

RAUL FELIPE DORNAS

**CIMENTO A BASE DE β -FOSFATO TRICÁLCICO EM
DEFEITOS ÓSSEOS PRODUZIDOS NO CRÂNIO 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
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

D713c
2013

Dornas, Raul Felipe, 1983-
Cimento a base de β -fosfato tricálcico em defeitos ósseos
produzidos no crânio de coelhos / Raul Felipe Dornas. –
Viçosa, MG, 2013.
xiv, 79f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

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

1. Coelho - Cirurgia. 2. Crânio - Cirurgia. 3. Fosfato
tricálcico. 4. Biocompatibilidade. 5. Craniotomia.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.9322

RAUL FELIPE DORNAS

CIMENTO A BASE DE β -FOSFATO TRICÁLCICO EM DEFEITOS ÓSSEOS
PRODUZIDOS NO CRÂNIO 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: 28 de fevereiro de 2013.

Fabício Luciani Valente

Sheila Maria de Castro M. Bicalho

Ricardo Junqueira Del Carlo
(Coorientador)

Emily Correna Carlo Reis

Andréa Pacheco Batista Borges
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, pela saúde, por minha família e por guiar meus passos permitindo que eu atingisse mais este objetivo.

Aos meus pais Raul e Ângela, pelo amor incondicional, pela confiança, pelos intermináveis exemplos de dedicação, caráter e companheirismo. Se não fosse por vocês, não teria chegado até aqui.

Ao meu irmão Bruno, pela amizade, pelos conselhos que sempre me levaram a tomar as melhores decisões e por sempre estar ao meu lado.

Aos meus amigos da veterinária e zootecnia, em especial Tácio, Tássia, Boca, Diniz, Godin, Thiago e Jão, pelos melhores momentos da minha vida, por compartilhar as alegrias e fazer das tristezas uma grande aprendizagem.

À minha namorada, Giséli, por estar ao meu lado nessa caminhada, pelo carinho e pelo amor, por todos os momentos felizes que passaram e que estão por vir.

À minha fenomenal anestesista, Vanessa Guedes, por toda a ajuda, pelo carinho, amizade e por ter feito esse momento muito mais divertido.

À minha grande amiga e companheira cirurgiã Lívia, por todo apoio nas horas difíceis, pela grande amiga que foi e sempre será.

À Gilmara e Alice. Meninas, vocês são parte disso, merecem os meus aplausos e minha admiração pela dedicação.

Ao Fabrício e Emily, pela participação ímpar no desenvolvimento e execução deste trabalho. Por me aturarem tanto tempo, por serem sempre compreensivos e terem uma palavra de conforto nos momentos de incerteza.

À todos os funcionários do departamento de veterinária, pela amizade e companheirismo nas tarefas, em especial Maninha, Tatinha, Claudio, Carmem, Toninho, Geraldinho, funcionários da esterilização e da patologia.

Ao Departamento de Solos, através do Laboratório de Mineralogia da UFV em especial ao Chico e ao professor Maurício Paulo Ferreira Fontes pelo auxílio na realização da difração de raios x.

À Fundação Cristiano Varella, através do Hospital do Câncer de Muriaé em especial aos seus diretores, ao Toninho e ao Dr. Nilton de Abreu, por me permitir a realização das tomografias, que certamente engrandeceram o projeto.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV pelo auxílio com a microscopia eletrônica.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo, à FAPEMIG pelo financiamento do projeto, ao CNPq/PIBIC pela bolsa de iniciação científica, ao Professor José Silvio Veras Albuquerque, pelo fornecimento do material, ao JHS Laboratório Químico Ltda, em especial à Professora Doutora Sheyla Maria Castro Máximo pelas orientações.

À todos os professores da graduação pela atenção, paciência, boa vontade e principalmente pelos conhecimentos transmitidos.

Ao professor Ricardo, pelos exemplos profissionais e pessoais de responsabilidade e caráter. Por ter contribuído de forma decisiva nas minhas escolhas profissionais, especificamente pela cirurgia.

Por fim, e especialmente, agradeço à minha orientadora, professora Andrea por cada segundo de ensinamento, desde a graduação até este momento, me proporcionando uma formação profissional, ética e humana e pela seriedade e responsabilidade que conduziu minha orientação. A você professora as honras desse momento importantíssimo em minha vida. Saiba que tens minha admiração e respeito. Muito obrigado.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas.....	ix
Resumo	xi
Abstract.....	xiii
CAPÍTULO I – Defeitos ósseos cranianos e a utilização de Substitutos Ósseos ...	1
Resumo	1
Abstract.....	2
Introdução.....	3
Reconstrução craniana.....	3
Enxertos e substitutos ósseos	5
Desenvolvimento e reparação óssea craniana	9
Considerações finais.....	10
Referências.....	11
CAPÍTULO II – Caracterização <i>in vitro</i> do cimento ósseo a base de β -fosfato tricálcico	17
Resumo	17
Abstract.....	18
Introdução.....	19
Material e métodos	21
Resultados e discussão	22
Considerações finais.....	26
Referências.....	27

CAPÍTULO III – Cimento a base de β -fosfato tricálcico em defeitos ósseos no crânio de coelhos. Avaliações hematológicas, clinico-cirúrgicas, anatomopatológicas e tomográficas.....31

Resumo	31
Abstract.....	32
Introdução.....	33
Material e métodos	36
Resultados e discussão	42
Conclusões.....	52
Perspectivas	52
Referências.....	52

CAPÍTULO IV – Cimento a base de β -fosfato tricálcico em defeitos ósseos no crânio de coelhos. Avaliações por difração de raios-X e histológicas.57

Resumo	57
Abstract.....	58
Introdução.....	59
Material e métodos	60
Resultados e discussão	65
Conclusões.....	76
Referências.....	77

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II – Caracterização *in vitro* do cimento ósseo a base de β -fosfato tricálcico

	Página
Figura 1 – Difratoograma do cimento ósseo a base de β -fosfato tricálcico.	23
Figura 2 - Micrografia do cimento a base de β -TCP obtida a partir da microscopia eletrônica de varredura.	24
Figura 3 - Micrografia da superfície intacta do cimento a base de β -TCP obtida através da microscopia eletrônica de varredura.	25
Figura 4 - Micrografia da superfície de fratura do cimento a base de β -TCP obtida a partir da microscopia eletrônica de varredura.	26

CAPÍTULO III – Cimento a base de β -fosfato tricálcico em defeitos ósseos no crânio de coelhos. Avaliações hematológicas, clinico-cirúrgicas e anatomopatológicas e tomográficas

	Página
Figura 1 – Procedimento cirúrgico para realização do defeito no crânio de coelho.	39
Figura 2 - Confecção de defeito crítico em crânio de coelho.	40
Figura 3 - Fotografia representando a resolução macroscópica da lesão de pele em animal do grupo tratado aos 28 dias.	46

Figura 4 - Fotografia representando a evolução macroscópica da lesão de pele em animal tratado, aos 28 dias.	47
Figura 5 - Fotografia do cérebro dos animais dos grupos tratado e controle ao longo dos momentos experimentais.	48
Figura 6 – Reconstrução, em três dimensões, das imagens tomográficas das amostras de tecido ósseo retirado do crânio dos coelhos.	50

CAPÍTULO IV – Cimento a base de β -fosfato tricálcico em defeitos ósseos no crânio de coelhos. Avaliações por difração de raios X e histológicas.

	Página
Figura 1 - Procedimento cirúrgico para realização do defeito experimental no crânio de coelho.	62
Figura 2 - Defeito crítico em crânio de coelho preenchido com cimento ósseo a base de β -TCP.	63
Figura 3 - Desenho esquemático do crânio de coelho representando o fragmento ósseo retangular retirado, contendo o defeito ósseo em seu interior.	64
Figura 4 - Difratoograma do cimento ósseo a base de β -TCP, antes de sua implantação.	66
Figura 5 - Difratoograma do tecido ósseo integro, demonstrando a presença de uma estrutura denominada ombreira, característica de materiais orgânicos de baixa cristalinidade.	66
Figura 6 – Difratoograma do cimento ósseo antes de sua implantação, do cimento ósseo implantado, ao longo dos momentos experimentais e do tecido ósseo craniano.	67

Figura 7 - Fotomicrografia do interior do defeito ósseo no crânio de um coelho do grupo controle aos 90 dias, demonstrando a orientação do tecido conjuntivo no interior do defeito ósseo.	69
Figura 8. Fotomicrografia representando a borda do defeito ósseo no crânio de coelho do grupo controle aos sete dias de pós operatório.	69
Figura 9 - Fotomicrografia panorâmica representando a extensão total do defeito ósseo no crânio de coelho do grupo controle aos 90 dias de pós operatório..	70
Figura 10 - Fotomicrografia panorâmica representando a extensão total do defeito ósseo no craniano de coelho do grupo controle aos 90 dias de pós operatório.	71
Figura 11 - Fotomicrografia representando a borda do defeito ósseo no crânio de coelho do grupo tratado aos sete dias de pós operatório, onde são observados o cimento ósseo, tecido ósseo novo, osteoblastos e a matriz provisória.	72
Figura 12 - Fotomicrografia do defeito ósseo craniano do grupo tratado aos 28 dias de pós operatório indicando o íntimo contato entre o tecido ósseo e o biomaterial.	73
Figura 13 - Fotomicrografia do defeito ósseo craniano do grupo tratado aos 28 dias de pós operatório demonstrando a presença de vasos no interior do biomaterial.	73
Figura 14 - Fotomicrografia representando o crescimento ósseo a partir das bordas do defeito craniano de coelhos do grupo tratado aos 90 dias de pós operatório.	74

Figura 15 - Fotomicrografia panorâmica do defeito ósseo craniano em coelho do grupo controle aos 90 dias de pós operatório e do grupo tratado na mesma data. 75

Figura 16 - Fotomicrografia do defeito ósseo no crânio de coelhos do grupo tratado aos 90 dias de pós operatório. 76

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III – Cimento a base de β -fosfato tricálcico em defeitos ósseos no crânio de coelhos. Avaliações hematológicas, clinico-cirúrgicas e anatomopatológicas e tomográficas.

	Página
Tabela 1 – Época do sacrifício dos coelhos submetidos ao procedimento cirúrgico dos grupos controle e tratado.	37
Tabela 2 - Períodos de coleta de sangue para análises hematológicas e de bioquímica sérica dos coelhos submetidos ao procedimento cirúrgico dos grupos controle e tratado.	37
Tabela 3 - Valores das medianas para as variáveis da linhagem vermelha e proteína total dos coelhos submetidos ao procedimento cirúrgico dos grupos controle e tratado.	44
Tabela 4 - Valores das medianas para as variáveis da linhagem branca dos coelhos submetidos ao procedimento cirúrgico dos grupos controle e tratado.	44
Tabela 5 - Valores das medianas da bioquímica sérica dos coelhos submetidos ao procedimento cirúrgico dos grupos controle e tratado.	45
Tabela 6 – Médias e desvios padrão das densidades em UH dos grupos controle e tratado nos momentos experimentais MI, MII e MIII.	50

CAPÍTULO IV – Cimento a base de β -fosfato tricálcico em defeitos ósseos no crânio de coelhos. Avaliações por difração de raios X e histológicas.

