sidak em caso de $p < 0,005$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Exame Clínico

Apesar de todos os animais receberem analgesia durante os três primeiros dias após a cirurgia, eles apresentaram algum grau de sensibilidade dolorosa ao primeiro e segundo dia, diferente dos resultados apresentados por Carlo *et al.* (2010) em que os animais não manifestaram sensibilidade dolorosa em sua maioria e, quando presente, foi descrito como grau um. Tal diferença pode ser explicada pelo tamanho do defeito ósseo, que foi de 4 mm de diâmetro, resultando num maior trauma. Além disso, a sensibilidade dolorosa ao toque não é uma referência fidedigna, uma vez que a manifestação de dor apresentada pode ter sido influenciada pela presença e manipulação do examinador ao realizar as análises clínicas. Nesse estudo, a sensibilidade dolorosa foi relacionada diretamente com a presença ou ausência de claudicação dos animais. Todos os animais

apresentaram algum grau de claudicação e, conseqüentemente, sensibilidade dolorosa nos dois primeiros dias de pós-operatório. Um animal do grupo I, um animal do grupo II e dois animais do grupo controle apresentaram grau dois de claudicação e sensibilidade dolorosa nos dois primeiros dias, porém o quadro apresentou uma boa evolução e recuperação pós-cirúrgica já no terceiro dia. Todos os outros apresentaram grau um e o quadro de evolução também foi satisfatório. De forma semelhante, Vital *et al.* (2006) relataram a presença de claudicação em todos os animais e o retorno completo à função do membro somente ao sétimo dia após a realização das cirurgias.

Com relação à infecção cirúrgica e à deiscência, dois animais do grupo I, dois animais do grupo II e três animais do grupo controle apresentaram deiscência, sendo dois animais do grupo controle apresentando os dois padrões em questão. Entretanto, o rompimento dos pontos afetou apenas a sutura de pele e pode estar relacionado à interferência dos animais. Resultados semelhantes foram apresentados por Ochoa (2013), que também promoveu um defeito ósseo e para tratamento utilizou um compósito a base de hidroxiapatita, policaprolactona e alendronato. O autor também observou deiscência em alguns animais, porém, descreveu como uma condição individual de comportamento por parte de alguns animais. Os coelhos não se adaptam bem ao colar elisabetano e, mesmo com a presença do curativo, os animais tinham acesso à ferida cirúrgica e com isso ter interferido na mesma, o que explicaria a deiscência dos pontos e conseqüente contaminação.

O edema estava presente em todos os animais nos primeiros dias de pós-operatório, limitando-se somente a articulação envolvida na operação. Essa condição clínica já é esperada, e pode ser atribuída ao procedimento cirúrgico que promoveu um trauma tecidual e desencadeou uma resposta inflamatória local como descrito por Borges *et al.* (2000); Franco *et al.* (2001); Duarte *et al.* (2007), Vasconcelos *et al.* (2006), Vital *et al.* 2006, Fontes (2009) e Silva *et al.* (2012). A ausência intencional da administração de anti-inflamatórios também predispõe a essa condição.

As figuras 3, 4 e 5 abaixo apresentam, respectivamente, os resultados para a mediana referentes aos padrões clínicos avaliados: claudicação, edema e sensibilidade dolorosa. Os padrões de deiscência e infecção não foram representados, pois os valores das medianas eram iguais a zero tanto nos grupos tratados, quanto no grupo controle.

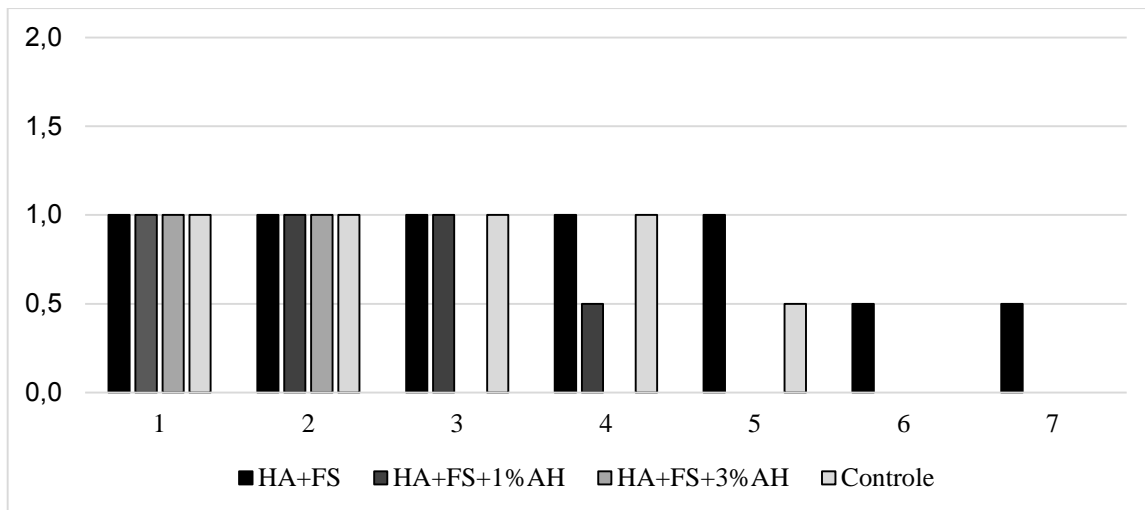


Figura 3: Representação gráfica das medianas obtidas na avaliação da claudicação em escala de 0 a 2, durante sete dias após o procedimento cirúrgico. HA: hidroxiapatita; FS: fibroína de seda; AH: ácido hialurônico.

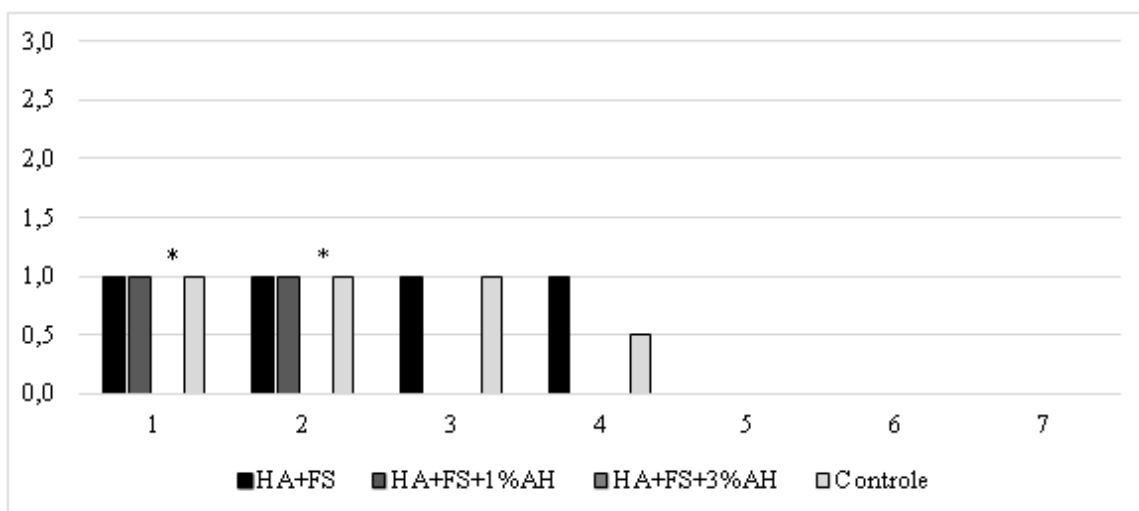


Figura 4: Representação gráfica das medianas obtidas na avaliação do edema, em escala de 0 a 3, durante sete dias após o procedimento cirúrgico. HA: hidroxiapatita; FS: fibroína de seda; AH: ácido hialurônico. (*) Diferença estatística nos testes Kruskal-Wallis e de Dunnett ($\alpha=5\%$) observada apenas nos dois primeiros dias do grupo que recebeu o compósito com 3% de ácido hialurônico em relação ao grupo controle no mesmo dia de avaliação.

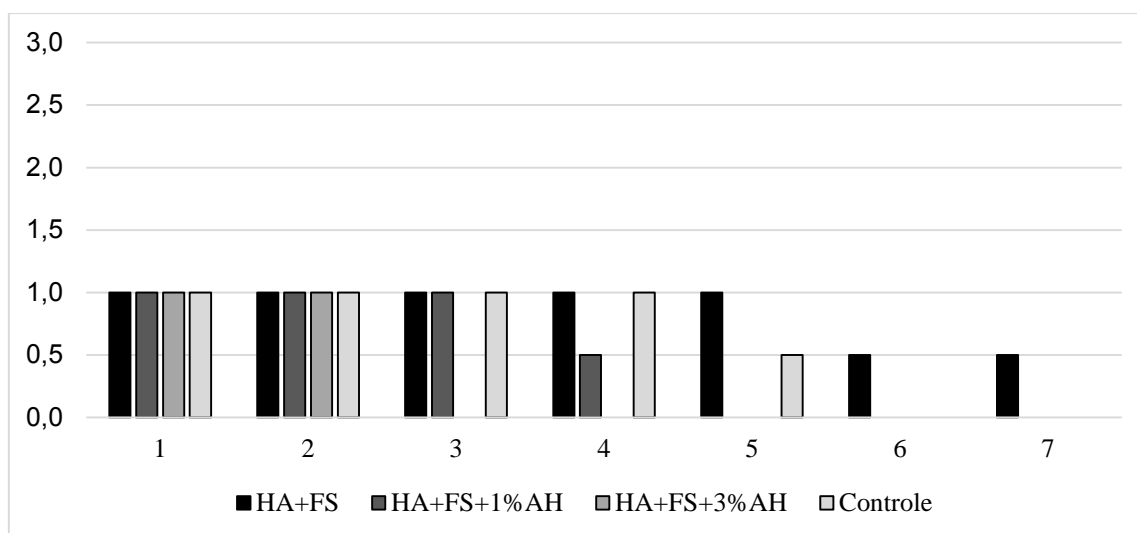


Figura 5: Representação gráfica das medianas obtidas na avaliação da sensibilidade dolorosa em escala de 0 a 3, durante sete dias após o procedimento cirúrgico. HA: hidroxiapatita; FS: fibroína de seda; AH: ácido hialurônico.

Os parâmetros avaliados no acompanhamento clínico dos animais ao longo dos sete dias após o procedimento cirúrgico para produção e tratamento do defeito ósseo foram brandos, à exceção de deiscência e infecção da ferida cirúrgica, que não foram significativos. Aos 30 dias, todos os sinais avaliados já não eram mais notados, por isso não foram representados nos gráficos. Os animais apresentaram claudicação de grau 1, em escala de 0 a 2, nos primeiros dias e não houve diferença estatística entre o que foi observado nos grupos tratados e o controle (Figura 3), indicando que a claudicação deveu-se ao procedimento cirúrgico apenas e não é afetada pelo material implantado.

Já para o edema, que não ultrapassou o grau 1 nos grupos que apresentaram a alteração, em uma escala que varia até 3, houve diferença estatística apenas nos dois primeiros dias entre o grupo que recebeu o compósito com 3% de ácido hialurônico e o grupo controle (Figura 4) – naquele grupo, o edema esteve ausente em todos os momentos avaliados. Nos grupos que apresentaram edema, essa característica não foi mais observada à partir do quarto dia. A sensibilidade dolorosa também não ultrapassou o grau 1, em escala de 0 a 3, e, assim como a claudicação, não apresentou diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle (Figura 5).

As avaliações clínicas são importantes para avaliar a biocompatibilidade dos compósitos, bem como avaliar também a eficácia da técnica cirúrgica e dos cuidados pós-operatórios. Resultados semelhantes foram encontrados em outros trabalhos (Oonishiet *al.*, 1997; Schmitzet *al.*, 1999; Vital *et al.*, 2006; Carlo *et al.*, 2010; Azevedo *et al.*, 2012; Ochoa, 2013). demonstrando uma satisfatória evolução clínica dos animais, enfatizando

todas as avaliações citadas, propondo então o uso do compósito no modelo experimental por se tratar de um biomaterial compatível, seguro e bem tolerado pelos animais.