	Página
Tabela 1 - Época do sacrifício dos coelhos submetidos ao procedimento cirúrgico dos grupos controle e tratado.	61

RESUMO

DORNAS, Raul Felipe, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2013. **Cimento a base de β -fosfato tricálcico em defeitos ósseos produzidos no crânio de coelhos.** Orientadora: Andréa Pacheco Batista Borges. Co-orientador: Ricardo Junqueira Del Carlo.

A perda de tecido ósseo é um problema grave tanto na medicina humana quanto na veterinária. No caso das falhas ósseas cranianas, a intervenção cirúrgica se faz necessária porque, se não forem corrigidas, provocam altos índices de lesões cerebrais e disfunções neurológicas, bem como graves sequelas estéticas. Nesse contexto, enxertos autógenos e alógenos têm sido substituídos por biomateriais osteocondutores e reabsorvíveis. O objetivo desse trabalho foi avaliar a utilização de um cimento ósseo formulado a partir de uma fase sólida (β -fosfato tricálcico e sulfato de cálcio di-hidratado) e uma fase líquida (ácido fosfórico 2M). Esses componentes foram misturados na proporção 1:1 e o material, ainda moldável, foi aplicado em defeitos ósseos de tamanho crítico no crânio de coelhos, com 15 mm de diâmetro. A análise do cimento pela microscopia eletrônica de varredura revelou superfície complexa com poros de 19,5 ($\pm 5,92$) μm não interconectados. Os animais foram divididos em três momentos experimentais com base no tempo transcorrido após o procedimento cirúrgico (sete, 28 e 90 dias), onde os defeitos tratados foram comparados aos defeitos que não receberam o biomaterial. As análises hematológicas e da bioquímica sérica evidenciaram valores normais durante todo o experimento. Não foram observados deiscência, edema ou sinais de infecção. Nos animais tratados, foram observadas alterações na pele (hiperemia e necrose) e no cérebro (lesões circulares de coloração esverdeada com congestão vascular), que evoluíram para a cicatrização aos 90 dias. Essas alterações podem ser atribuídas ao baixo pH do biomaterial no momento de sua implantação (3,38), resultante da relação líquido/pó utilizada no presente trabalho (1:1). Foi sugerido pela tomografia computadorizada e confirmado pela análise histológica crescimento de osso novo, que no grupo controle ocorreu a partir das bordas e no interior do defeito. Já nos animais do grupo tratado esse crescimento foi menor aos 90 dias, quando comparado ao controle na mesma data, e limitou-se às bordas do defeito, não ocorrendo no interior. Foi demonstrada a osteointegração do biomaterial, não sendo observados sinais de inflamação crônica indesejável ou a formação de cápsula

fibrosa ao seu redor. Após análise dos dados obtidos o biomaterial foi caracterizado como osteocondutor, osteointegrável, possuindo degradação *in vivo* e histologicamente biocompatível. As alterações na coloração no tecido nervoso na região do implante, mesmo sem comprometimento clínico, e as lesões de pele, indicam a necessidade de modificação da proporção dos componentes. Possivelmente, a redução da relação líquido/pó viabilizará sua aplicação.

ABSTRACT

DORNAS, Raul Felipe, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2013. **B-tricalcium phosphate based cement in produced rabbits cranial bone defects**
Adviser: Andréa Pacheco Batista Borges. Co-adviser: Ricardo Junqueira Del Carlo.

The loss of bone tissue is an important problem both in human and in veterinary medicines. For cranial bone defects, surgical intervention is necessary since, if not correct, these defects result in high number of cerebral lesions and neurological dysfunctions as well as esthetic sequelae. In such context, autogenous and alogenous grafts have given place to resorbable osteoconductive biomaterials. The objective of the present study was to evaluate a bone cement made from a solid phase (β -tricalcium phosphate and calcium sulfate dihydrate) and a liquid one (phosphoric acid 2M). These components were mixed in a stainless steel cube at a proportion of 1:1 and the material while still moldable, was applied in 15mm critical size defects in the cranial bone of rabbits, Scanning electron microscopy of the cement itself showed a complex surface with non-interconnected pores of 19.5 ± 5.92 μm in diameter. Animals were separated in three experimental moments based on the time after surgical procedure (7, 28 and 90 days), comparing to defects that did not receive the material. Hematological and serum biochemistry revealed normal values during the entire experiment. Dehiscence, edema or signs of infection were not observed. In treated animals, alterations were observed on skin (hyperemia and necrosis) and brain (circular lesions of green color with vascular congestion) that evolved to healing at 90 days. These alterations may be related related to a low pH of the biomaterial during the implantation (3.38), resulted from the proportion of liquid:powder used in the present study (1:1). As suggested by computerized tomography and confirmed by histology, new bone formation occurred in control group from the margin of the defect and inside it. In treated group, bone growth was apparently less intense at 90 days when compared to the control one, limited to the margin of the defect and not observed inside it. Osteointegration was confirmed and neither signs of undesirable chronic inflammation nor the formation of a fibrous capsule around the material was observed. Thereby, the biomaterial was characterized as osteoconductor, osteointegrated, degradable in vivo and histologically biocompatible. The alterations in the color of nervous tissue and skin adjacent to the implant, although with no clinical relevance, indicate the need for a

modification on the proportion of the biomaterial components. Possibly, reducing the relation liquid:powder may allow its application.

CAPÍTULO I

DEFEITOS ÓSSEOS CRANIANOS E A UTILIZAÇÃO DE SUBSTITUTOS ÓSSEOS

RESUMO

O objetivo do trabalho foi apresentar uma revisão bibliográfica dos aspectos relevantes das reconstruções cranianas bem como da utilização de biomateriais empregados nesses procedimentos. A perda de tecido ósseo é um problema grave tanto na medicina humana quanto na veterinária. Os defeitos ósseos resultantes de tal perda necessitam de preenchimento com substitutos para que ocorra a reparação, uma vez que o tecido ósseo necessita da manutenção de sua continuidade e de suporte para sua formação. A intervenção cirúrgica é necessária para evitar lesões cerebrais e disfunções neurológicas, bem como sequelas estéticas. Devido a fatores como baixa disponibilidade, morbidade associada ao local doador e a possibilidade de transmissão de doenças, enxertos autógenos e alógenos já há algum tempo têm dado lugar aos biomateriais osteocondutores e reabsorvíveis. Estes servem como um suporte para a formação óssea e são reabsorvidos gradativamente pelo organismo, sem reação adversa. As cerâmicas de fosfato de cálcio apresentam-se como os principais biomateriais estudados e empregados para a reposição e reparação do tecido ósseo, pois apresentam como características a semelhança com a fase mineral de ossos e dentes, excelente biocompatibilidade, bioatividade, ausência de toxicidade, taxas de degradação variáveis e osteocondutividade. Os cimentos de fosfatos de cálcio possuem composição de fases cristalinas e resposta biológica similar às biocerâmicas de fosfato de cálcio, podem ser facilmente moldados e adaptados ao local de implantação. São normalmente frágeis, porém, são utilizados como preenchedores não estruturais em cirurgias maxilofaciais, neurológicas e ortopédicas.

Palavras-chave: cranioplastia, substitutos ósseos, regeneração óssea.

CRANIAL DEFECTS AND THE USE OF BONE SUBSTITUTES

ABSTRACT

The objective of the work was to present a literature review on relevant aspects of cranial reconstructions as well as the use of biomaterials in these procedures. The loss of bone tissue is a serious problem both in human and in veterinary medicines. Bone defects resulted from such loss need to be filled with substitutes for regeneration to occur once bone tissue needs maintenance of continuity and support for its formation. Surgical intervention is necessary to prevent cerebral lesions and neurological dysfunctions as well as severe esthetics sequel. Due to factors such as low availability, morbidity associated to local donor site and possible transmission of diseases, autogenous and allogeneous grafts have been replaced by osteoconductive resorbable biomaterials. These serve as support for bone formation and are gradually replaced by the body without any adverse reaction. Ceramics like calcium phosphate represent today the most studied and used biomaterials for the replacement and regeneration of bone tissue as they have as main characteristics the similarity with the mineral phase of bone and teeth, excellent biocompatibility, bioactivity, absence of toxicity, variable degradation rates and osteoconductivity. Calcium phosphate cements are composed of crystalline phases and present biological response similar to calcium phosphate bioceramics but with the difference of being easily moldable and adapted to the site of implantation. They are commonly very fragile and so, used as non-structural fillers in maxillofacial, neurological and orthopedic surgeries

Key words: cranioplasty, bone substitutes, bone regeneration

INTRODUÇÃO

As doenças e lesões ósseas são condições que afetam diretamente a qualidade de vida, sendo diversos os processos que podem resultar na perda de tecido ou na dificuldade de sua reparação (KOKUBO *et al.*, 2003). Traumas severos, infecções, neoplasias, cirurgias ou deformidades congênitas frequentemente resultam em defeitos ósseos no crânio que necessitam de preenchimento para que ocorra sua reparação, representando um grande desafio para a cirurgia plástica reconstrutora. Entre os anos de 2002 e 2006 nos Estados Unidos, 1,7 milhões de pessoas sofreram lesões crânio-cerebrais traumáticas. Dentre os processos que originam os defeitos ósseos cranianos os acidentes automobilísticos são os maiores responsáveis pelas mortes (FAUL *et al.*, 2010), e por 51% das craniectomias descompressivas realizadas (HONEYBUL, 2010). A busca por métodos que promovam a reparação de defeitos cranianos é constante e tem apresentado grande desenvolvimento nas últimas décadas, que pode ser creditado à descoberta de novos biomateriais, ao aprimoramento de equipamentos e de sistemas de processamento de dados médicos, a otimização das etapas de planejamento com auxílio do computador, além de inúmeras inovações nas técnicas de fabricação, permitindo a produção de implantes biocompatíveis com alta precisão (GIL & FERREIRA, 2006; LAJARIN, 2008). O objetivo deste trabalho foi apresentar, em uma revisão bibliográfica, os aspectos relevantes das reconstruções cranianas bem como a utilização dos biomateriais empregados na correção dos defeitos ósseos.

RECONSTRUÇÃO CRANIANA

A reconstrução craniana evoluiu permitindo alcançar cobertura funcional ideal e o aspecto estético. O sucesso dessa técnica requer a proteção das estruturas intracranianas e, secundariamente, a correção estética, uma vez que pacientes com alterações craniofaciais graves, frequentemente, apresentam baixo nível de integração social (MEURER *et al.*, 2008). A definição da geometria do implante é um desafio, uma vez que cada paciente possui anatomia topográfica tridimensional complexa e, em caso de defeitos ósseos devido a traumas ou tumores, cada um possui uma forma. Além disso, frequentemente envolvem procedimentos secundários e múltiplas cirurgias, algumas de alto custo. Ainda assim, em alguns

casos, os resultados obtidos não são satisfatórios (CHO e GOSAIN, 2004; AHN *et al.*, 2009; BERTOL *et al.*, 2010).

A intervenção cirúrgica se faz necessária porque os defeitos ósseos no crânio, enquanto se mantêm abertos, permitem lesões cerebrais e disfunções neurológicas. Tais eventos podem estar relacionados a um gradiente negativo entre a pressão atmosférica e a intracraniana (HAN *et al.*, 2008), e por prejuízos na drenagem sanguínea cerebral (OYELESE *et al.*, 2005). Richaud *et al.* (1985) propuseram a restauração do mecanismo hemodinâmico cerebral como responsável pela recuperação neurológica desses pacientes. Relataram que a drenagem sanguínea cerebral, avaliada por tomografia computadorizada, aumentou de 15-30% na área do córtex adjacente à cranioplastia. Para Kuo *et al.* (2004), a melhora no estado neurológico pode ser devida a melhora na drenagem sanguínea ocasionada pela eliminação dos efeitos da pressão atmosférica sobre o cérebro.

Entretanto ainda não há um consenso em reação ao melhor momento para realização do procedimento. Yoshida *et al.* (1996) relataram que a cranioplastia deve ser realizada tão logo o edema cerebral seja controlado, uma vez que a exposição do tecido nervoso pode diminuir a drenagem sanguínea bem como o metabolismo energético cerebral. Chun e Yi (2011) avaliaram, retrospectivamente, a eficácia das cranioplastias precoces em relação às tardias, em 30 pacientes, por meio da avaliação do tempo de cirurgia, tempo gasto na dissecação das estruturas e na perda sanguínea. Segundo eles, a realização do procedimento antes da formação de tecido cicatricial maduro reduz o tempo operatório ao facilitar a dissecação das estruturas, prevenindo lesões das meninges e reduzindo a perda sanguínea. Concluíram, portanto, que a cranioplastia pode ser realizada com eficácia e segurança dentro de 30 dias a partir da craniotomia.

Ainda, Archavlis e Nievas (2012) avaliaram a influência do tempo entre a hemicraniectomia descompressiva e a cranioplastia nos resultados e complicações clínicas. Nesse estudo, 200 pacientes foram divididos em 3 grupos de acordo com o momento da cranioplastia em: <7 semanas, 7-12 semanas, > 13 semanas. Após analisarem retrospectivamente o tempo médio da realização das cranioplastias, as condições de admissão dos pacientes, os motivos das craniectomias e o nível de consciência de cada indivíduo através da escala de Glasgow concluíram que a

cranioplastia precoce pode melhorar a evolução neurológica desde que realizada a partir da redução do edema cerebral instalado.

ENXERTOS E SUBSTITUTOS ÓSSEOS

O osso autólogo é considerado até o momento o melhor material a ser utilizado na busca da consolidação óssea (PRECHEUR, 2007; SAHOO *et al.*, 2010; DINOPOULOS *et al.*, 2012), devido as suas propriedades osteogênicas - capacidade de formação de tecido ósseo novo a partir de células osteoprogenitoras presentes no material enxertado (BIELBY *et al.*, 2007); osteoindutoras – capacidade do material induzir as células osteoprogenitoras a se diferenciarem em osteoblastos (EINHORN, 1995) e osteocondutoras – capacidade do material, através de sua micro e macro arquitetura, permitir a infiltração de elementos envolvidos no processo de crescimento de osso novo (DINOPOULOS *et al.*, 2012), além do fato de não causar reação imunológica ou transmitir doenças infecciosas.

O tratamento de perdas ósseas de espessura total da calvária inclui diversos métodos de reconstrução, sendo o enxerto ósseo doado da calota craniana o preferido quando comparado às demais áreas doadoras, como crista ilíaca e costelas, pela proximidade com a área a ser corrigida e pelo contorno satisfatório (SAHOO *et al.*, 2010; MACEDO *et al.*, 2010). Hara *et al.*, (2011) recomendam que, nos defeitos de espessura total da calota craniana em que a área de perda é pequena, o método reconstrutivo de eleição seja a utilização do enxerto ósseo de tábua externa do parietal.

Entretanto, enxertos ósseos possuem desvantagens importantes como disponibilidade e quantidades limitadas, resistência mecânica inadequada, difícil fixação ao local e ainda alta morbidade associada ao local doador, que pode incluir a deformidade deste local além de dor e infecção (HENCH, 2000; MYGIND *et al.*, 2007). Assim sendo, substitutos ósseos com propriedades adequadas e sem as desvantagens dos enxertos biológicos são fonte constante de pesquisas, buscando o reparo de tecidos lesionados (TABATA, 2009). Um de seus maiores desafios é o desenvolvimento de biomateriais para a recuperação do tecido ósseo já que, atualmente, o aumento da expectativa de vida expõe a população a situações e

doenças que predispõem ao maior risco de fraturas e perdas ósseas (NAVARRO *et al.*, 2008).

Williams (2009) definiu os biomateriais como substâncias criadas para, isoladamente ou como parte de um sistema complexo, guiarem, através do controle das interações com os componentes dos sistemas vivos, o curso de processos terapêuticos ou diagnósticos em humanos ou em animais. As cerâmicas de fosfato de cálcio apresentam-se hoje como os principais biomateriais estudados e empregados para a reposição e reparação do tecido ósseo, pois apresentam como principais características: semelhança com a fase mineral de ossos e excelente biocompatibilidade, bioatividade, ausência de toxicidade, taxas de degradação variáveis e osteocondutividade (GUASTALDI e APARECIDA, 2010). Tais características positivas podem ser explicadas pela natureza química destes materiais que por serem formados basicamente por íons cálcio e fosfato, participam ativamente do equilíbrio iônico entre o fluido biológico e a cerâmica (KAWACHI *et al.*, 2000). Além disso, tais materiais frequentemente apresentam uma superfície complexa, que favorece a ativação plaquetária, iniciando os fenômenos celulares que culminam na formação de tecido ósseo novo (PARK, *et al.* 2001; KIKUCHI *et al.* 2005)

As cerâmicas mais utilizadas são a hidroxiapatita (HA) e o fosfato tricálcico (TCP) (BURG *et al.*, 2000), por serem osteocondutoras e capazes de promover uma interação direta com o tecido ósseo, sem interposição de tecido fibroso, propriedades de extrema importância para formação óssea (LE GUEHENNEC *et al.*, 2004; CORSETTI *et al.*, 2008). A hidroxiapatita, principal componente presente na fase mineral dos ossos, é a mais estudada e mais utilizada com finalidades clínicas (SINGH, *et al.*, 2010; NOTODIHARDJO *et al.*, 2012). Entretanto, sua lenta taxa de biodegradação limita sua utilização (GUASTALDI E APARECIDA, 2010).

Nesse cenário os TCP's tem se destacado como enxertos biocerâmicos. Podem ser obtidos por diferentes técnicas de síntese possuindo três formas polimórficas: β -TCP, α -TCP e α' -TCP, sendo a fase β , segundo Albuquerque (2012), a que possui taxas de reabsorção mais adequadas a este tipo de aplicação. Segundo Daculsi (1998), comparado à hidroxiapatita, o β -TCP apresenta maior velocidade de reabsorção, sendo que a sua presença em cerâmicas bifásicas

constituídas por β -TCP e HA é a responsável pelo aumento das taxas de reabsorção do sistema.

Tais cerâmicas podem ser encontradas nas formas de blocos ou de grânulos (densos ou porosos). O formato pré-determinado dos blocos dificulta a sua adequação ao local de implante, assim como o material granulado apresenta risco de migração, podendo alcançar os tecidos moles e provocar reações adversas e até mesmo a perda do material (DRIESENS *et al.*, 1997). Estas desvantagens estariam ausentes em um material que tivesse composição similar às cerâmicas de fosfato de cálcio (possuindo assim biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade) e pudessem ser moldados nas formas e dimensões do defeito ósseo (CARRODEGUAS *et al.*, 1999; ALONSO, 2000).

Os cimentos, de uma forma geral, são constituídos de uma parte sólida e uma líquida que pode ser água ou uma solução, que formam uma pasta ao serem misturadas, perdendo sua plasticidade com o tempo e ganhando resistência mecânica, progressivamente (ALONSO, 2000). Existem vários cimentos com aplicação na área biomédica, como os odontológicos (fosfato de zinco e silicato e os ionômeros de vidro) e ósseos (polimetilmetacrilato) (PEREIRA *et al.*, 2006). Alguns requisitos são básicos para o cimento ósseo, destacando-se a adesão e endurecimento *in vivo* em tempo satisfatório, a resistência mecânica apropriada durante o período requerido, o pH próximo da faixa de neutralidade (6,5-8,5) durante e após a adesão para evitar os efeitos citotóxicos, a fácil manipulação, a moldabilidade, a ausência de toxicidade, a adesão ao tecido ósseo e a ausência de características alergênicas e cancerígenas (LEMAITRE *et al.*, 1992; DRIESENS *et al.*, 1997).

O polimetilmetacrilato (PMMA), conhecido como acrílico, é obtido através da mistura de um monômero líquido e um polímero em pó. Sua polimerização é um processo exotérmico, no qual a temperatura pode atingir 80°C durante o tempo de cura do polímero (8-10 min). Uma vez formado, o PMMA não é absorvido e induz a formação de uma cápsula fibrosa, o que significa que ele é biocompatível, mas não há integração com o tecido ósseo (BERTOL *et al.*, 2010). Em razão de limitações associadas ao uso do cimento à base de PMMA, como a baixa adesão às superfícies ósseas, e devido às reações exotérmicas que ocorrem durante sua polimerização, procura-se o desenvolvimento de um material semelhante, preparado

a base de fosfato de cálcio, que reúna as vantagens dos biomateriais à base de fosfato de cálcio e as dos materiais tipo cimentos (CUNIN *et al.*, 2000).

O termo “cimento de fosfato de cálcio” (CFC) foi introduzido por Gruninger *et al.*, (1984). Segundo eles, esse tipo de cimento pode ser preparado misturando-se um sal de fosfato de cálcio com uma solução aquosa para que se forme uma pasta que possa reagir em temperatura ambiente ou corporal dando lugar a um precipitado que contenha um ou mais fosfato de cálcio, ocorrendo a cura pelo intercruzamento dos cristais deste precipitado. Esses cimentos reúnem uma série de vantagens que permitem seu uso como preenchimento e substituto de partes danificadas do sistema ósseo, destacando-se: biocompatibilidade, osteocondutividade, preparação do cimento durante o procedimento cirúrgico; adaptabilidade à geometria óssea de cada paciente; ótimo contato entre osso e implante; reação de cura isotérmica.

A osteocondução é a principal propriedade atribuída aos CFCs, onde a capacidade de formar um arcabouço e suportar crescimento ósseo em seu interior, guiando o desenvolvimento de células osteoprogenitoras e a formação óssea leva a uma aposição direta entre osso e o material. Para tanto, o material deve apresentar uma composição química e uma geometria de partículas adequadas (LEGEROS, 2002; RUPPRECHT, 2003) além de poros com diâmetros compatíveis com o crescimento celular e a interconexão entre esses poros existentes (BOHNER e BAUMGART, 2004; KARAGEORGIU e KAPLAN, 2005; HING, 2005).