3.2. Avaliação Radiográfica

As radiografias obtidas no pós-operatório do grupo controle se caracterizaram por apresentar radiopacidade menor da região do defeito, em comparação ao osso circunvizinho, apresentando bordas bem delimitadas e de fácil identificação, com ausência de reação periosteal (Figura 6A). Uma vez que neste grupo não houve nenhum tratamento, o coágulo que preencheu o defeito não possui, em sua constituição, elementos químicos com o número atômico em quantidade suficiente para torná-lo radiopaco e nem a presença de matriz calcificada, e por isso não pode ser identificado nas radiografias (Vital *et al.*, 2006; Duarte *et al.*, 2007; Sá *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2012; Ochoa, 2013). As radiografias referentes aos três grupos tratados HAP+FS, HAP+FS+1%AH, HAP+FS+3%AH apresentadas nas figuras 6B, 6C e 6D respectivamente, se caracterizaram por apresentar radiopacidade semelhante da região do defeito, em comparação ao osso adjacente. É possível delimitar as bordas do defeito, porém não foi observado halo transparente entre a borda exterior do implante e a borda inferior do defeito, como observado no estudo feito por Carlo *et al.*, (2010) e Tiomis *et al.*, (2010). Isso se deve ao fato do compósito testado, nesse trabalho, ser apresentado em forma de pó, preenchendo todo o espaço do defeito criado. A radiopacidade semelhante entre a região do defeito e o osso adjacente, observada nas radiografias dos três grupos tratados pode ser explicada pela presença do cálcio na constituição da hidroxiapatita nos três compósitos, que possui elementos químicos de alto número atômico em sua constituição, podendo ser observado na avaliação radiográfica (Borges *et al.*, 2000; Duarte *et al.*, 2007; Carlo *et al.*, 2010; Ochoa, 2013).

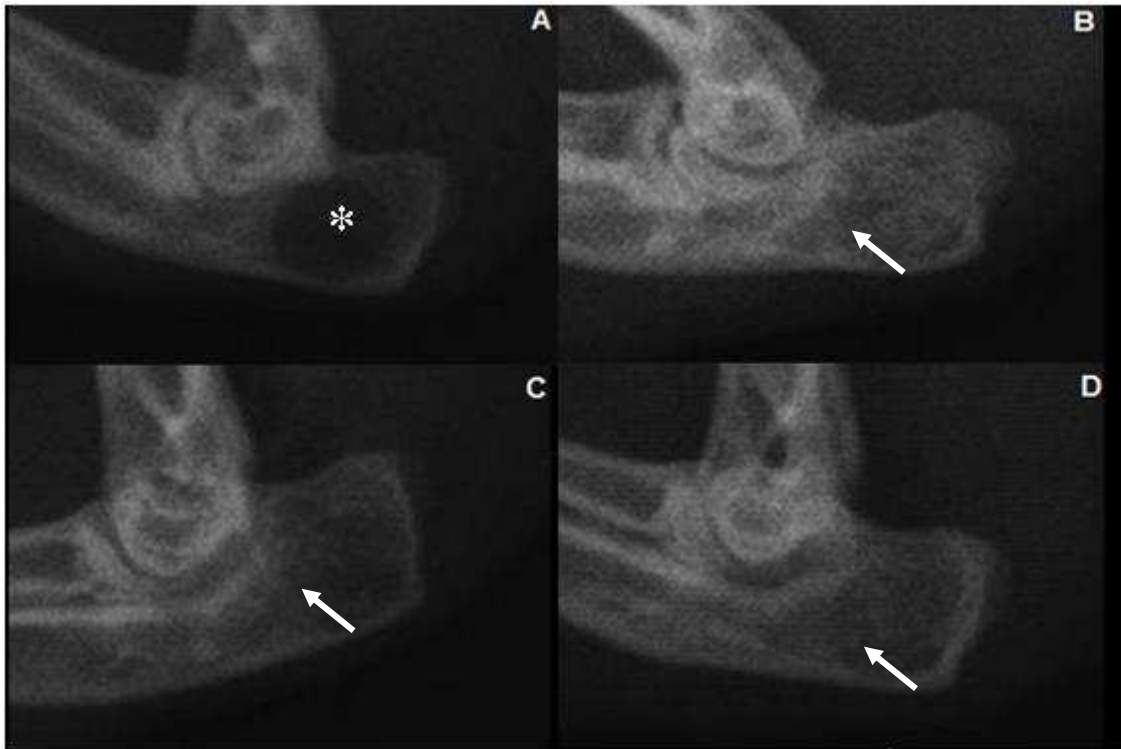


Figura 6: Radiografias mediolaterais do olecrano de coelho submetido à realização de defeito na cortical lateral e implantação de compósito no pós-operatório imediato. A- grupo IV (controle), sem compósito, B- grupo I (HAP+FS), C- grupo II (HAP+FS+1%AH), D- grupo III (HAP+FS+3%AH). HAP: hidroxiapatita; FS: fibroína de seda; AH: ácido hialurônico. Setas brancas indicam pontos de radiopacidade semelhantes a do osso circunvizinho, observadas nos grupos tratados. Asterisco indica região de radiopacidade menor a do osso circunvizinho, observada no grupo controle.

As radiografias referentes ao sétimo dia após a cirurgia apresentaram características semelhantes às radiografias realizadas no pós-operatório imediato para o grupo controle. Não houve regressão aparente do tamanho do defeito, as bordas continuavam bem delimitadas, não foi observada alteração na radiopacidade e nem presença de reação periosteal (Figura 7A). Essa etapa compreende o processo inicial de reparação tecidual, composta pela formação de osso imaturo de baixa densidade, além da presença de tecido conjuntivo e outros materiais orgânicos com baixa radiopacidade, como descrito por Borges *et al.* (2000) e Carlo *et al.* (2010). As radiografias referentes aos grupos tratados, HAP+FS; HAP+FS+AH1% e HAP+FS+AH3%, respectivamente (Figura 7B, 7C e 7D), apresentaram regiões de radiopacidade superior em relação ao osso adjacente, considerado normal. Tal observação também foi descrita por Vital *et al.* (2006) e pode ser explicada pela presença de hidroxiapatita que, em função dos seus constituintes químicos, possui um elevado número atômico, salientando ainda mais a radiopacidade (Ono *et al.*, 2000). Os animais pertencentes aos três grupos tratados

HAP+FS; HAP+FS+AH 1% e HAP+FS+AH 3% apresentaram em suas radiografias regiões de radiopacidade superior ao osso circunvizinho, no pós-operatório imediato.

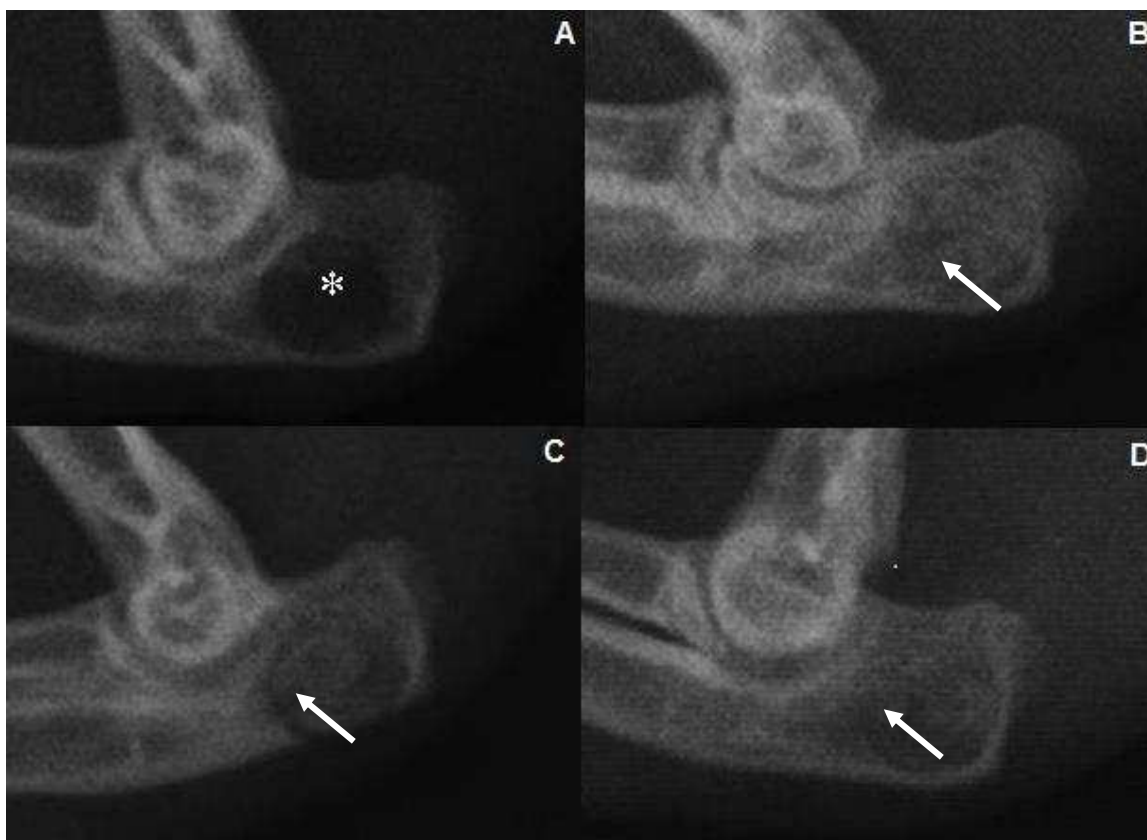


Figura 7: Radiografias mediolaterais do olecrano de coelho submetido à realização de defeito na cortical lateral e implantação de compósitos, aos 7 dias após a cirurgia. A- grupo IV (controle), sem compósito, B- grupo I (HAP+FS), C- grupo II (HAP+FS+1%AH), D- grupo III (HAP+FS+3%AH). HA: hidroxiapatita; FS: fibroína de seda; AH: ácido hialurônico. Setas brancas indicam pontos de radiopacidade superiores a do osso circunvizinho. Asterisco indica região de radiopacidade menor a do osso circunvizinho.

As radiografias do grupo controle referentes ao 30º dia de análise mostraram uma redução no tamanho do defeito, sugerindo crescimento ósseo, porém ainda com radiopacidade inferior à do osso adjacente (Figura 8A). Em dois animais desse mesmo grupo as radiografias foram caracterizadas com aumento da radiopacidade referente à região do defeito, semelhante ao osso circunvizinho, e o defeito estava menor, apresentando bordas de difícil delimitação (Figura 8B). Tais avaliações também foram observadas no grupo controle de um estudo feito por Duarte *et al.* (2006), que avaliaram a capacidade e osseointegração da hidroxiapatita em defeitos nos processos alveolares de cães. Essas características sugerem um processo de formação de tecido ósseo, Tal evidência também foi observada em um estudo feito por Carlo *et al.* (2010), no qual os

autores descreveram processos de reparação mais avançados por parte de alguns animais em relação aos demais. Chazono *et al.* (2004) relataram em suas pesquisas que as respostas e evoluções ao processo regenerativo ósseo são dependentes da combinação de três condições: física, química e biológica. Os fatores físicos abrangem aspectos como porosidade e cristalinidade. Os fatores químicos estão relacionados principalmente a composição individual do biomaterial. E os fatores biológicos incluem o grau de contato ósseo com o compósito, idade e aspectos individuais da fisiologia de cada animal. Portanto, os autores especularam que as diferenças na velocidade de formação de osso novo são atribuíveis a esses diversos fatores descritos. Nesse sentido, sugere-se que as manifestações biológicas ocorrem de forma individual de cada animal.

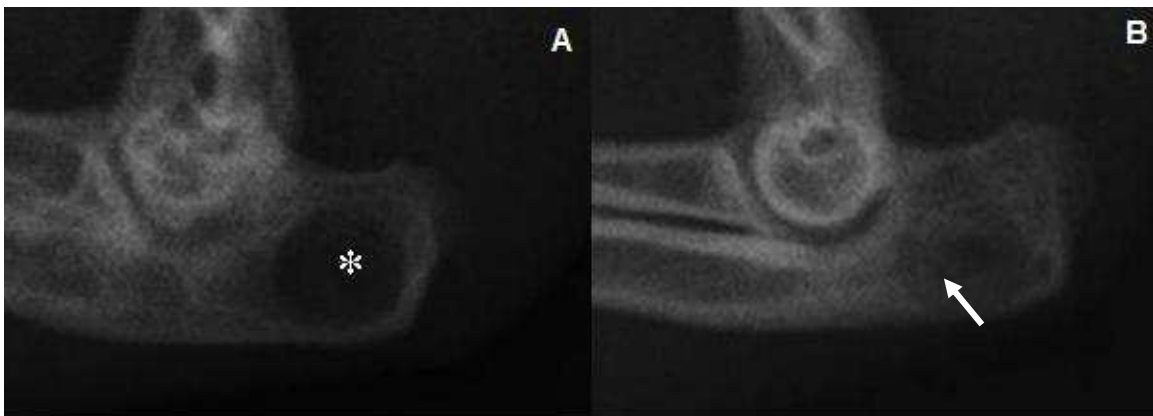


Figura 8: Radiografias mediolaterais do olecrano de coelho submetido à realização de defeito na cortical lateral referentes ao grupo controle (sem tratamento) aos 30 dias após a cirurgia. A- radiografia referente a um animal com radiopacidade inferior na região do defeito em comparação ao osso adjacente; B- radiografia referente a um animal com radiopacidade semelhante ao osso adjacente, sugerindo uma maior velocidade de evolução na reparação óssea. Asterisco indica radiopacidade menor ao osso adjacente. Seta branca indica radiopacidade semelhante ao osso adacente.