Diversas formulações de CFC foram propostas nos últimos 25 anos, entretanto duas se destacaram, sendo elas a brushita (fosfato de cálcio di-hidratado DCPD, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). A principal diferença entre essas duas formulações é a solubilidade do produto final: a brushita é cerca de uma a duas vezes mais solúvel que a apatita em pH fisiológico, sendo, portanto, reabsorvida mais rapidamente quando comparada a hidroxiapatita (BOHNER, 2000).

Os cimentos de fosfatos possuem composição de fases cristalinas e resposta biológica similares às biocerâmicas de fosfato de cálcio, mas com a diferença de que podem ser facilmente moldados e adaptados ao local de implantação. São normalmente frágeis, porém, são utilizados como preenchedores não estruturais em cirurgias maxilofaciais, neurológicas e ortopédicas. Também podem funcionar como reservatórios para antibióticos e fatores de crescimento, propriedades determinadas pela apresentação física como também por fatores como a composição química,

processo de fabricação, granulometria, porosidade e canais de interconexão (ALONSO, 2011; ALBUQUERQUE, 2012).

DESENVOLVIMENTO E REPARAÇÃO ÓSSEA CRANIANA

O desenvolvimento ósseo pode ocorrer através de dois processos: ossificação intramembranosa e ossificação endocondral. A ossificação intramembranosa é responsável pela formação dos ossos da calota craniana como o frontal, o parietal, parte do occipital e as partes escamosas e timpânicas do osso temporal. Através deste processo se originam também, a maxila, a mandíbula e a clavícula. A ossificação intramembranosa também contribui para o aumento em espessura dos ossos longos e para o crescimento dos ossos curtos (KATCHBURIAN E ARANA, 1999).

O início da ossificação intramembranosa ocorre com a ativação das células mesenquimais que proliferam e se agrupam na presença de uma abundante rede de capilares. Em seguida estas células se diferenciam em osteoblastos que passam a sintetizar e secretar as moléculas constituintes da matriz orgânica (osteóide), que é posteriormente mineralizada. A deposição dos componentes da matriz orgânica e sua subsequente mineralização acarretam o aprisionamento dos osteoblastos dentro desta matriz calcificada e, nesta condição, se diferenciam em osteócitos (MACKIE, 2003). O entrelaçamento de vários centros de ossificação intramembranosa resulta na formação das trabéculas e entre elas, amplas cavidades abrigam numerosos vasos sanguíneos. Dessa forma, origina-se o osso primário, que com o aparecimento dos osteoclastos é gradualmente substituído pelo osso maduro ou lamelar (KATCHBURIAN E ARANA, 1999).

Já a reparação do tecido ósseo craniano é diretamente influenciada pelos tecidos moles ao redor. Gosain *et al.*, (2003) demonstraram o efeito da dura-máter e do perióstio no crescimento ósseo no crânio. Avaliaram o efeito do isolamento da dura-máter e do perióstio na reparação de defeitos cranianos em coelhos imaturos e maduros esqueleticamente, afirmando que a dura-máter é responsável pelo crescimento ósseo em forma de “ilhas ósseas” no interior do defeito e que o perióstio influencia o crescimento a partir das bordas.

Embora o tecido ósseo possua alta capacidade de reparação espontânea, esse potencial é limitado pelo tamanho do defeito. Assim, defeitos muito extensos, causados por traumas, infecções, neoplasias e anomalias do desenvolvimento representam um problema para a medicina e a odontologia (HERCULANI *et al.*, 2000). Schmitz e Hollinger (1986) definiram o defeito de tamanho crítico como o menor tamanho de ferida intra-óssea, em um determinado osso e espécie animal, que não regenera por si só. Portanto, um defeito ósseo experimental utilizado para avaliar o reparo ósseo deve ser amplo o suficiente para prevenir que o coágulo organize-se levando ao fechamento espontâneo por tecido ósseo, ocorrendo, em vez deste, a formação de um tecido conjuntivo fibroso. Dessa maneira, o potencial de reparo ósseo de determinado enxerto ou implante poderá ser considerado evidente (FRAME, 1980).

Modelos de defeitos de tamanho crítico foram desenvolvidos e amplamente utilizados para avaliar a eficácia biológica, o potencial e a segurança dos biomateriais. Frame (1980) estudou a cicatrização de defeitos com 15 mm de diâmetro na calvária de coelhos. Usando trefinas o autor criou defeitos com 5, 10, 15 e 20 mm de diâmetro. Nas semanas 24 e 36, os defeitos de 15 mm de diâmetro tinham cicatrizado com a formação de um tecido conjuntivo fibroso sendo considerado pelo autor, portanto, como um defeito de tamanho crítico. Chen *et al.*, (1999) mostraram que defeitos de 15 mm de diâmetro criados na calvária de coelhos não repararam espontaneamente após 90 dias, sendo observada a formação de uma fina camada de tecido conjuntivo no interior do defeito ósseo e uma discreta formação óssea a partir das bordas. Resultados semelhantes foram relatados por Moghadam *et al.*, (2004), ao avaliarem materiais aloplásticos e enxertos alogênicos em defeitos ósseos com 15 mm de diâmetro no crânio de coelhos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As perdas ósseas têm aumentado consideravelmente nos últimos anos decorrentes principalmente de fraturas ocorridas em acidentes automobilísticos assim como de neoplasias e de doenças que afetam o metabolismo ósseo. Desse modo, o estudo de diferentes tratamentos para estimular e facilitar a reparação óssea tem se intensificado nas últimas décadas. A necessidade de novos materiais

mais acessíveis e novas técnicas para utilização na medicina e odontologia humana e veterinária é evidente.

Os cimentos de fosfato de cálcio apresentam-se como uma alternativa promissora para a reconstrução óssea em regiões de topografia complexa como o crânio, onde implantes previamente elaborados por modernas técnicas de imagem e usinagem tornam o acesso a essa tecnologia restrita à parcela da população com alta renda. Espera-se que através do desenvolvimento e da manipulação de materiais inorgânicos pela engenharia tecidual seja desenvolvido um biomaterial que associe as vantagens das cerâmicas de fosfato tricálcico, principalmente biocompatibilidade, biodegradabilidade e osteocondutividade à moldabilidade dos materiais tipo cimento, podendo assim ser moldadas nas formas e dimensões dos defeitos ósseos.

REFERÊNCIAS

AHN, DUCK-HYUNG; KIM, DAE-WON; KANG, SUNG-DON. In Situ Floating Resin Cranioplasty for Cerebral Decompression. **Journal of Korean Neurosurgical Society**, v.46, n.4, p.417-420, 2009.

ALBUQUERQUE, J.S.V. **Produção de biocimentos de apatitas nanométricas aplicados como sistema de liberação controlada de fármacos**. 2012. 221f. Tese (Doutorado em engenharia e ciência de materiais) – Departamento de engenharia metalúrgica e de materiais, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

ALONSO, L.M. **Avaliação de cimentos ósseos de Fosfatos de Cálcio com adições de Aluminato e Silicato de Cálcio**. 2011. 175f. Tese (Doutorado em engenharia) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ALONSO, L.M. **Conversión hiotérmica de bloques de dihidrógeno fosfato de cálcio dihidratado em hidroxiapatita**. 2000. 52f. Trabalho de conclusão de curso. Facultad de Química, Universidad de la Habana, Ciudad de La Habana.

ARCHAVLIS, E.; NIEVAS, M.C.Y. The impact of timing of cranioplasty in patients with large cranial defects after decompressive hemicraniectomy. **Acta Neurochirurgica**. v.154, p.1055-1062, 2012.

BERTOL, L.S.; ESCOBAR, C.F.; JUNIOR, W.K. Projeto, fabricação e avaliação combinados. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**. v.26, n.2, p.79-89, 2010.

BIELBY R.; JONES, E.; MCGONAGLE, D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. **Injury: International Journal of the Care of the Injured**. v.38 (suppl. 1), p. 26-32, 2007.

BOHNER, M. Calcium Orthophosphates in Medicine: from Ceramics to Calcium Phosphate Cements. **Injury: International Journal of the Care of the Injured**. v.31, p. D37-D47, 2000.

BOHNER, M; BAUMGART, F. Theoretical model to determine the effects of geometrical factors on the resorption of calcium phosphate bone substitutes. **Biomaterials**. v.25, p.3569-3582, 2004.

BURG, K.J.L.; PORTER, S.; KELLAM, J.F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**. v.21, p.2347-2359, 2000.

CARRODEGUAS, R.G.; OLIVEIRA, L.C.; SANTOS, L.A.; RIGO, E.C.S.; BOSCHI, A.O.; MONDÉJAR, S.P. Cimentos de alfa-Fosfato Tricálcico de Fraguado Doble. **Revista CENIC – Ciências Químicas**. v. 30, n. 3, p. 153-158, 1999.

CHEN, T.M.; YAO, C.H.; WANG, H.J.; CHOU, G.H.; LEE, T.W.; LIN, F.H. Evaluation of a novel malleable, biodegradable osteoconductive composite in a rabbit cranial defect model. **Materials chemistry and physics**. v. 55, p. 44 - 50, 1998.

CHO, Y.R.; GOSAIN, A.K. Biomaterials in craniofacial reconstruction. **Clinics in plastic surgery**. v.31, p. 377-385, 2004.

CHUN, H.J; YI, H.J. Efficacy and safety of early cranioplasty, at least within 1 month. **Journal of Craniofacial Surgery**. v.22, n.1., 203-207, 2011.

CORSETTI, A.; LEITE, M.G.T.; PONZONI, D.; PURICELLI, E. Avaliação da presença de microrganismos aeróbios em blocos de cimento fosfato de cálcio submetidos a três técnicas de esterilização. **Revista da Faculdade de Odontologia de Passo Fundo**. v.13, n.2, p. 27-32, 2008.

CUNIN, G.; BOISSONNET, H.; PELITE, H.; BLANCHAT, C.; GUILLEMIN, G. Experimental vertebroplasty using osteoconductive granular material; **Spine**. v.25, n.9, p.1070-1076, 2000.

DACULSI, G. Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. **Biomaterials**. v.19, p.1473-1478, 1998.

DINOPOULOS, H.; DIMITRIOU, R.; GIANNOUDIS, P.V. Bone graft substitutes: What are the options? **The Surgeon**. v.10, n.4, p.230-239, 2012.

DRIESSENS, F.C.M.; FERNÁNDEZ, E.; GINEBRA, M.P.; BOLTONG, M.G.; PLANELL, J.A. Calcium phosphates and ceramic bone cements vs. acrylic cements. **Anales de Química Internacional**. v. 93: p. S38-S43, 1997.

EINHORN, T.A. Enhancement of fracture-healing. **The Journal of Bone & Joint Surgery**. v.77, n.6, p. 940-956, 1995.

FAUL, M.; XU, L.; WALD, M.M.; CORONADO, V.G. Traumatic Brain Injury in the United States: Emergency Department Visits, Hospitalizations, and Deaths 2002 - 2006. **Department of health and human services centers for disease control and prevention**, 2010.

FRAME, J.W. A convenient animal model for testing bone substitute materials. **Journal of oral surgery**. v.38, n.2, p.176-180, 1980.