Os animais pertencentes aos grupos tratados HAP+FS; HAP+FS+AH1% e HAP+FS+AH3, respectivamente (Figura 9A, 9B e 9C), apresentaram em suas radiografias uma diminuição da radiopacidade na região do defeito, ainda que semelhante ao osso adjacente, quando relacionadas às radiografias realizadas no pós-operatório imediato e ao sétimo dia. A razão pela qual ocorre essa diminuição na radiopacidade não diz respeito à alteração na densidade da hidroxiapatita (HAP) e sim em função da proliferação de tecido conjuntivo e tecido ósseo ao redor do defeito e das partículas de HAP o que faz com que a imagem se torne mais radiotransparente, como descrito por Borges *et al.* (2000) e Vital *et al.* (2006). Foi observado também irregularidade nas bordas, sendo difícil

a delimitação das mesmas. Essa característica é sugestiva de reabsorção, neoformação de tecido ósseo e osseointegração. Resultados semelhantes foram observados em estudos realizados por Calvo-Guirado (2014) e seus colaboradores no qual se avaliou os processos de reabsorção e formação de tecido ósseo em grupos tratados com membranas a base de hidroxiapatita e colágeno implantados de defeitos previamente realizados em tíbias de coelhos. Um animal do grupo II apresentou fratura de olecrano e pode ser observada em sua radiografia reação periosteal. Porém, tal manifestação é condizente com sua apresentação clínica, sugerindo apenas ativação do periósteo para a formação de tecido ósseo e reparação frente a um trauma ocorrido.

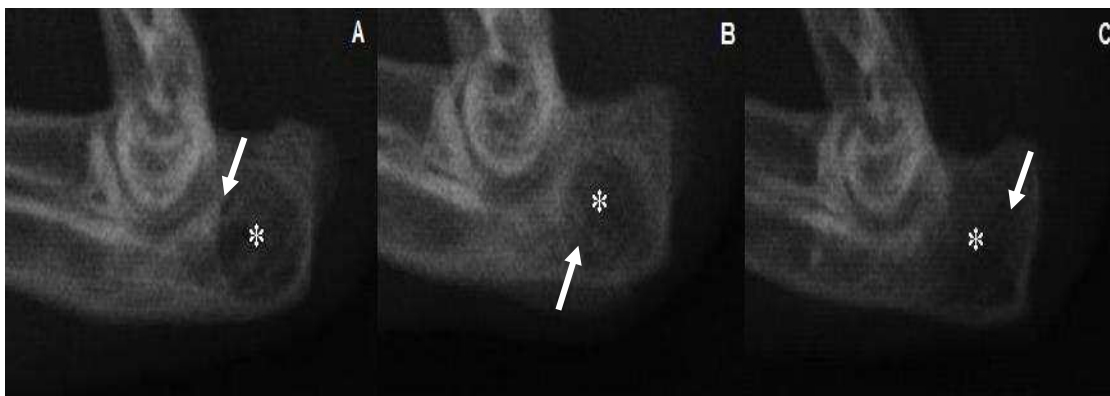


Figura 9: Radiografias mediolaterais do olecrano de coelho submetido à realização de defeito na cortical lateral e implantação de compósitos, aos 30 dias após a cirurgia. A- grupo I (HAP+FS), B- grupo II (HAP+FS+1%AH), C- grupo III (HAP+FS+3%AH). HA: hidroxiapatita; FS: fibroína de seda; AH: ácido hialurônico. Asteriscos indicam pontos de radiopacidade semelhantes a do osso circunvizinho, observadas nos grupos tratados, porém um pouco menor com relação aos dias 7 e pós-operatório imediato. Setas brancas indicam irregularidade nas bordas do defeito.

A análise radiográfica do olecrano revelou que, em todos os momentos estudados, os três tratamentos apresentaram radiopacidade relativa maior que no grupo controle ($p < 0,001$). Isso porque, ao longo do tempo, as bordas do defeito se tornaram bastante irregulares e de difícil delimitação, sugerindo crescimento ósseo. Embora não tenha havido diferença estatística nos valores ao longo do tempo ($p = 0,062$), há indícios de que a formação óssea colabore com algum aumento da radiopacidade nos grupos HAP+FS,

HAP+FS+1%AH e controle até os 30 dias (Figura 10). Nestes grupos, o desvio-padrão aumentou, indicando que a uniformidade do defeito e da aplicação do tratamento foi progressivamente variando segundo a resposta individual dos animais.

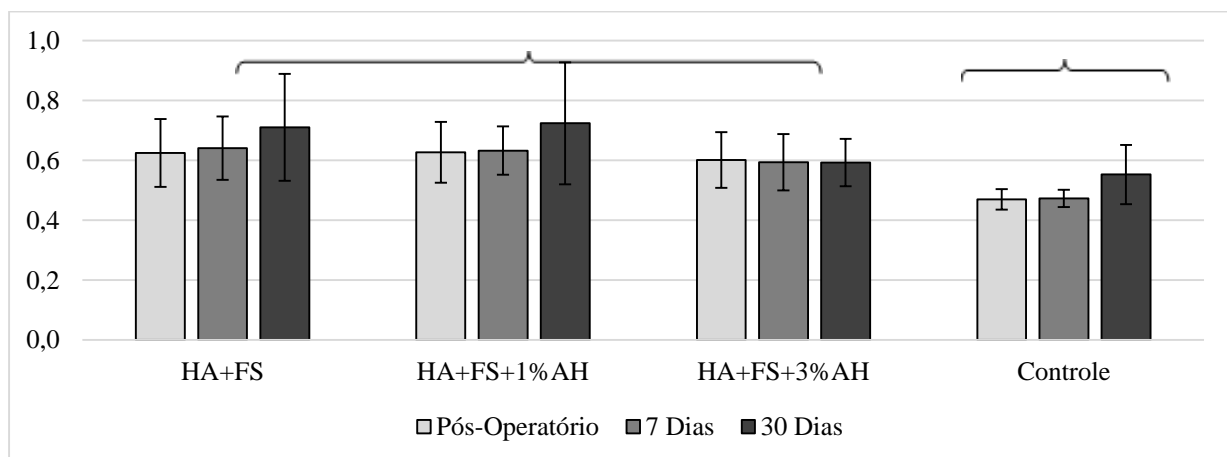


Figura 10. Representação gráfica das médias e desvios-padrão obtidos na análise radiográfica dos olecranos. HA: hidroxiapatita; FS: fibroína de seda; AH: ácido hialurônico. As chaves na parte superior do gráfico agrupam tratamentos estatisticamente semelhantes, segundo o teste ANOVA para dois fatores ($\alpha=5\%$).

3.3. Tomografia microcomputadorizada

As imagens por tomografia microcomputadorizada dos grupos tratados e controle são mostradas na figura 11 sendo que as amostras foram avaliadas de forma descritiva, com a observação de regeneração e crescimento ósseo ocorrido entre os sete e 30 dias de pós-operatório.

Segundo Ajzen *et al.* (2005), os avanços tecnológicos ocorridos no diagnóstico por imagem, somados aos já existentes, têm promovido um novo impulso para o desenvolvimento da medicina, principalmente com a introdução da Tomografia Computadorizada. Para Azevedo, (2013), a tomografia, bem como sua capacidade de revelar imagens tridimensionais através de alguns programas de reconstrução, tornou possível a exploração minuciosa da arquitetura óssea permitindo a avaliação de sua constituição, localização, extensão de uma determinada lesão, e a sua relação com a estrutura óssea adjacente. Scarfeet *al.* (2006) também relata que essa técnica é capaz de proporcionar imagens e estruturas de forma nítida, com um contraste elevado, imagens tridimensionais, sendo muito importante para a avaliação do tecido ósseo

A coloração escura observada no interior do defeito das imagens obtidas das amostras do grupo controle aos sete dias (Figura 11A) e aos 30 dias de pós-operatório (Figura 11B) indica que o tecido presente nesse local possui baixa densidade, não sendo detectado pelo tomógrafo. É possível observar que houve uma perda na regularidade da borda do defeito, sugestivo de formação de tecido ósseo. Nas imagens 11C e D (grupo tratado com HAP+FS aos sete e 30 dias, respectivamente) observa-se o preenchimento do defeito por um material com densidade semelhante a do tecido ósseo, observada pela coloração homogênea na região. A perda de regularidade da borda do defeito foi mais evidente, em comparação ao observado no grupo controle o que pode ser sugestivo de crescimento ósseo. Tais eventos também foram observados nas amostras dos grupos tratados com HAP+FS+1% AH (Figura 11E e F) e com maior evidência de crescimento ósseo nos animais tratados com HAP+FS+3%AH (Figura 11G e H). As bordas irregulares se mostraram ainda mais evidentes, em comparação a todas as outras amostras, sugerindo, qualitativamente, o melhor tratamento apresentado. Resultados semelhantes foram observados por Dornas (2013), o qual realizou um estudo utilizando cimento a base de β -fosfato tricálcio em defeitos ósseos no crânio de coelhos e, através da análise tomográfica, observou crescimento ósseo pela diminuição do diâmetro e perda de regularidade das bordas do defeito sugerindo absorção do biomaterial no grupo tratado.

No entanto, devido à similaridade entre a composição óssea e o biomaterial implantado, principalmente em decorrência da presença de hidroxiapatita, não foi possível distinguir o material do tecido, sendo essa análise complementada pela avaliação histológica, histomorfométrica e através da análise realizada pela microscopia eletrônica de varredura.