GIL, M.H.; FERREIRA, P. Polissacarídeos como biomateriais. **Química** 100. p.72-74, 2006.

GOSAIN, A.K.; SANTORO, T.D.; SONG, L.S.; CAPEL, C.C.; SUDHAKAR, P.V.; MATLOUB, H.S. Osteogenesis in calvarial defects: contribution of the Dura, Pericranium, and the Surrounding Bone in Adult versus Infant Animals. **Plastic and reconstructive surgery**. v.112, n.2, p.515-527, 2003.

GRUNINGER, S.E.; SIEW, C.; CHOW, L.C.; O'YOUNG, A.; TSAO, N.K.; BROWN, W.E. Evaluation of biocompatibility of a new calcium-phosphate setting cement. **Journal of Dentistry Research**. v.63, p.200, 1984.

GUASTALDI, A.C.; APARECIDA, A.H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**. v.33, n.6, p.1352-1358, 2010.

HAN, P.Y.; KIM, J.H.; KANG, H.I.; KIM, J.S. "Syndrome of the Sinking Skin-Flap" Secondary to the ventriculoperitoneal shunt after craniectomy. **Journal of Korean neurosurgical society**. v.43, p.51-53, 2008.

HARA, T.; SANTOS, C.A.; FARIAS, A.; COSTA, M.J.M.; CRUZ, R.J.L. Cranioplastia: parietal versus prótese customizada. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**. v.26, n.1, p.32-36, 2011.

HENCH, L.L. The challenge of orthopaedic materials. **Current orthopaedics**. v. 14, p.7-15, 2000.

HERCULANI, P.P.; CESTARI, T.M.; TAGA, E.M.; TAGA, R. Tratamento de defeito ósseo perene em calvária de cobaia com membrana de cortical óssea bovina liofilizada associada ou não a enxerto ósseo bovino desmineralizado. **Revista Brasileira de Implantodontia**. v.2, p.7-14, 2000.

HING, K.A. Bioceramic Bone Graft Substitutes: Influence of Porosity and Chemistry. **International Journal of Applied Ceramic Technology**. v.2, n.3, p.184-199, 2005.

HONEYBUL, S. Complications of decompressive craniectomy for head injury. **Journal of Clinical Neuroscience**. v. 17, n.4, p. 430–435, 2010.

KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**. v.26, p.5474-5491, 2005.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V.; Tecidos mineralizados. In: Katchburian E, Arana V. **Histologia e embriologia oral: correlações clínicas**. São Paulo: Panamericana; 1999. p.23-38.

KAWACHI, E.Y., BERTRAN, C.A., REIS, R.R., ALVES, O. L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**. v.23, n.4, p.518-522, 2000.

KOKUBO, T; KIM, H.M; KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials**. v.24, n.13, p. 2161-2175, 2003.

KUO, J.R.; WANG, C.C.; CHIO, C.C.; CHENG, T.J. Neurological improvement after cranioplasty – analysis by transcranial doppler ultrasonography. **Journal of Clinical Neuroscience**. v.11, n.5, p.486-489, 2004.

LAJARIN, S. **Avaliação dimensional de Implantes sob medida para Cranioplastia**. 2008. 141p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná, 2008.

LEGEROS, R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. v.395, p.81-98, 2002.

LE GUEHENNEC, L.; LAYROLLE, P.; DACULSI, G.A review of bioceramics and fibrin sealant. **European Cells and Materials Journal**. v.8, p. 1-11, 2004

LEMAITRE, J.; MUNTING, E.; MIRTCHI, A. Setting, hardening and reabsorption of calcium phosphate hydraulic cements. **Revue de Stomatologie et de chirurgie maxillo-faciale**. v. 93, n. 3, p. 163-165, 1992.

MACEDO, A.; LAMELO, S.G.; ALENCAR, E.; CABALLERO, F.; GIMENES, E.; ZUBIETA, C. Enxerto ósseo em crânio: princípios básicos para a integração óssea. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**. v.24, n.4, 617-623, 2010.

MACKIE, E. J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v.35, p.1301-1305, 2003.

MEURER, M.I.; MEURER, E.; SILVA, J.V.L.; BARBARA, A.S.; NOBRE, L.F.; OLIVEIRA, M.G.; SILVA, D.N. Aquisição e manipulação de imagens por tomografia computadorizada da região maxilofacial visando à obtenção de protótipos biomédicos. **Radiologia Brasileira**. v.1, p. 49-54, 2008.

MOGHADAM, H.G.; SANDOR, G.K.B.; HOLMES, H.H.I.; CLOKIE, C.M.L. Histomorfometric evaluation of bone regeneration using allogeneic and alloplastic bone substitutes. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v.62, n. 2, p. 202 – 212, 2004.

MYGIND, T; STICHLER, M.; BAATRUP, A.; LI, H.; ZOU, X.; FLYVBJERG, A.; KASSEM, M.; BÜNGER, C. Mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite scaffolds. **Biomaterials**. v.28, p.1036-1047, 2007.

NAVARRO, M.; MICHIARDI, A.; CASTAÑO, O.; PLANELL, J.A. Biomaterials in orthopaedics. **Journal of The Royal Society Interface**. v.5, p.1137-1158, 2008.

NOTODIHARDJO, F.Z.; KAKUBO, N.; KUSHIDA, S.; SUZUKI, K.; Kenji KUSUMOTO, K. Bone regeneration with BMP-2 and hydroxyapatite in critical-size calvarial defects in rats. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**. v.40, p.267-291, 2012.

OYELESE, A.A.; STEINBERG, G.K.; HUHN, S.L.; WIJMAN, C.A. Paradoxical herniation secondary to lumbar puncture after decompressive craniectomy for a large space-occupying hemisphere stroke: case report. **Neurosurgery**. v. 57,n.3, p.E594, 2005.

PEREIRA, M.M. Materiais cerâmicos – ciência e aplicação como biomateriais. In: ORÉFICE, R.L. **Biomateriais Fundamentos & Aplicações**. 1.ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. p. 61-81.

PRECHEUR, H.V. Bone Graft Materials. **Dental Clinics of North America**. v.51, p. 729-746, 2007.

RICHAUD, J.; BOETHO, S.; GUELL, A.; LAZORTHES, Y. Incidence des cranioplastias sur la fonction neurologique et le debit sangein cerebral. **Neurochirurgia**. v.31, p.183-188,1985.

RUPPRECHT, S.; MERTEN, H.A.; KESSLER, P.; WILTFANG, J. Hydroxyapatite cement (BoneSource) for repair of critical sized calvarian defects--an experimental study. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**. v.31, p.149-153, 2003.

SAHOO, N.; ROY, I.D.; DESAI, A.P.; GUPTA, V. Comparative evaluation of autogenous calvarial bone graft and alloplastic materials for secondary reconstruction of cranial defects. **Journal of Craniofacial Surgery**. v.21, n.1, p. 79-82, 2010.

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

SINGH, K.A.; BURSTEIN, F.D.; WILLIAMS, J.K. Use of Hydroxyapatite Cement in Pediatric Craniofacial Reconstructive Surgery: Strategies for Avoiding Complications. **Journal of Craniofacial Surgery**. v.21, n.4, p.1130-1135, 2010.

TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. **Journal of The Royal Society Interface**. v.6, p.311-324, 2009.

WILLIAMS, D.F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**. v.30, p. 5897-5909, 2009.

YOSHIDA, K.; FURUSE, M.; IZAWA, A.; IIZIMA, N.; KUCHIWAKI, S.I. Dynamics of cerebral blood flow and metabolism in patients with cranioplasty as evaluated by ¹³³Xe CT and ³¹P magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**. v.61, p.166-171, 1996.

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DO CIMENTO ÓSSEO A BASE DE β -FOSFATO TRICÁLCICO.

RESUMO

Os cimentos de fosfato de cálcio (CFC) se destacam como substitutos ósseos por serem biocompatíveis, biodegradáveis e moldáveis, atraindo o interesse entre os cirurgiões craniofaciais. Nesse contexto, objetivou-se analisar um cimento ósseo a base de β -fosfato tricálcico (β -TCP) quanto aos seus constituintes minerais por meio da difração de raios X, bem como as características de sua superfície, através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Uma fase sólida, constituída de β -fosfato tricálcico [$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] e sulfato de cálcio di-hidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - gesso), foi misturada a uma líquida, formada por ácido fosfórico (H_3PO_4) 2M, em proporção de 1:1 e homogeneizada. As análises de difração de raios X e MEV foram realizadas após seu endurecimento, determinado subjetivamente pela compressão manual. À difração de raios X, o cimento apresentou elevada cristalinidade, sendo identificados dois compostos (β -TCP e sulfato de cálcio di-hidratado, gesso) constituintes prévios do material, e um terceiro, o fosfato de cálcio di-hidratado, também chamado de brushita, formado após dissolução do β -TCP no H_3PO_4 . A MEV revelou superfícies complexas, formadas por cristais em forma de placas e agulhas, condizentes com as formas brushita e gesso respectivamente. Foi observada a presença de pequenos poros com diâmetro médio de 19,5 ($\pm 5,92$) μm sem, entretanto, evidenciar a presença de macroporos nem interconexões entre os poros existentes. Embora a ausência de tais estruturas e a falta de evidências de interconexões entre os poros existentes sejam fatores indesejáveis, a complexidade da superfície do material pode ser favorável para a regeneração tecidual.

Palavras chave: biomateriais, topografia de superfície, poros.

IN VITRO CHARACTERIZATION OF BONE CEMENT BASED ON β -TRICALCIUM PHOSPHATE

ABSTRACT

Calcium phosphate cements (CFC) are noted for being biocompatible, biodegradable and moldable, drawing the attention of craniofacial surgeons for fulfilling many of the needed requirements. In this context, we aimed to analyze a bone cement based on β -tricalcium phosphate (β -TCP) for its mineral constituents using X-ray diffraction as well as its surface characteristics using Scanning Electron Microscopy (SEM). A solid phase made of β -tricalcium phosphate [$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] and calcium sulfate dihydrate ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - plaster) was mixed with a liquid one of phosphoric acid (H_3PO_4) 2M at a proportion of 1:1. SEM and X-ray diffraction were done after hardening, subjectively determined by manual compression. By x-ray diffraction, the cement showed high crystallinity, indicating two components (β -TCP and calcium sulfate dihydrate, plaster) previous constituents of the material and a third one (calcium phosphate dihydrate, brushite, formed after the dissolution of β -TCP in H_3PO_4). SEM showed complex surfaces made of plaque and needle shaped crystals, consistent with the forms of brushite and plaster, respectively. Pores with a mean diameter of $19.5 \pm 5.92 \mu\text{m}$ were observed, however, with no interconnection and no macropores could be observed. Although the absence of macropores as well as the absence of interconnections between the existing micropores are not desired, the material's complex surface may be favorable for tissue regeneration.

Key words: biomaterials, surface topography, pores.

INTRODUÇÃO

Na reparação do tecido ósseo lesionado os materiais a base de fosfato de cálcio são amplamente empregados por serem similares em constituição à fase mineral óssea. Os cimentos de fosfato de cálcio (CFC) se destacam por serem biocompatíveis, biodegradáveis e moldáveis, atraindo o interesse entre os cirurgiões craniofaciais por cumprirem muitos requisitos dos substitutos ósseos ideais (KUEMMERLE *et al.*, 2005). Esses materiais são constituídos por duas fases, uma sólida e uma líquida, onde a mistura dessas fases promove alterações químicas e físicas culminando no endurecimento do cimento (BARINOV, 2011).

Os fenômenos físicos e químicos que culminam no endurecimento dos CFCs, em geral, envolvem a formação de novas fases cristalinas. Tais fenômenos, de forma sucinta, ocorrem em três estádios: 1 - dissolução das partículas sólidas na parte líquida até a saturação do meio com íons cálcio e fosfato; 2 - interações entre esses íons na solução de modo a formar núcleos de cristalização; 3 - crescimento dos novos cristais, onde a resistência mecânica do material cresce pelo intercruzamento dos cristais que geralmente assumem a forma lamelar e de agulhas (KENNY e BUGGY, 2003; BARINOV, 2011). Os principais produtos obtidos a partir da interação entre os componentes relativamente ácidos e básicos utilizadas para obtenção dos CFCs são: apatita deficiente em cálcio $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$, semelhante em composição a hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; fosfato monoácido de cálcio di-hidratado (DCPD) $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e fosfato de cálcio amorfo $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_{2-n}\text{H}_2\text{O}$, onde $n = 3,0 - 4,5$ (MARTIN *et al.*, 2002). A precipitação de cristais de DCPD tem sido relatada em diversos sistemas de produção de cimentos ósseos a base de α e β - fosfato tricálcico (NILSSON *et al.*, 2002; BARINOV, 2011), dihidrogenofosfato de cálcio monohidratado (SMIRNOV, 2008) e fosfato monocálcico monohidratado (KUEMMERLE *et al.*, 2005).

Um componente chave para a reparação adequada dos tecidos lesionados é o arcabouço formado pelo biomaterial para as interações celulares e formação da matriz extracelular, fornecendo sustentação estrutural ao novo tecido formado. Esse componente deve atender a determinados critérios, como possuir propriedades mecânicas adequadas às do local implantado, ser biocompatível e biodegradado em uma taxa proporcional ao crescimento de tecido ósseo novo. Além disso, o sucesso do implante de matérias a base de fosfato de cálcio depende do crescimento de

osso novo, sendo a osteocondução a principal propriedade atribuída aos cimentos de fosfato de cálcio. Entende-se por osteocondução a capacidade de um biomaterial suportar o crescimento ósseo em seu interior, guiando o desenvolvimento de células osteoprogenitoras e a formação óssea levando a uma aposição direta de osso sobre o material (LEGEROS, 2002; RUPPRECHT, 2003; KARAGEORGIU e KAPLAN, 2005).

Algumas características desses arcabouços, como presença e o tamanho dos poros, bem como as interconexões entre esses poros desempenham papel crucial na formação óssea (FLAUTRE *et al.*; 2001). Para que ocorra a osteocondução o tamanho do poro deve ser grande o bastante para acomodar as células juntamente com o sistema de irrigação sanguínea. Para Hulbert *et al.*, (1970) 100 μm é o menor diâmetro de poro que permite o crescimento ósseo. Desde então, diversos estudos são realizados na busca pelo diâmetro de poro ideal. Tsuruga *et al.*, (1997) relataram maior formação óssea em cerâmicas de HA com poros de 300 a 400 μm de diâmetro. Medidas semelhantes foram relatadas por Chang *et al.*, (2000), 300 μm e por Karageorgiou e Kaplan (2005), 100 a 500 μm .

Entretanto, segundo KUBOKI *et al.*, (1998), Böhner e Baumgart (2004) e Hing (2005) apenas a existência de poros em tamanho adequado não garante a formação óssea satisfatória, sendo necessária a interconexão entre eles para que ocorra a neovascularização e conseqüente suprimento adequado de oxigênio e nutrientes, sendo um pré-requisito para a reabsorção e formação de tecido ósseo novo (CHOW, 2009). Egli *et al.* (1988) demonstraram a importância da interconexão entre os poros ao constatarem maior formação óssea no interior de cerâmicas de hidroxiapatita e fosfato tricálcico com pequenos poros interconectados (100 μm) comparada aquelas com grandes poros não interconectados (200–400 μm). Segundo e Ambard e Mueninghoff (2006) e Ginebra *et al.* (2012) uma das principais desvantagens dos cimentos de fosfato de cálcio é o pequeno número de poros interconectados, o que retarda o crescimento ósseo

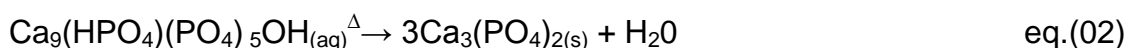
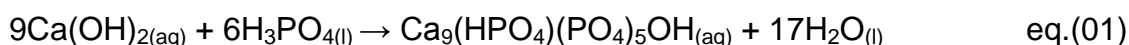
Ainda também, a topografia de superfície tem grande importância por influenciar diretamente a adesão plaquetária, iniciando os eventos celulares que culminarão na produção de matriz óssea (SPISANI *et al.*, 1992; AMMON *et al.*, 1998). Assim, a ativação plaquetária exerce papel imprescindível no processo de reparação óssea (KIKUCHI *et al.*, 2005), podendo ser regulada a partir da alteração

da superfície dos materiais, onde a microtextura da superfície favorece a adesão do coágulo sanguíneo bem como dos tipos celulares que participam do processo de reparação óssea (PARK *et al.*, 2001).

O presente capítulo tem como objetivo caracterizar *in vitro* o cimento ósseo utilizado, 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.

MATERIAL E MÉTODOS

O cimento ósseo utilizado foi desenvolvido por Albuquerque (2012). Tal cimento foi obtido a partir da mistura entre uma fase sólida composta por duas cerâmicas, o β -fosfato tricálcico [$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] (β -TCP) e o sulfato de cálcio di-hidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - gesso) e uma fase líquida, o ácido fosfórico (H_3PO_4) 2M. O β -TCP foi obtido a partir da mistura das soluções de hidróxido de cálcio [$\text{Ca}(\text{OH})_2$], ácido fosfórico e ácido láctico [$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$]. A mistura obtida foi então sinterizada a uma taxa de aquecimento de $5^\circ\text{C}/\text{min}$, onde, após atingir a temperatura de 1200°C , foi mantida durante 1 hora, obtendo-se o β -fosfato tricálcico conforme as equações:



As proporções utilizadas de cada cerâmica para composição da fase sólida não serão informadas ao longo do presente trabalho uma vez que a produção do cimento encontra-se em processo de patente. A fase sólida foi misturada à líquida, em proporção de 1:1, com auxílio de uma cuba inox esterilizada e homogeneizada utilizando um bastão de vidro também esterilizado. Após seu endurecimento, determinado subjetivamente pela compressão manual, o cimento foi armazenado em recipiente plástico com tampa para posterior análise.

A cristalinidade do cimento ósseo foi analisada por difração de raios X. Para tal, o cimento ósseo foi desagregado em almofariz de porcelana até assumir aspecto farináceo e acondicionado no em moldes adaptados interior de um difratômetro da

marca Rigaku D-Max modelo Geiger Flex equipado com tubo de cobalto (radiação Co-K α , $\lambda = 1,79026 \text{ \AA}$), com 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 10 a 70° 2 θ com 0.05° de incremento e 2 segundos de contagem de tempo em cada passo. O resultado foi apresentado na forma de gráfico, obtido a partir do programa “X Powderver.2010.01.28 pro” e comparado com dados disponíveis em banco de dados da literatura.

Para análise microestrutural do cimento ósseo foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura (MEV) da marca LEO 1430VP, a voltagens de 10 ou 15 kV. Para tal, as superfícies do cimento foram cobertas por uma camada de 20 nm de ouro, utilizando um sistema de deposição “sputtering balzers” (Electron Microscopy Sciences, modelo 550x). A análise morfológica foi realizada em toda a superfície intacta do cimento bem como em sua superfície de fratura.

O tamanho dos poros foi estimado com o auxílio de uma grade composta por 10 linhas e 10 colunas, correspondendo a 100 pontos equidistantes de interseção, sobreposta às imagens obtidas pela MEV. Utilizou-se três micrografias de pontos diferentes do cimento, em aumento de 500x, onde foram realizadas mensurações dos maiores diâmetros dos poros presentes. A fim de padronizar a escolha dos poros a serem mensurados definiu-se que seriam escolhidos aqueles encontrados nas colunas ímpares da grade, até serem obtidas 10 mensurações por micrografia. Obteve-se, então, a média dos valores dos diâmetros dos poros encontrados no material e comparou-se com aqueles encontrados na literatura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O difratograma do cimento ósseo avaliado antes da sua implantação encontra-se representado na figura 1. Foram identificados picos elevados e agudos, demonstrando a elevada cristalinidade do material. Segundo ThermoArl (1999) e Neto (2003), quanto maior o número de cristais em um plano de uma estrutura, mais intensos, pontiagudos e estreitos serão os picos na difração de raios X. O conhecimento da cristalinidade de um biomaterial segundo Reis *et al.* (2012) é de grande importância considerando que influencia seu desempenho *in vivo* por afetar a

sua reabsorção e as suas propriedades mecânicas. Foram identificadas na amostra analisada o β -TCP, o gesso e o DCPD condizentes com seus respectivos CPDS Cards (MINCRYST, 2012). A presença da fase mineral DCPD, ausente nas especificações técnicas segundo o fabricante, pode ser explicada por Bohner (1993), Juncioni *et al.* (2005) e Xia *et al.* (2006) e que propuseram um mecanismo de reação para o sistema β -TCP – ácido fosfórico onde, após a dissolução do β -TCP, ocorre precipitação de DCPD.

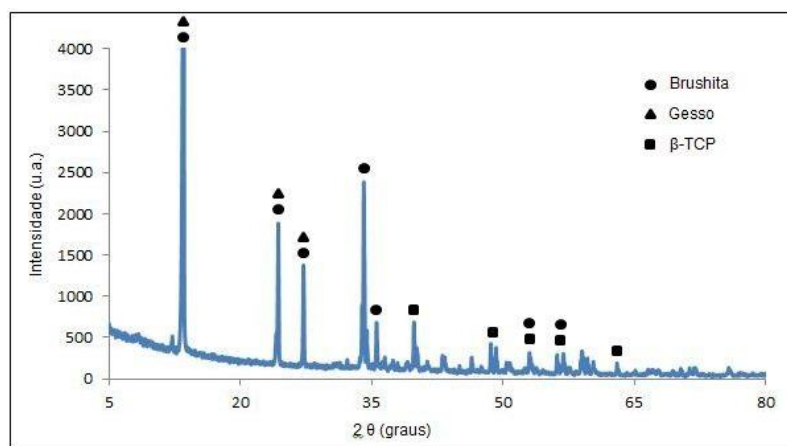


Figura 1. Difratograma do cimento ósseo a base de β -fosfato tricálcico.