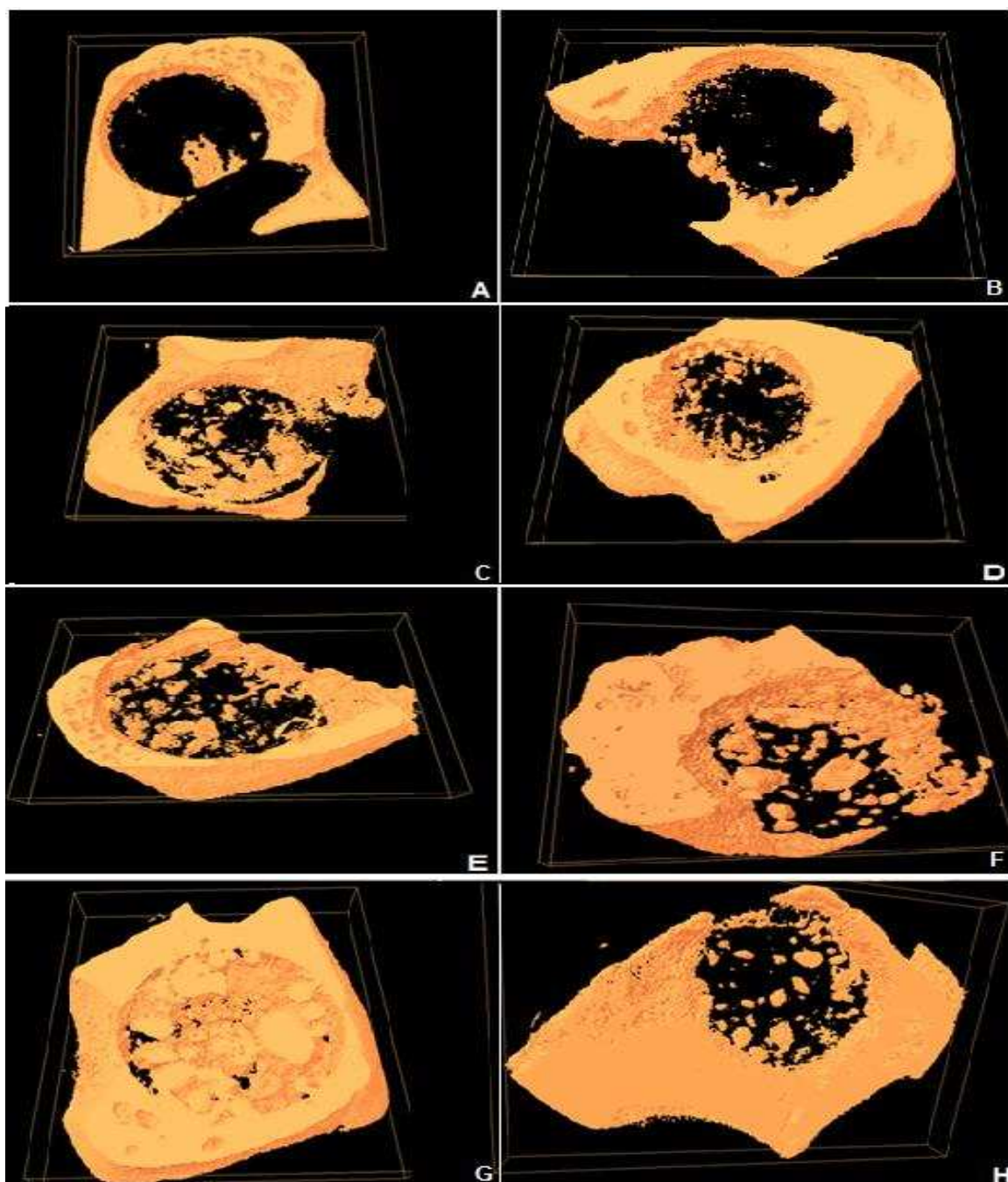


Figura 11: Reconstrução em três dimensões das imagens tomográficas das amostras de tecido ósseo retirado do olecrano dos coelhos. A e B - Amostras de tecido ósseo retirados do olecrano de coelhos do grupo controle, aos sete e trinta dias, respectivamente. C e D - Amostras de tecido ósseo retirados do olecrano de coelhos do grupo tratado com HAP+FS, aos sete e trinta dias, respectivamente. E e F- Amostras de tecido ósseo retirados do olecrano de coelhos do grupo tratado com HAP+FS+1%AH, aos sete e trinta dias, respectivamente. G e H- Amostras de tecido ósseo retirados do olecrano de coelhos do grupo tratado com HAP+FS+3%AH, aos sete e trinta dias, respectivamente.

3.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os resultados observados nesse estudo, utilizando esse método como análise, foram importantes para avaliar a osseointegração presente na interface compósito e tecido ósseo, uma vez que, segundo Lopéz (2007), é um método capaz de fornecer informações interessantes, pois permite níveis maiores de resolução, em comparação com microscópio óptico, caso haja dúvidas em relação à natureza da interface. Além disso, para Maia Filho (2013), é uma técnica que permite a observação da arquitetura óssea, ideal para avaliar processos de reparação e maturação do tecido em crescimento. Além disso, podemos observar os grânulos de HAP, diferentemente da histologia, na qual a amostra passa pelo processo de descalcificação.

Nesse estudo, foi possível observar um processo de formação de tecido ósseo em torno do biomaterial, com a presença de trabéculas jovens e em formação próximos ao compósito implantado em todos os grupos tratados (Figura 12, 13 e 14).

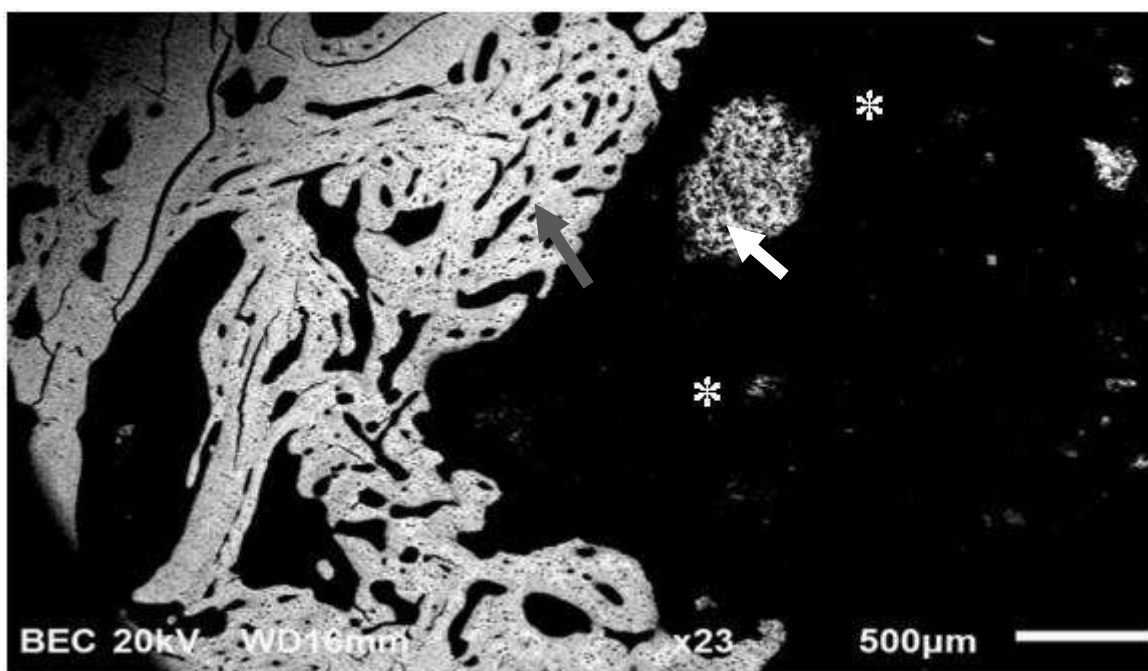


Figura 12: Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura pela técnica de retrodispersão (MEV-R) referente ao grupo tratado com o compósito HAP+FS, após 30 dias de cirurgia. Seta branca indicando o compósito e seta cinza indicando uma região de trabéculas jovens, recém formadas próximas ao biomaterial e os asteriscos indicando a região do defeito.

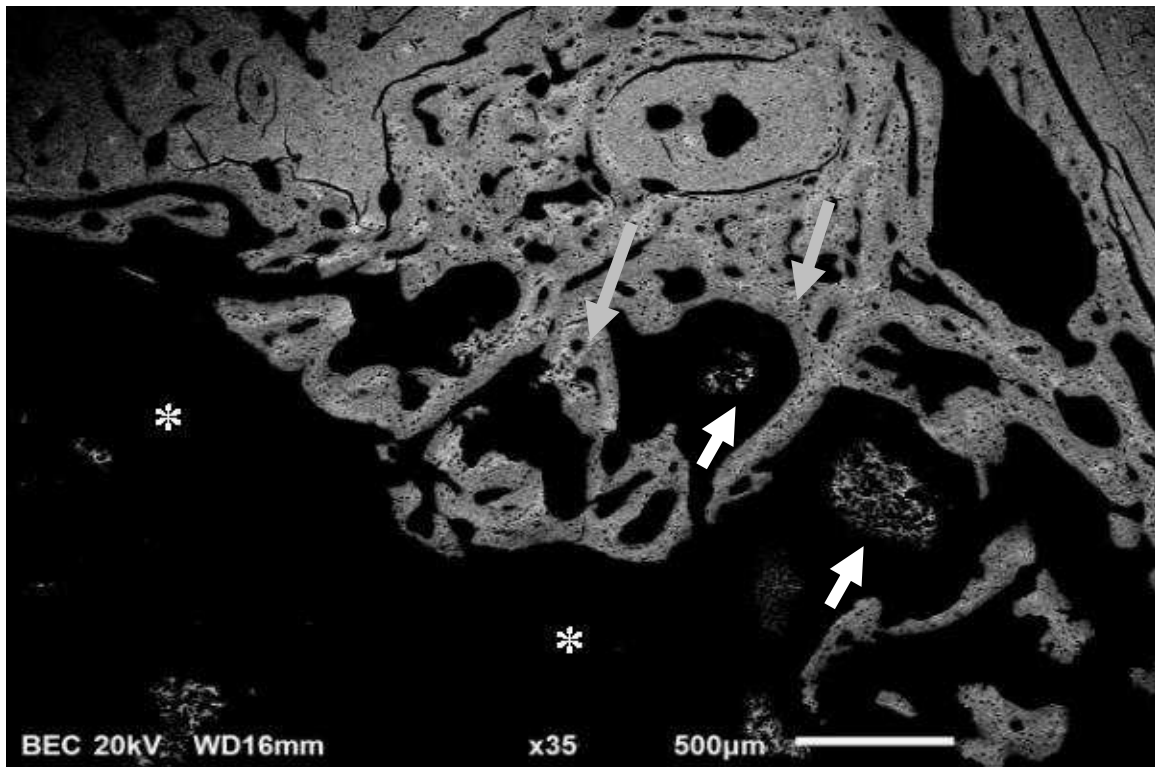


Figura 13: Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura pela técnica de retrodispersão (MEV-R) referente ao grupo tratado com o compósito HAP+FS+1%AH, após 30 dias de cirurgia. Seta branca indicando o compósito e seta cinza indicando uma região de trabéculas jovens, recém-formadas próximas ao biomaterial e os asteriscos indicando a região do defeito.

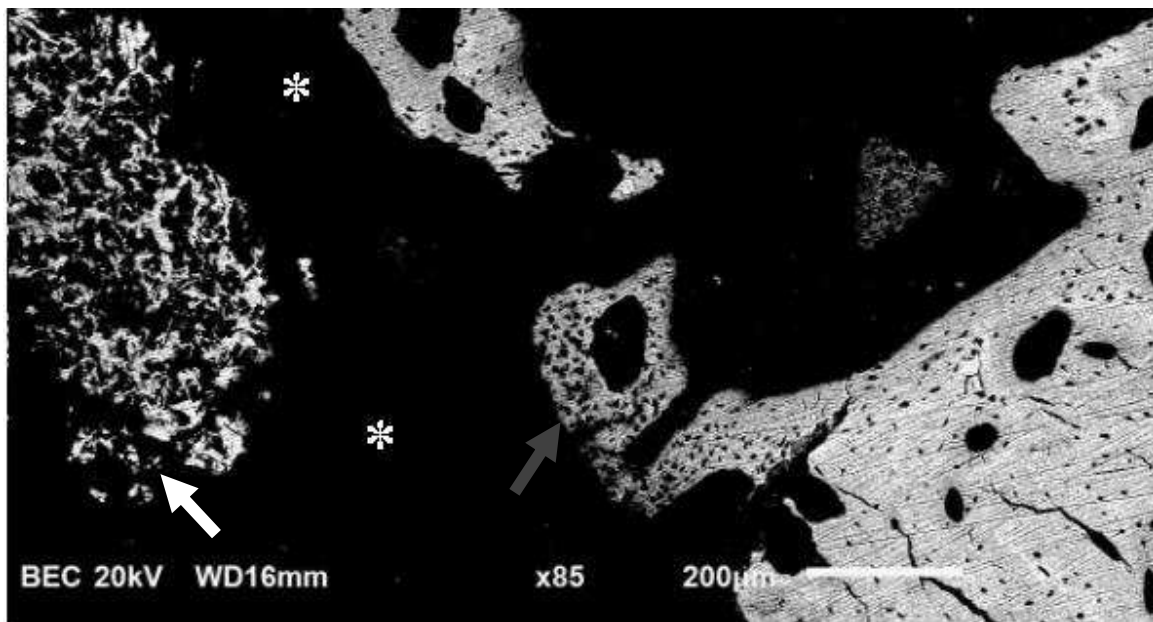


Figura 14: Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura pela técnica de retrodispersão (MEV-R) referente ao grupo tratado com o compósito HAP+FS+3%AH, após 30 dias de cirurgia. Seta branca indicando o compósito e seta cinza indicando uma região de trabéculas jovens, recém formadas próximas ao biomaterial e os asteriscos indicando a região do defeito.

Ao grupo controle também foi possível observar a presença de trabéculas neoformadas na borda onde foi realizado o defeito (Figura 15). Resultados semelhantes também foram observados por Maia Filho, (2013), que utilizou implante à base de hidroxiapatita em defeitos criados na tíbia de coelho e observou através da microscopia eletrônica de varredura, a formação de trabéculas ósseas jovens e crescimento ósseo ao redor do implante.

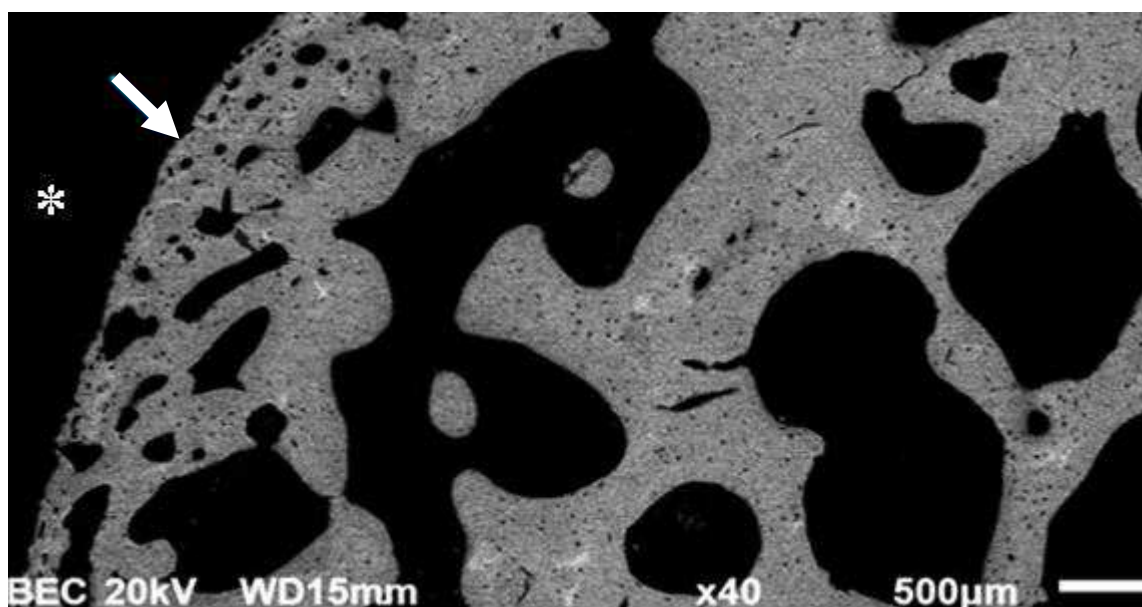


Figura 15: Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura pela técnica de retrodispersão (MEV-R) referente ao grupo controle, após 30 dias de cirurgia. Seta branca indicando uma região de trabéculas jovens, recém formadas e asterisco indicando a região do defeito.

3.5. Avaliação Histológica e histomorfométrica

Ao sétimo dia após a realização das cirurgias, as amostras referentes ao grupo controle apresentaram um processo inflamatório condizente com uma reparação fisiológica após uma lesão óssea (Figura 16A). Havia um processo inflamatório moderado, com muitas células da linhagem monocítica logo nas bordas onde foi realizado o defeito. Observou-se a formação de trabéculas ósseas novas organizadas com a medula óssea e entremeadas em um tecido conjuntivo denso e bastante vascularizado, com a observação de alguns pontos de coágulo ao longo da borda do defeito, ocupando a região lesionada. A formação das trabéculas novas foi caracterizada após a observação de um tecido ósseo

emaranhado a um tecido conjuntivo denso, com a presença de osteoblastos nas bordas, e uma grande densidade de osteócitos no interior do tecido ósseo, caracterizando um processo ativo de remodelação óssea (Figura 16B). Esses resultados foram semelhantes aos resultados apresentados por Carlo *et al.* (2010) e Ochoa (2013), que também realizaram um defeito em olecrano de coelhos e com o grupo controle apresentando um processo de remodelação similar ao descrito, caracterizado como um processo normal de reparação óssea.

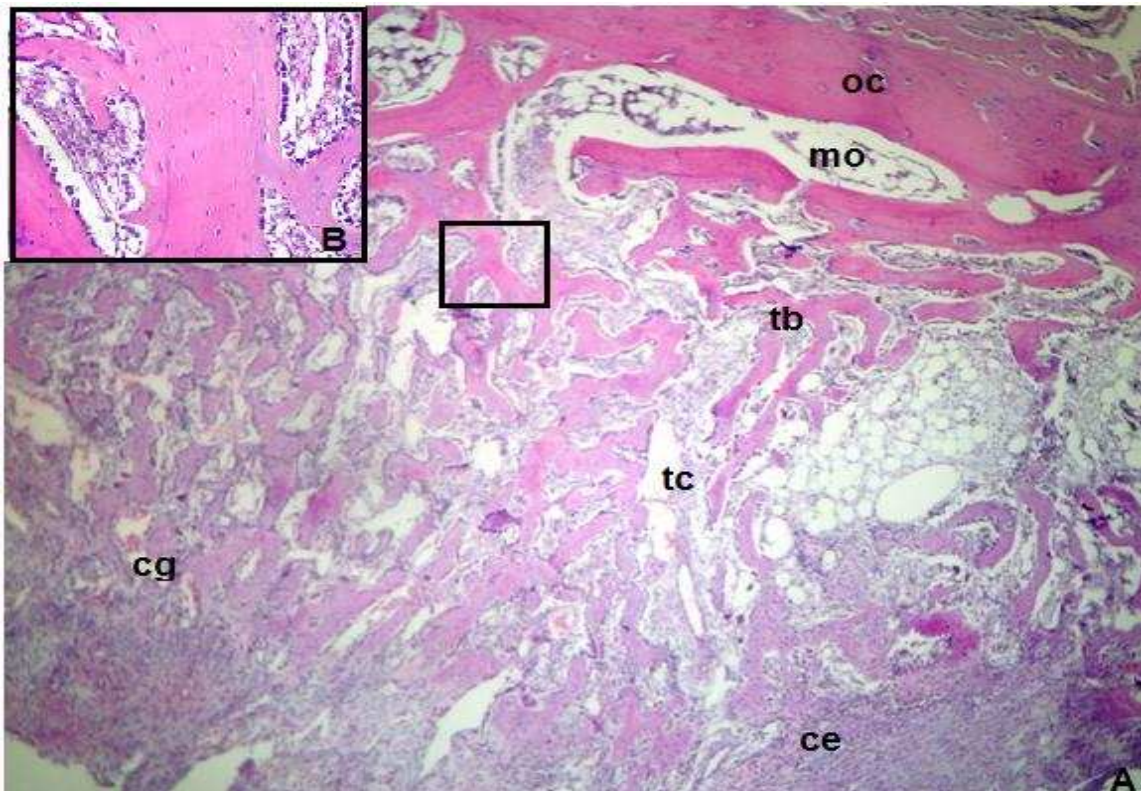


Figura 16- Micrografia representando a região do defeito realizado no olecrano de coelho do grupo controle, sete dias após a cirurgia. A- osso cortical (oc); Medula óssea (mo); trabéculas ósseas recém formadas (tb); tecido conjuntivo denso e vascularizado (tc); coágulo sanguíneo (cg) e células inflamatórias da linhagem monocítica na borda do defeito (ce). HE, 100x. B- trabéculas ósseas recém formadas, com osteoblastos ativos nas bordas trabeculares (setas). HE, 200x.

Os grupos HAP+FS; HAP+FS+1%AH e HAP+FS+3%AH aos sete dias de pós-operatório apresentaram uma arquitetura tecidual muito semelhante àquela apresentada pelos animais do grupo controle (Figura 17 A, B e C).

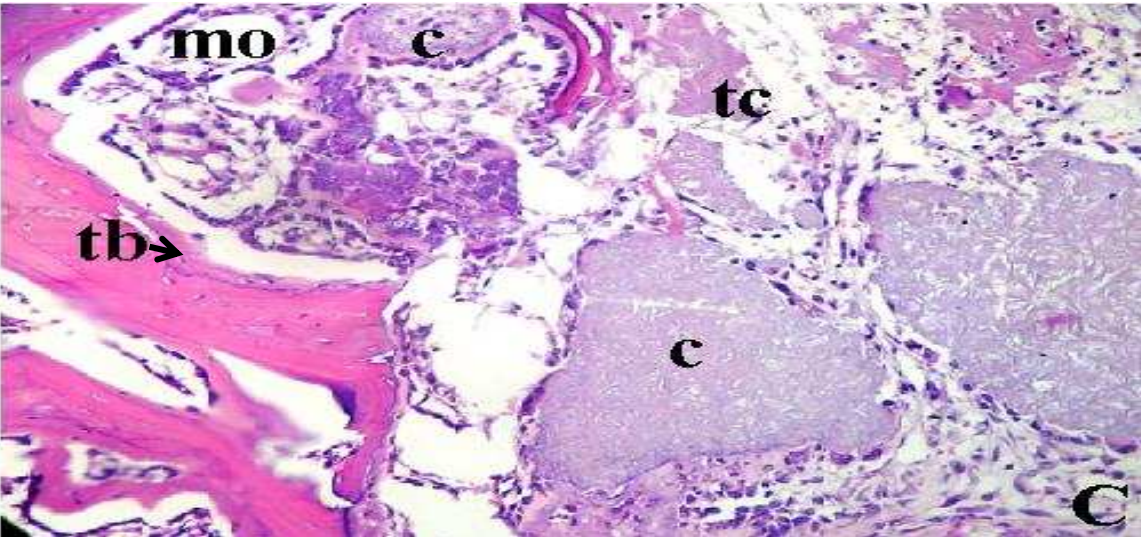
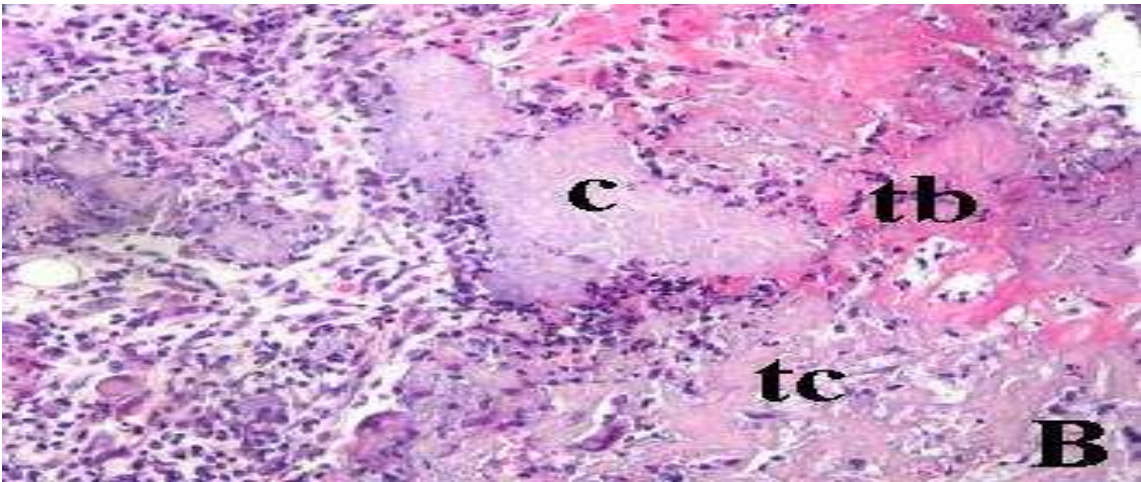
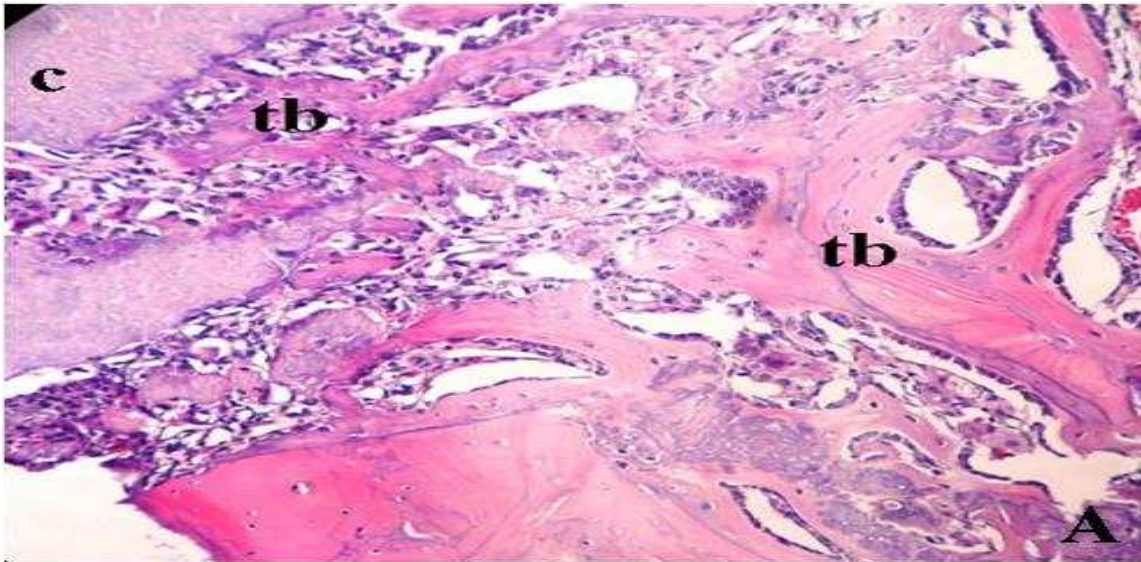


Figura 17- Micrografia representando a região do defeito realizado no olecrano sete dias após a cirurgia, submetida à implantação dos compósitos: A- HAP+FS (100x, HE); B- HAP+FS+1%AH (200x, HE) e C- HAP+FS+3%AH (200x, HE). Compósito (c); Medula óssea (mo); trabéculas ósseas recém formadas (tb); tecido conjuntivo denso e vascularizado (tc).