A caracterização do cimento ósseo pela técnica de microscopia eletrônica de varredura realizada nas superfícies intactas e de fratura evidenciou uma rede de fragmentos de cristais em diferentes formatos de placas, que segundo Albuquerque *et al.* (2012) e Ginebra *et al.* (2012) são condizentes com o DCPD, e agulhas (Figura 2). Essa superfície pode ser caracterizada como complexa, que de acordo com Park *et al.* (2001) e Kikuchi *et al.* (2005) é ideal para promover a reparação de tecidos por favorecer a adesão do coágulo sanguíneo e celular.

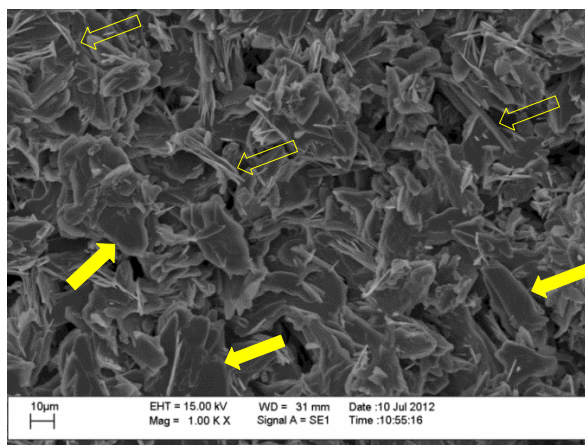


Figura 2. Micrografia do cimento a base de β -TCP obtida a partir da microscopia eletrônica de varredura. 1000x. Observar a presença de cristais em forma de placas, característicos do DCPD (setas preenchidas) e cristais em formato de agulhas, característicos do gesso (setas sem preenchimento).

A MEV permitiu identificar um padrão semelhante entre as superfícies intacta e de fratura no que diz respeito ao tamanho dos poros, na distribuição e na conexão entre eles. Foi observada a presença de pequenos poros com diâmetro médio de $19,5 (\pm 5,92) \mu\text{m}$ ao longo da superfície intacta e de fratura do cimento, não sendo observada a presença de macroporos nem a conexão entre os poros existentes (Figura 3). A necessidade da presença de poros na reparação óssea foi demonstrada por vários autores, dentre eles Kuboki *et al.* (1998) e Carlo *et al.* (2009). Carlo *et al.* (2009) relataram maior porcentagem de tecido ósseo no interior de compósitos porosos implantados em olecranos de coelhos formulados a partir de hidroxiapatita e polihidroxibutirato em comparação àqueles densos. Kuboki *et al.* (1998), a partir de implantes de hidroxiapatita densos ou porosos associados a proteínas morfogenéticas, relataram a osteogênese ectópica em ratos a partir dos implantes porosos e sua ausência nos implantes densos. Jin *et al.* (2000) também demonstram que partículas de hidroxiapatita porosas contribuem para uma rápida diferenciação e crescimento de osteoblastos ao passo que matrizes inorgânicas não porosas retardam sua diferenciação e crescimento.

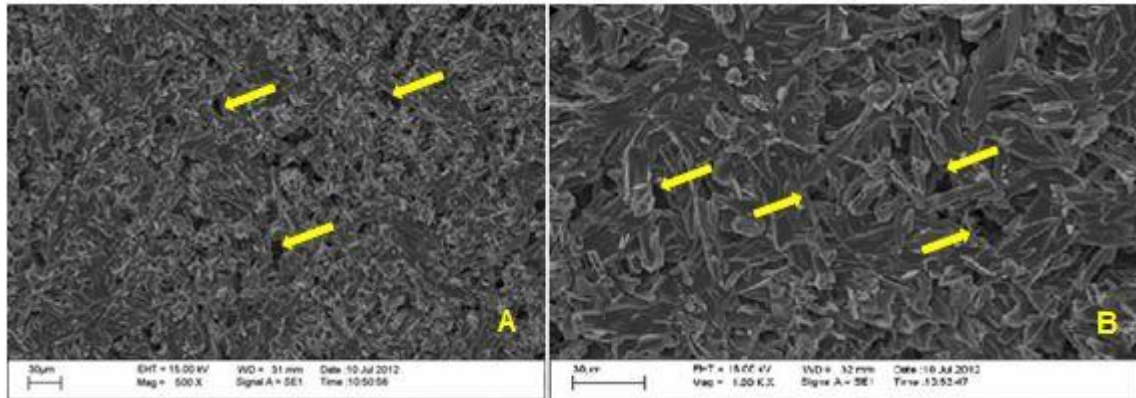


Figura 3. Micrografia da superfície intacta do cimento a base de β -TCP obtida através da microscopia eletrônica de varredura. A - menor que 500x. B – aumento de 1000x. Observar em ambas as imagens a presença de pequenos poros (setas), com diâmetro médio de $19,5 (\pm 5,92) \mu\text{m}$.

O tamanho dos poros encontrados no cimento avaliado nesse estudo ($19,5 \pm 5,92 \mu\text{m}$) foi inferior ao relatado por Hulbert *et al.* (1970) - $100 \mu\text{m}$, por Tsuruga *et al.* (1997) – 300 a $400 \mu\text{m}$ e por Karageorgiou e Kaplan (2005) - 100 a $500 \mu\text{m}$ como mínimo necessário para que ocorra a osteocondução, sendo, possivelmente, muito pequeno para acomodar as células juntamente com o sistema de irrigação sanguínea. Tal fato pode ser visto como uma característica não desejável para futuras aplicações *in vivo* do cimento ósseo. A presença de poros interconectados pode facilitar o crescimento ósseo e acelerar o processo de substituição do material por tecido ósseo (CHOW, 2009) por permitir a neovascularização, a migração de células mesenquimais e a proliferação de osteoblastos (KUBOKI *et al.*, 1998). Sendo assim, a presença de poros não interconectados no cimento ósseo avaliado (Figura 4) torna-se uma característica indesejável para favorecer uma possível neovascularização *in vivo* e os posteriores eventos celulares que culminam na formação de tecido ósseo. Entretanto, a complexidade da superfície do cimento ósseo avaliado pode ser um ponto positivo na sua utilização *in vivo*, pois esta característica é desejável por possibilitar a adesão do coágulo e das células reparadoras, segundo Park *et al.* (2001) e Kikuchi *et al.* (2005).

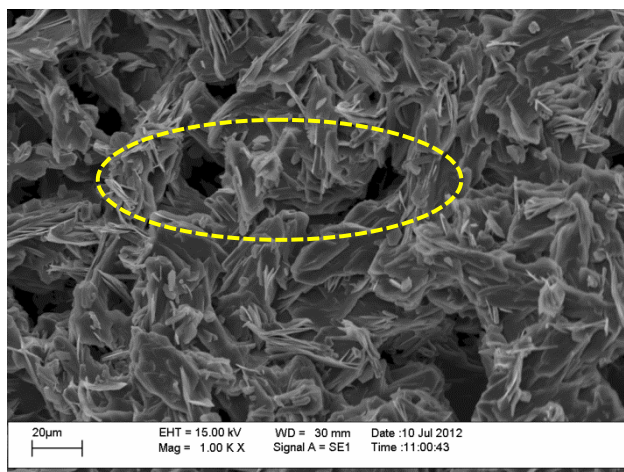


Figura 4. Micrografia da superfície de fratura do cimento a base de β -TCP obtida a partir da microscopia eletrônica de varredura. Observar que apesar de existentes, os pequenos poros não são, aparentemente, interconectados (tracejado).

CONCLUSÕES

O cimento ósseo avaliado apresentou elevada cristalinidade, sendo identificadas as fases correspondentes ao β -TCP, ao gesso e a brushita, formando uma superfície complexa com conformação dos cristais em forma de placas e espículas, apresentando poros de $19,5 (\pm 5,92) \mu\text{m}$ de diâmetro médio, não interconectados entre si. Assim sendo, a complexidade da sua superfície é considerada um ponto positivo para sua utilização *in vivo* por possibilitar a adesão do coágulo e das células reparadoras.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, J.S.V. **Produção de biocimentos de apatitas nanométricas aplicados como sistema de liberação controlada de fármacos**. 2012. 221f. Tese (Doutorado em engenharia e ciência de materiais) – Departamento de engenharia metalúrgica e de materiais, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

AMBARD, A.J.; MUENINGHOFF, L. Calcium Phosphate Cement: Review of Mechanical and Biological Properties. **Journal of Prosthodontics**.v.15, n.5, p.321-328, 2006.

AMMON C.; KREUTZ M.; REHLI, M.; KRAUSE, S.W.; ANDREESEN, R. Platelets induce monocyte differentiation in serum-free coculture. **Journal of Leukocyte Biology**.v.63, p.469-476, 1998.

BARINOV, S.M.; KOMLEV, V.S. Calcium Phosphate Bone Cements.**Inorganic materials**.v.47, n.13, p.1470-1485, 2011.

BOHNER, M. **Propriétés physico-chimique set ostéogéniques d'un biociment hydraulique à base de phosphates de calcium**. 1993. 184p. PhdThesis. Swiss Federal Institute of Technology of Lausanne, Lausanne.

BOHNER, M; BAUMGART, F. Theoretical model to determine the effects of geometrical factors on the resorption of calcium phosphate bone substitutes. **Biomaterials**.v.25, p.3569-3582, 2004.

CARLO, E.M.; BORGES, A.P.B.; CARLO, R.J.D.; MARTINEZ, M.M.M.; OLIVEIRA, P.M.; MORATO, G.O.; ELEOTÉRIO, R.B.; JÚNIOR, M.S.R. Comparison of In Vivo Properties of Hydroxyapatite-Polyhydroxybutyrate Composites Assessed for Bone Substitution. **Journal of Craniofacial Surgery**.v.20, n.3, 2009.

CHANG, B.S.; LEE, C.K.; HONG, K.S.; YOUN, H.J; RYU, H.S.; CHUNG, S.S.; PARK, K.W. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. **Biomaterials**.v.21, p.1291-1298, 2000.

CHOW, L.C. Next generation calcium phosphate-based biomaterials.**Dental Materials Journal**.v.28, n.1, p.1-10, 2009.

EGGLI, P.S.; MULLER, W.; SCHENK, R.K. Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A

comparative histomorphometric and histologic study of bony ingrowth and implant substitution. **Clinical orthopaedics and related research**.v.232, p.127-138, 1988.

FLAUTRE, B.; DESCAMPS, M.; DELECOURT, C.; BLARY, M.C. Porous HA ceramic for bone replacement: role of the pores and interconnectios – experimental study in the rabbit. **Journal of materials science: materials in medicine**.v.12, p.679-682, 2001.

GINEBRA, M.P.; CANAL, C.; ESPANOL, M. PASTORINO, D.; MONTUFAR, E.B. Calcium phosphate cements as drug delivery materials. **Advanced Drug Delivery Reviews**.v.64, p.1090-1110, 2012.

HING, K.A. Bioceramic Bone Graft Substitutes: Influence of Porosity and Chemistry. **Intrnational Journal of Applied Ceramic Technology**.v.2, n.3, p.184-199, 2005.