Seguindo a partir do osso cortical, foi possível observar uma organização intensa de neoformação de tecido ósseo trabecular envolvido por tecido conjuntivo denso e vascularizado. As trabéculas também eram envolvidas por osteoblastos, tornando evidente a atividade de remodelação óssea, além da alta densidade de osteócitos no interior dessas trabéculas. Entre as trabéculas observava-se a presença de espaço medular. Foi possível observar também a presença de tecido ósseo recém-formado envolto aos compósitos na região da borda do defeito. Resultados semelhantes foram apresentados por Walsh *et al.* (2003) e Pinheiro *et al.* (2008) os quais também observaram a formação óssea ao redor do biomaterial implantado.

Ao trigésimo dia após a realização das cirurgias, o grupo controle apresentava ainda uma atividade de remodelação óssea, com a presença de trabéculas recém-formadas mais organizadas, osteoblastos ativos nas bordas trabeculares e alta densidade de osteócitos no interior das trabéculas novas (Figura 18). Houve uma diminuição na quantidade de tecido conjuntivo denso, ocorrida pela formação de trabéculas ósseas novas e substituição do espaço antes ocupado por esse tecido. Cardoso *et al.* (2006) apresentaram resultados diferentes em suas análises. Os autores realizaram um defeito de 8 mm de diâmetro no crânio de coelhos e trataram com compósitos a base de biovidro. O grupo controle não era preenchido com nenhum material e aos 30 dias da coleta, relataram que os animais deste grupo não apresentaram proliferação de osteoblastos e nem formação óssea, com ausência de mineralização na região do defeito. Outros autores também apresentaram resultados semelhantes, sem observação de remodelação óssea após a realização de um defeito previamente realizado (Walsh *et al.*, 2003; Ruehe *et al.*, 2009). Segundo Borges *et al.* (2000) e Schmitz *et al.* (2009) em um defeito ósseo sem tratamento, os fatores de crescimento como as proteínas morfogenéticas liberadas na região após a lesão promovem a diferenciação celular para a formação de osteoblastos, que são as células especializadas na mineralização da matriz óssea. Entretanto, em consequência da ausência de uma matriz suporte para dar continuidade ao tecido lesionado entre outros fatores, a diferenciação osteoblástica se torna limitada, e o processo de remodelação é mais lento.

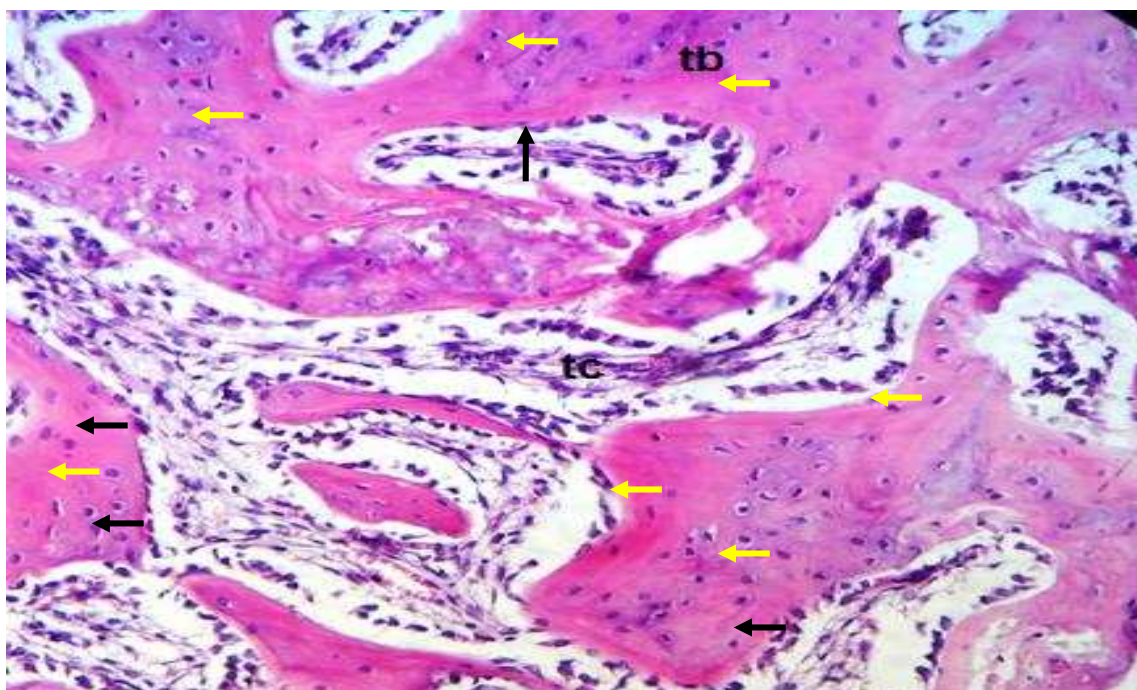


Figura 18- Micrografia representando a região do defeito realizado no olecrano de coelho do grupo controle, 30 dias após a cirurgia. Trabéculas ósseas recém formadas (tb); tecido conjuntivo denso e vascularizado (tc). HE, 400x. As setas pretas indicam a presença de osteoblastos nas bordas trabeculares e setas amarelas os osteócitos no interior das trabéculas.

Nas amostras do grupo tratado com HAP+FS (Figura 19) observou-se a presença de um tecido ósseo trabecular mais organizado, em comparação as amostras de sete dias, com trabéculas mais espessas e em menor numero, e poucos osteoblastos ativos, concentrados em algumas regiões separados por um tecido conjuntivo de interface, semelhantes aos resultados apresentados no estudo feito por Carlo *et al.* (2010) .Não foram observadas trabéculas no interior do compósito e nem uma interação direta entre o compósito e o tecido ósseo imaturo, cujo a interface era preenchida por tecido conjuntivo denso e vascularizado.

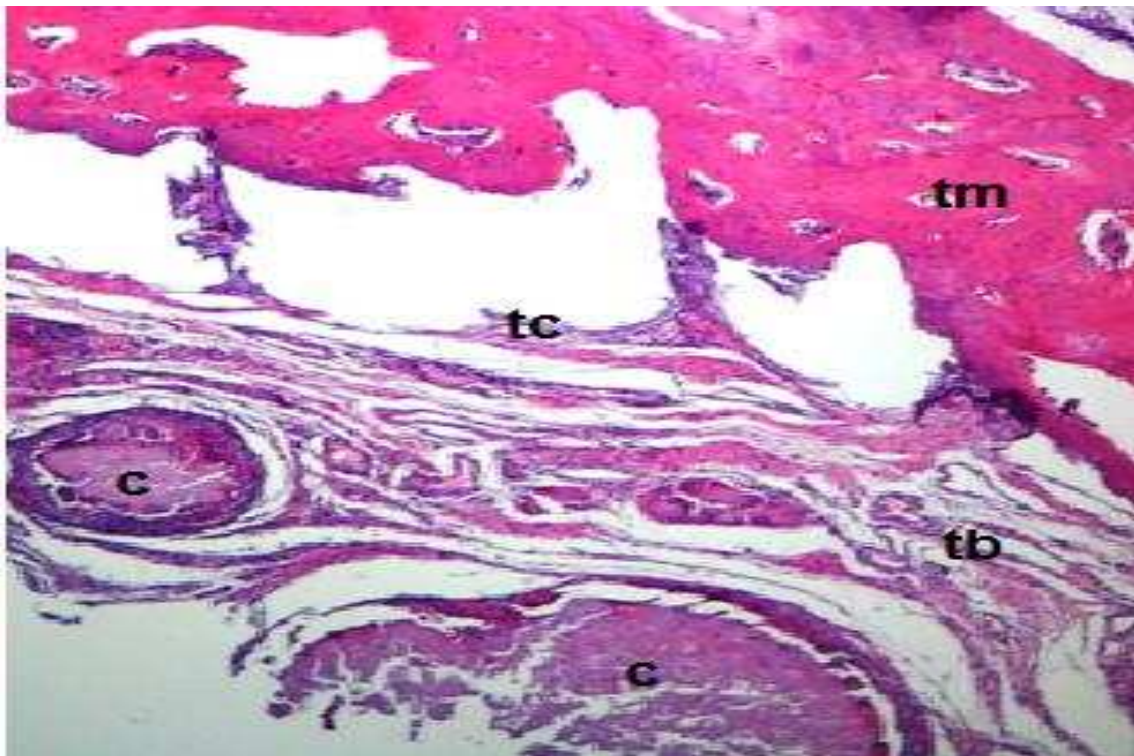


Figura 19: Micrografia representando a região do defeito realizado no olecrano de coelho do grupo HAP+FS. Compósito (c); Osso trabecular organizado (tm); trabéculas ósseas recém-formadas (tb); tecido conjuntivo denso e vascularizado (tc).

Diferentemente dos resultados apresentados para o compósito de HAP+FS, as amostras referentes aos animais tratados com HAP+FS+1%AH (Figura 20) e HAP+FS+3%AH (Figura 21) apresentaram tecidos ósseos trabeculares mais maduros, espessos e organizados, porém ainda havia um intenso processo de remodelação óssea, com fácil observação de osteoblastos ativos nas bordas das trabéculas recém-formadas, próximas ao implante. A formação de trabéculas foi observada também na interface compósito e tecido ósseo, sugestivo de osseointegração, semelhante aos resultados apresentados por Vital *et al.* (2006); Carlo *et al.* (2010) e Ochoa (2013) que também observaram formação de trabéculas ao redor do implante, a base de hidroxiapatita.

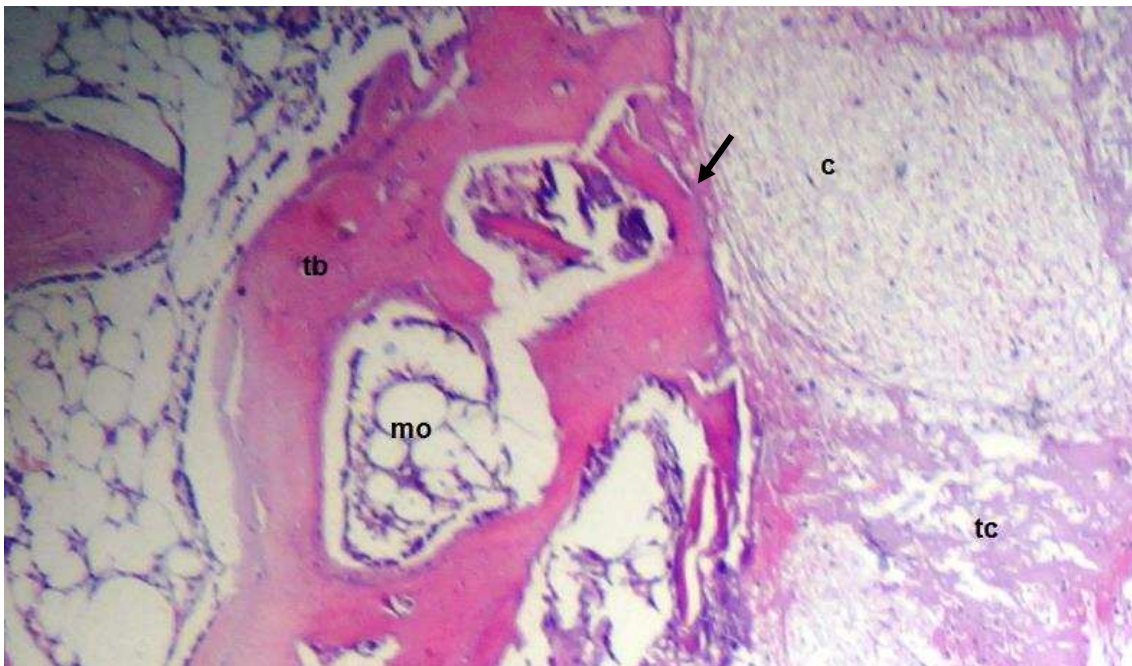


Figura 20: Micrografia representando a região do defeito realizado no olecrano trinta dias após a cirurgia, submetida à implantação do compósito HAP+FS+1%AH. Compósito (c); trabéculas ósseas recém formadas (tb); tecido conjuntivo denso e vascularizado (tc); medula óssea (mo). Seta preta indica região de interface compósito e tecido ósseo, sugestivo de osseointegração.

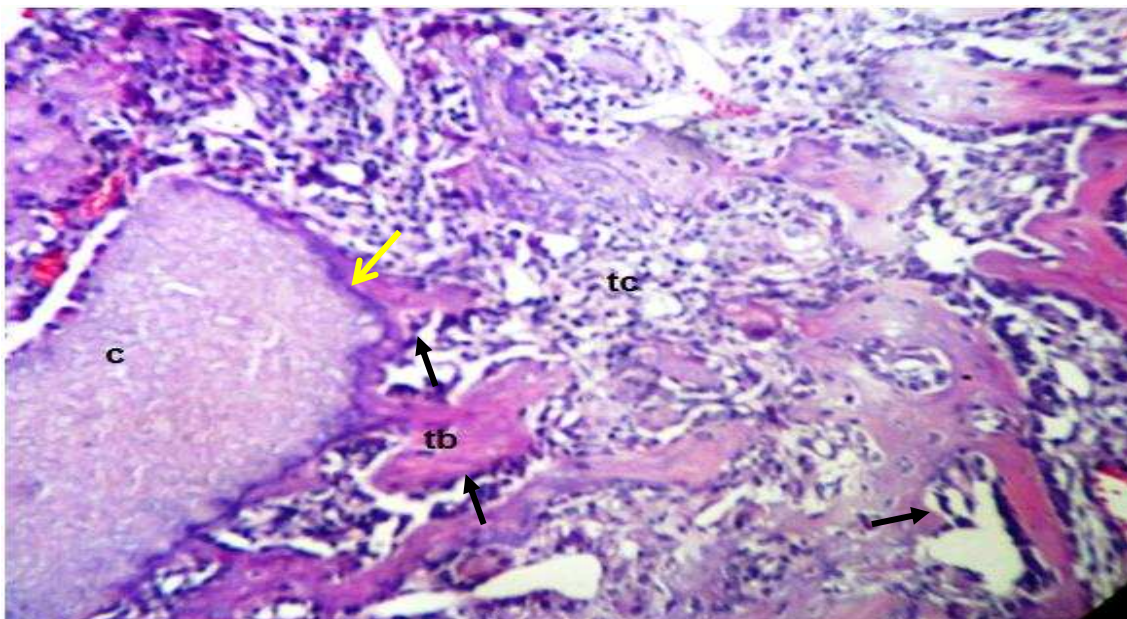


Figura 21: Micrografia representando a região do defeito realizado no olecrano trinta dias após a cirurgia, submetida à implantação do compósito HAP+FS+3%AH. Compósito (c); trabéculas ósseas recém formadas (tb); tecido conjuntivo denso e vascularizado (tc); Seta preta indica a presença de osteoblastos na borda das trabéculas recém formadas, indicando atividade de remodelação óssea e seta amarela indica região de interface compósito e tecido ósseo, sugestivo de osseointegração.

Com relação à reabsorção do compósito, não houve diferença estatística na quantidade de biomaterial presente nas amostras, nem ao que se refere ao tratamento ($p = 0,893$), ao tempo de coleta ($p = 0,624$) ou à interação desses fatores ($p=0,885$). Isso significa que até os 30 dias de análise, o biomaterial não sofreu remoção significativa do sítio em que foi implantado. A hidroxiapatita é um compósito de elevada cristalinidade, e isso interfere no seu tempo de biodegradação, tornando-o lento (Carlo Reis *et al.*, 2012). Dessa forma, trinta dias não foi suficiente para observar uma significativa absorção do biomaterial nas amostras analisadas. Tal característica é interessante, pois o compósito permanece no local do defeito sem ser reabsorvido antes da formação de novo tecido.

A análise realizada quanto à quantidade de osso presente nas amostras não apresentou efeito isolado dos fatores principais, tratamento e momento de coleta, sobre a quantidade de osso avaliada à histomorfometria ($p = 0,270$ e $p = 0,557$, respectivamente). Entretanto, houve interação dos fatores ($p = 0,011$), o que resultou em uma diminuição da quantidade de osso entre os 7 e os 30 dias no grupo que recebeu hidroxiapatita e fibroína de seda (HAP+FS) e, ao contrário, aumento naquele que recebeu adicionalmente 3% de ácido hialurônico (HAP+FS+3%AH). Ao contrário de alguns autores apresentarem em suas pesquisas resultados positivos com relação ao processo de regeneração óssea na presença de fibroína da seda (Altman *et al.*, 2003; Hakimiet *al.*, 2007; Kim *et al.*, 2014), essa pareceu interferir de forma indesejável nesse estudo, uma vez que a formação óssea do compósito que só possuía HAP+FS foi menor com relação as amostras do grupo controle. Entretanto, o que se observa é um aumento significativo na quantidade de osso produzida concomitantemente ao acréscimo de ácido hialurônico ao compósito, e ao final, o compósito HAP+FS+AH3% apresentam a maior porcentagem de osso formada referente ao último dia de avaliação, superior a todas as outras amostras (Figura 22).

O ácido hialurônico oferece um grande potencial como um biomaterial ideal para melhorar as propriedades biológicas de um compósito e, dessa forma, oferecer características vantajosas tais como biocompatibilidade, sinalização para liberação de fatores de crescimento, manutenção da homeostase da matriz extracelular, promovendo assim um aumento na taxa de regeneração tecidual (Park *et al.*, 2011; Collins e Birkinshaw, 2013; Cuiet *al.*, 2015). Nesse estudo, o polímero parece ter uma fundamental participação no processo de regeneração, revertendo um possível efeito negativo da fibroína da seda sobre o crescimento ósseo. O tecido conjuntivo foi quantificado junto ao tecido medular, pois em diversos momentos se tornavam indistinguíveis na avaliação das lâminas.

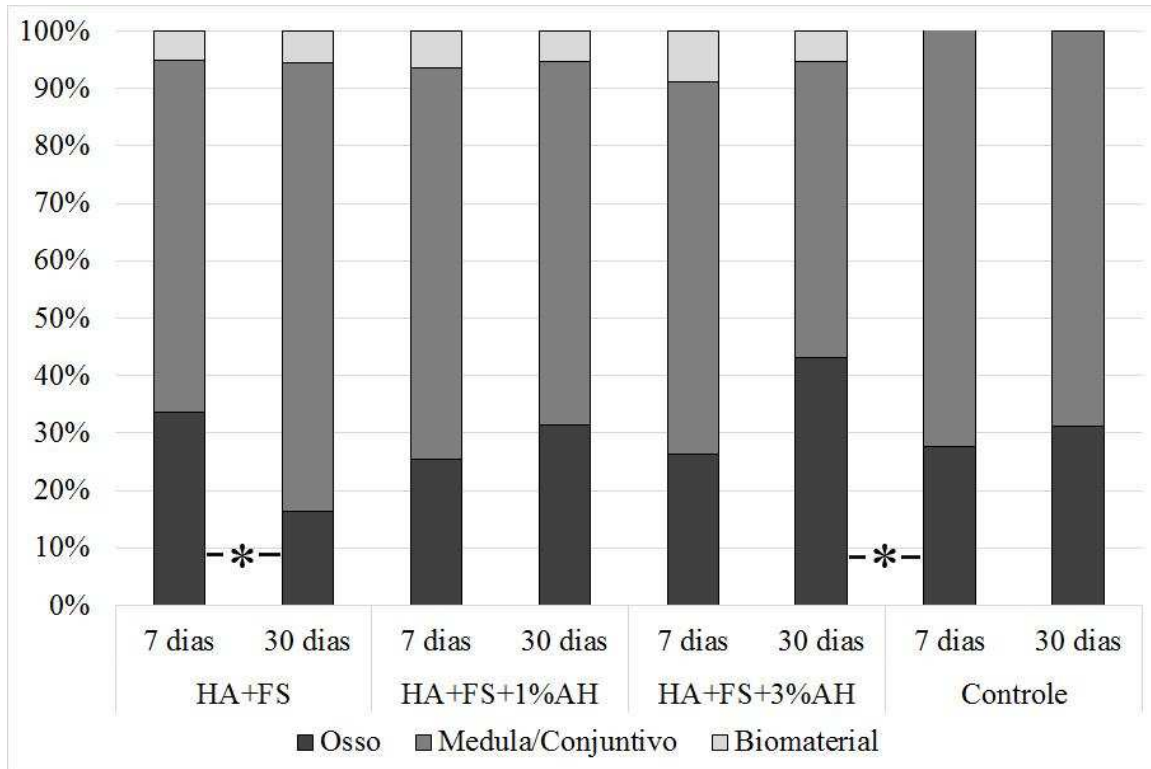


Figura 22: Distribuição relativa de tecido ósseo, medula óssea/tecido conjuntivo e biomaterial avaliados histomorfometricamente em defeito em olecrano de coelhas tratadas com combinações de hidroxiapatita, fibroína de seda e ácido hialurônico. HA: hidroxiapatita; FS: fibroína de seda; AH: ácido hialurônico. O asterisco indica os pares de dados significativamente diferentes no teste ANOVA para dois fatores, $\alpha = 5\%$. Observar a diminuição do crescimento ósseo no grupo tratado com HAP+FS, apresentando resultados inferiores inclusive ao grupo controle e em comparação aquele tratado com HAP+FS+3%AH, o qual apresentou crescimento ósseo superior a todos os grupos ao dia 30 de avaliação.

4. Conclusões

De acordo com as avaliações realizadas, os compósitos mostraram-se biocompatíveis, como revelaram as avaliações clínicas e radiográficas, e capazes de se integrar ao osso, conforme observado nas avaliações histopatológicas e por microscopia eletrônica de varredura.

Baseado nos resultados apresentados nesse capítulo pode-se concluir que o compósito HAP+FS+3%AH mostrou-se mais eficiente no reparo de defeitos ósseos no olecrano de coelhos, conforme observado na avaliação microtomográfica e histomorfométrica.

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABUKAWA, H.; PAPADAKI, M.; ABULIKEMU, M.; LEAF, J.; VACANTI, J.P.; KABAN, L.B.; TROULIS, M.J. The Engineering of Craniofacial Tissues in the Laboratory: A Review of Biomaterials for Scaffolds and Implant Coatings. **Dental Clinics of North America**, v. 50, p. 205-216, 2006.
- AJZEN, S.A.; MOSCATIELLO, R.A.; LIMA, A.M.C.; MOSCATIELLO, V.A.M.; MOSCATIELLO, R.M.; NISHIGUCHI, C.I.; ALVES, M.T.S; YAMASHITA, H.K. Análise por tomografia computadorizada do enxerto autógeno na cirurgia de "SinusLift". **Radiologia Brasileira**, v. 38, p. 25-31, 2005.
- ALTMAN, G.H.; DIAZ, F.; JAKUBA, C.; CALABRO, T.; HORAN, R.L.; CHEN.J.LU, H.; RICHMOND, J.; KAPLAN, D.L. Silk-based biomaterials. **Biomaterials**, v. 24, p. 401-416, 2003.
- AZEVEDO, A.C. Avaliação qualitativa de biomateriais utilizados para a enxertia em alveolus dentais, em mandíbulas de suínos , por meio da tomografia computadorizada Cone Beam. 90f. 2013. **Dissertação de Mestrado** Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- AZEVEDO, A.S; SÁ, M.J.C; COSTA NETO, P.I; FOOK, M.V.L; PORTELA, R.A.; AZEVEDO, S.S. Avaliação de diferentes proporções de fosfato de cálcio na regeneração do tecido ósseo de coelhos: estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 49, p. 12-18, 2012.
- BORGES, A.P.B.; REZENDE, C.M.F.; RIBEIRO, M.F.B.; MELO, E.G.; NETO, P.I.N. Hidroxiapatita sintética (HAP-91) como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia em cão: aspectos à microscopia eletrônica de transmissão. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, p. 616-620, 2000.
- BOSE, S.; ROY, M. e BANDYOPADHYAY, A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. **Trends in Biotechnology**, v. 30, p. 546-554, 2012.
- CALVO-GUIRADO, J.L.; FERNANDEZ, M.P.R.; MATE-SANCHEZ, J.E.; BRUNO, N.; VELASQUEZ, P.; AZA, P.N. Enhanced bone regeneration with a novel synthetic bone substitute in combination with a new natural crosslinked collagen membrane: radiographic and histomorphometric study. **Clinical Oral Implant Research**, v. 26, p. 454-464, 2014.

- CARDOSO, A.K.M.V.; BARBOSA, A.A.J.; MIGUEL, F.B.; MARCANTONIO, E.J.; FARINA, M.; SOARES, A.G.D.; ROSA, F.P. Histomorphometric Analysis of Tissue Responses to Bioactive Glass Implants in Critical Defects in Rat Calvaria. **Cells Tissues Organism**, v. 184, p. 128-137, 2006.
- CARLO, E.C.; BORGES, A.P.B.; DEL CARLO, R.J.; MARTINEZ, M.M.M.; OLIVEIRA, P.M.; MORATO, G.O.; ELEOTÉRIO, R.B.; REIS JÚNIOR, M.S. Comparison of in vivo properties of hydroxyapatite polyhydroxybutyrate composites assessed for bone substitution. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 20, p. 853-859. 2009.
- CARLO, E.C.; BORGES, A.P.B.; FONSECA, C.C.; MARTINEZ, M.M.M.; ELEOTÉRIO, R.B.; MORATO, G.O.; OLIVEIRA, P.M. Biocompatibility, Osteointegration, Osteoconduction, and Biodegradation of a Hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate Composite. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 817-826, 2010.
- CARLO REIS, E.C.; BORGES, A.P.B.; OLIVEIRA, P.M.; BICALHO, S.M.C.M.; REIS, A.M.; SILVA, C.L. Desenvolvimento e caracterização de membranas rígidas, osteocondutoras e reabsorvíveis de polihidroxibutirato e hidroxiapatita para regeneração periodontal. **Polímeros**, v. 22, p. 73-79, 2012.
- CHAZONO, M.; TANAKA, T.; KOMAKI, H.; FUJII K. Bone formation and bioresorption after implantation of injectable β -tricalcium phosphate granules–hyaluronate complex in rabbit bone defects. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 70A, p. 542-549, 2004.
- COLLINS, M.N. e BIRKINSHAW, C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering-A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1262-1279, 2013.
- CUI, N.; QIAN, J.; LIU, T.; ZHAO, N.; WANG, H. Hyaluronic acid hydrogel scaffolds with a triple degradation behavior for bone tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 126, p. 192-198, 2015.
- DORNAS, R.F. Cimento a base de Beta-fosfato tricálcico em defeitos ósseos no crânio de coelhos. 91f. 2013. **Dissertação de Mestrado**- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- DUARTE, T.S.; BORGES, A.P.B.; LAVOR, M.S.L.; FILGUEIRAS, R.; TSIOMIS, A.C. FÓFANO, G.; ODENTHAL, M.E.; PONTES, K.C.S. Osteointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães: aspectos clínicos e radiográficos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 114-118, 2007.

- MAIA FILHO, A.L.M.M. Avaliação in vivo da reparação óssea guiada por implantes cerâmicos recobertos com hidroxiapatita. 59f. 2013. **Tese de Doutorado**-Universidade do Vale do Paranaíba, São José dos Campos, SP.
- FONTES, E.B. Hidroxiapatita sintética associada ou não à fração total decélulas mononucleares na regeneração de osso alveolar de cães. 70f. 2009. **Dissertação de Mestrado**-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- FRANCO, K.L.; BORGES, A.P.B.; VILÓRIA, M.I.C.; FERNANDES, E.S.; FEHLBERG, A.F. Hidroxiapatita sintética pura, hidroxiapatita sintética associada ao colágeno e hidroxiapatita sintética associada ao lipossoma como substitutos ósseos em defeitos provocados na tibia de cães: aspectos da osteointegração à microscopia de luz transmitida. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 431-436, 2001.
- GIANNOUDIS, P.V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: An update. **International Journal of the Care of the Injured Impact Factor**, v. 36, p. 20-27, 2005.
- HAKIMI, O.; KNIGHT, D.P.; VOLLRATH, F.; VADGAMA, P. Spider and mulberry silkworm silks as compatible biomaterials. **Composites: Part B**, v. 38, p. 324-337, 2007.
- HOLZWARTHA, J.M. e MA, P.X. Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 32, p. 9622-9629, 2011.
- JHA, A. K.; XU, X.; DUNCAN, R. L.; JIA, X. Controlling the adhesion and differentiation of mesenchymal stem cells using hyaluronic acid-based, doubly crosslinked networks. **Biomaterials**, v. 32, p. 2466-2578, 2011.
- KIM, B.S.; PARK, K.E.; KIM, M.; H.; YOU, H.K.; LEE, J.; PARK, W.H. Effect of nanofiber content on bone regeneration of silk fibroin/poly(ϵ -caprolactone) nano/microfibrous composite scaffolds. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 485-502, 2015.
- KIM, J.; YANG, B.; AHN, J.; PARK, O.S.; SHIM, H. Comparable efficacy of silk fibroin with the collagen membranes for guided bone regeneration in rat calvarial defects. **The Journal of Advanced Prosthodontics**, v. 6, p. 539-546, 2014.
- LEACH, J.B. e SCHMIDT, C.E. Characterization of protein release from photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol hydrogel tissue engineering scaffolds. **Biomaterials**, v. 26, p. 125-135, 2005.
- LEGEROS, R.Z. Properties of Osteoconductive Biomaterials: Calcium Phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 395, p. 81-98, 2002.

- LI, Z.; JI, S.; WANG, Y.; SHEN, X.; LIANG, H. Silk fibroin-based scaffolds for tissue engineering. **Frontiers of Materials Science**, v. 7, p. 237-247, 2013.
- LISIGNOLI, G.; CRISTINO, S.; PIACENTINI, A.; TONEGUZZI, S.; GRASSI, F.; CARVALHO, C.; ZINI, N.; SOLIMANDO, L.; MARALDI, N. M.; FACCHINI, A. Cellular and molecular events during chondrogenesis of human mesenchymal stromal cells grown in a three-dimensional hyaluronan based scaffold. **Biomaterials**, v. 26, p. 5677-5686, 2005.
- LOPÉZ, J.C.R.R. Avaliação histomorfométrica do percentual de osseointegração ao redor de implantes recobertos por hidroxiapatita por meio de dois métodos de secção histológica. 2007. 88f. **Dissertação de** Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Duque de Caxias.
- MEINEL, L.; FAJARDO, R.; HOFMANNA, S.; LANGER, R.; CHENE, J.; SNYDER, B.; NOVAKOVIC, G.V.; KAPLAN, D. Silk implants for the healing of critical size bone defects. **Bone**, v. 37, p. 688-698, 2005.
- OCHOA, C.C.R. Hidroxiapatita, policaprolactona e alendronato em defeitos ósseos experimentais no olecrano de coelhos. 2013. 43f. **Dissertação de Mestrado**- Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- OLIVEIRA, L.S.A.F.; OLIVEIRA, C.S.; MACHADO, A.P.L.; ROSA, F.P. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 365, p. 20-27, 2005.
- ONO, I.; TATESHITA, T.; NAKAJIMA, T. Evaluation of a high density polyethylenefixingsystem for hydroxyapatite ceramic implants. **Biomaterials**, v. 21, p. 143-151, 2000.
- OONISHI, H.; KUSHITANI, S.; YASUKAWA, E. et al. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 334, p. 316-325, 1997.
- PARK, J.K.; SHIM, J.; KANG, K.S.; YEOM, J.; JUNG, H.S.; KIM, J.Y.; LEE, K.H.; KIM, T.; KIM, S.; CHO, D.; HAHN, S.W. Solid Free-Form Fabrication of Tissue-Engineering Scaffolds with a Poly(lactic-co-glycolic acid) Grafted Hyaluronic Acid Conjugate Encapsulating an Intact Bone Morphogenetic Protein-2/Poly(ethylene glycol) Complex. **Advanced Functional Materials**, v. 21, p. 2906-2912, 2011.
- PINHEIRO, T.C.; SANTOS, F.F.C.; SHIRANE, H.Y.; CUNHA, M.R. Hydroxyapatite implants in bone defects produced in rat femurs submitted to passive tobacco exposure. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 43, p. 433-441, 2008.

- PRICE, R.D.; BERRY, M.G. NAVSARIA, H.A. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 60, p. 1110-1119, 2007.
- RUEHE, B.; NIEHUES, S. HEBERER, S.; NELSON, K. Miniature pigs as an animal model for implant research: bone regeneration in critical-size defects. **Oral and Maxillofacial Implants**, v. 108, p. 699-706, 2009.
- SÁ, M.J.C.; REZENDE, C.M.F.; JUNIOR, V.A.S.; GARCIA, H.C.; GRIFFON, D.J.; SILVA, V. V. In Vivo Behavior of Zirconia–Hydroxyapatite (ZH) Ceramic Implants in Dogs: A Clinical, Radiographic, and Histological Study. **Journal of biomaterials applications**, v. 22, p. 5-31, 2007.
- SACHLOS e CZERNUSZKA, J.T. Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. **European Cells and Materials**, v. 5, p. 29-40, 2003
- SCARFE, W.C.; FARMAN, A.G; SUKOVIC, P. Clinical Applications of Cone-Beam Computed Tomography in Dental Practice. **Journal of the Canadian Dental Association**, v. 72, p. 75-80, 2006.
- SCHMITZ, J.P.; HOLLINGER, J.O.; MILAM, S.B. Reconstruction of bone using calciumphosphate bone cements: a critical review. **Journal Oral Maxillofacial Surgery**, v. 57, p. 1122-1126, 1999.
- SCHMITZ, J.P.; SCHWARTZ, Z.; HOLLINGER, J.O.; BOYAN, B.D. Characterization of calvarial nonunion defects. **Acta Anatomica (Basel)**, v. 138, p. 185-192, 2009.
- SILVA, E.C.; BORGES, A.P.B.; NEVES, C.D.; CARLO, E.C.; BARROS, R.E.; HAGE, M.C.F.N.S.; DE SOUZA, R.L.; BARUD, H.S.; BICALHO, S.M.C.M. Utilização experimental de hidroxiapatita sintética em alvéolos dentários de gatos domésticos (*Felis canis*): estudo clínico radiográfico e histomorfométrico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, p. 873-880, 2012.
- TIOMIS, A.C.; BORGES, A.P.P.; DAIBERT, A.P.F.; DUARTE, T.S.; PONTES, K.C.S.; CARVALHO, T.B.; CARLO REIS, E.C. Avaliação histológica do biovidro particulado na reparação de defeito experimental em mandíbula de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 80-85, 2010.
- VASCONCELOS, A.C. Processo inflamatório relacionado a presença de biomateriais. In: ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; NANSUR, H.S. **Biomateriais Fundamentos & Aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura médica 2006, cap. 10, p. 269-281.
- VITAL, C.C; BORGES, A.P.B.; FONSECA, C.C.; TSIOMIS, A.C.; CARVALHO, T.B.; FONTES, E.B.; SENA, M.P.; FÓFANO, G. Biocompatibilidade e comportamento de

compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** v. 58, p.175-183, 2006.

WALSH, W.R.; CHAPMAN-SHEATH , P.J.; CAIN, S.; DEBES , J.;BRUCE, W.J.M.; SVEHLA, M.J.; GILLIES, R.M. A resorbable porous ceramic composite bone graft substitute in a rabbit metaphyseal defect model. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 21, p. 655-661- 2003.

WEI, K.; KIM, B. e KIM, I. Fabrication and Biocompatibility of Electrospun Silk Biocomposites. **Membranes**, v. 1, p. 275-298, 2011.