HULBERT, S.F.; YOUNG, F.A.; MATHEWS, R.S.; KLAWITTER, J.J.; TALBERT, C.D.; STELLING, F.H. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. **Journal of Biomedical Materials Research**.v.4, n.3, p.433-456, 1970.

JIN, Q.M.; TAKITA, H.; KOHGO, T.; ATSUMI, K.; ITOH, H.; KUBOKI, Y. Effects of geometry of hydroxyapatite as a cell substratum in BMP-induced ectopic bone formation. **Journal of Biomedical Materials Research**.v.51, n.3, p.491-499, 2000.

JUNCIONI, B.C. Hidrólise de cimento de fosfato de cálcio de DCPD para obtenção de HA. In: Congresso Brasileiro de Cerâmica, 49º, 2005, São Pedro. **Anais eletrônicos**. São Pedro: Universidade Federal de São Carlos, 2005. Disponível em: <http://www.ipen.br/biblioteca/cd/cbc/2005/artigos/49cbc-16-14.pdf>. Acessoem: 20 dez. 2012.

KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**.v.26, p.5474-5491, 2005.

KENNY, S.M.; BUGGY, M. Bone cements and fillers: a review. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**.v.14, p.923-938, 2003.

KIKUCHI, L.; PARK, J.Y.; VICTOR, C.; DAVIES, J.E. Platelet interactions with calcium-phosphate-coated surfaces. **Biomaterials**.v.26, p.5285-5295, 2005.

KUBOKI, Y.; TAKITA, H.; KOBAYASHI, D.; TSURUGA, E.; INOUE, M.; MURATA, M. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. **Journal of Biomedical Materials Research**.v.39, n.2, p.190-199, (1998).

KUEMMERLE, J.M.; OBERLE, A.; OECHSLIN, C.; BOHNER, M.; FREI, C.; BOECKEN, I.; RECHENBERG, B.V. Assessment of the suitability of a new brushite calcium phosphate cement for cranioplasty – an experimental study in sheep. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**. v. 33, p.37-44, 2005.

LEGEROS, R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. v.395, p.81-98, 2002.

MARTIN, R.I.; TENHUISEN, K.S.; LEAMY, P.; BROWN, P.W. Enthalpies of Formation of Compounds in the P₂O₅-CaO-H₂O System. **The Journal of Physical Chemistry B**. v.101, p.9375-9379, 2002.

MINCRYST. **Crystallographic and Crystallochemical Database for Minerals and their Structural Analogues**: banco de dados. Disponível em: <<http://database.iem.ac.ru/mincryst/>>. Acesso em 29 nov. 2012.

NETO, R.B. Raio x. *In*: CANEVAROLO, J.R. **Técnica de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber Editora, 2003. p. 41-60.

NILSSON, M.; FERNANDEZ, E.; SARDA, S.; LIDGREN, L.; PLANELL, J.A. Characterization of a novel calcium phosphate/sulphate bone cement. **Journal of Biomedical Materials Research**. v.61,n.4, p.600-607, 2002.

PARK, J.Y.; GEMMELL, C.H.; DAVIES, J.E. Platelet interactions with titanium: modulation of platelet activity by surface topography. **Biomaterials**. v.22, p.2671-2682, 2001.

REIS, E.C.C.; BORGES, A.P.B.; OLIVEIRA, P.M.; BICALHO, S.M.C.M.; REIS, A.M. SILCA, C.L. Desenvolvimento e caracterização de membranas rígidas, osteocondutoras e reabsorvíveis de polihidroxibutirato e hidroxiapatita para reparação periodontal. **Polímeros**. v.22, n.1, p.73-79, 2012.

RUPPRECHT, S.; MERTEN, H.A.; KESSLER, P.; WILTFANG, J. Hydroxyapatite cement (BoneSource) for repair of critical sized calvarian defects--an experimental study. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**.v.31, p.149-153, 2003.

SMIRNOV, V.V.; BARINOV, S.M.; IEVLEV, V.M.; FERRO, D.; FEDOTOV, A.Y. Calcium Phosphate Bone Cement. **Perspektivnye Materialy**, v.1, p. 26–30, 2008.

SPISANI, S.; GIULIANI, A.L.; CAVALLETTI, T.; ZACCARINI, M.; MILANI L.; GAVIOLI R.; TRANIELLOS. Modulation of neutrophil functions by activated platelet release factors. **Infalmation**.v.16, p.147.158, 1992.

THERMO ARL-CH PUBLICATION. **Basics of X ray diffraction**, USA, 1999. Disponível em <http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Product/productPDF_11602.pdf>.

Acesso em 01 abr. 2013.

TSURUGA, E.; TAKITA, H.; ITOH, H.; WAKISAKA, Y.; KUBOKI, Y. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. **Journal of Biochemistry**. v.121, n.2, p.317-324, 1997.

XIA, Z.; GROVER, L.M.; HUANG, Y.; ADAMOPOULOS, I.E.; GBURECK, U.; TRIFFITT, J.T.; SHELTON, R.M.; BARRALET, J.E. In vitro biodegradation of three brushite calcium phosphate cements by a macrophage cell-line. **Biomaterials**.v.27, p.4557-4565, 2006.

CAPÍTULO III

CIMENTO A BASE DE β FOSFATO TRICÁLCICO EM DEFEITOS ÓSSEOS NO CRÂNIO DE COELHOS - AVALIAÇÕES HEMATOLÓGICAS, CLÍNICO-CIRÚRGICAS, ANATOMOPATOLÓGICAS E TOMOGRÁFICAS.

RESUMO

Os cimentos de fosfato de cálcio (CFC) têm sido aplicados no tratamento de diversos tipos de lesões ósseas, pois diferentes estudos têm mostrado que são materiais altamente biocompatíveis e osteocondutores. O objetivo desse trabalho foi avaliar a utilização de um cimento ósseo formulado a partir de uma fase sólida (β -fosfato tricálcico e sulfato de cálcio di-hidratado) e uma fase líquida (ácido fosfórico 2M), na proporção 1:1, em defeitos ósseos no crânio de coelhos a partir de análises clínico cirúrgicas, hematológicas, anatomopatológicas e tomográficas. Para tal, foi realizado um defeito de tamanho crítico com 15 mm de diâmetro no crânio dos animais, e implantado o cimento ósseo ainda moldável. Os 33 coelhos operados foram separados em três momentos experimentais, onde amostras de tecido ósseo foram coletadas aos sete, 28 e 90 dias após o procedimento cirúrgico, sendo cada momento composto por oito animais tratados e três controles. No trans-cirúrgico, o cimento ósseo avaliado apresentou-se moldável, de fácil manipulação transcirúrgica, possuindo seu endurecimento *in situ* com ausência de produção de calor. Os exames hematológicos indicaram ausência de toxicidade sistêmica e de alterações em células da linhagem vermelha e branca. Após a eutanásia foi observada a presença de lesões de pele e no cérebro aos sete e 28 dias, entretanto, aos 90 dias essas lesões não foram mais visualizadas, sugerindo a biocompatibilidade do biomaterial ao longo dos momentos experimentais. A análise do pH do biomaterial ainda moldável revelou um valor inferior ao fisiológico (3,38). Acredita-se que esse baixo valor de pH seja o responsável pelas lesões descritas nos tecidos adjacentes e tenha ocorrido pela elevada proporção líquido/pó utilizada. Os exames tomográficos sugeriram o crescimento de um tecido no interior do defeito, não sendo possível identificar sua composição. Portanto, sugere-se que sejam feitas alterações na sua formulação para permitir sua utilização clínica.

Palavras chave: análise clínica, toxicidade sistêmica, pH.

β TRICALCIUM PHOSPHATEBASEDCEMENT IN CRANIAL BONE DEFECTS OF RABBITS – HEMATOLOGICAL, CLINICAL, SURGICAL, ANATOMOPATHOLOGICAL AND TOMOGRAPHIC ANALYSIS.

ABSTRACT

Calcium phosphate cements (CFC) have been used in the treatment of certain bone lesions, with different studies demonstrating their high biocompatibility and osteoconductivity. The aim of the present study was the evaluation of a bone cement made from a solid phase (β -tricalcium phosphate and calcium sulfate dihydrate) and a liquid one (phosphoric acid 2M) at a proportion of 1:1 in cranial bone defects in rabbits using clinical, surgical, hematological, anatomopathological and tomographic analysis. For such, a critical size defect of 15mm in diameter was made on the skull of the animals, where the bone cement was implanted while still moldable. The 33 rabbits operated were separated into 3 experimental moments according to the date of euthanasia (7, 28 and 90 days); 8 treated and 3 control animals were euthanized in each moment. The cement was moldable and of easy surgical manipulation, hardening in situ in the absence of heat. Hematological analysis showed the absence of systemic toxicity and no alterations on red and white blood cells. After euthanasia, skin and brain lesions were observed in treated group animals on the first two experimental moments, however, these lesions were not observed at 90 days, suggesting the biomaterial biocompatibility throughout the experimental moments. The analysis of the biomaterial pH while still moldable revealed a value under that of physiological environment (3.38). We believe that this low pH may be responsible for the described lesions on tissues adjacent to the biomaterial and that it may have occurred due to the high proportion of liquid:powder used (1:1). Tomographic analysis confirmed that the size of the defect was a critical one and suggested the growth of a tissue in it, although it was not possible to identify it. Therefore, we suggest modifications on the formulation of the cement to allow its clinical use.

Key words: clinical analysis, systemic toxicity, pH.

INTRODUÇÃO

A necessidade de tratar defeitos ósseos de diferentes etiologias, magnitudes e localizações tem estimulado a busca de biomateriais capazes de favorecer o crescimento ósseo. Estas características, dependentes das propriedades físicas e químicas do material, devem ser compatíveis com a fisiologia óssea (GAO *et al.*, 1995; OYELESE *et al.*, 2005). Assim sendo, o desenvolvimento de técnicas e materiais que possam substituir o tecido perdido, abreviando o tempo de consolidação óssea, é uma questão fundamental na resolução do problema (ANDRADE, 1997).

O uso de animais na pesquisa biomédica tem sido recomendado para o aperfeiçoamento e validação de procedimentos existentes, desenvolvimento de novos materiais e para compreender os diversos processos fisiológicos e patológicos (CARDOSO *et al.*, 2007). Um modelo animal de estudo considerado ideal para a reparação óssea deve atender aos pressupostos de ter um custo baixo, ser prontamente disponível, ser facilmente manipulado, anestesiado e possuir um volume de osso adequado (CALASANS-MAIA *et al.*, 2009). A escolha do modelo animal e do sítio cirúrgico adequado é fundamental para que as avaliações obtidas sejam confiáveis e possam mimetizar, de forma reprodutível, os possíveis efeitos dos biomateriais e/ou novas técnicas reconstrutivas em seres humanos (HOLLINGER e KLEINSCHMIDT, 1990). A calvária destaca-se entre as regiões ósseas onde são criados defeitos experimentais em animais, sendo utilizada há mais de um século no estudo de substitutos para o enxerto ósseo autógeno (TAKAGI e URIST, 1982).

Os cimentos de fosfato de cálcio (CFC) têm sido aplicados no tratamento de diversas de fraturas, pois diferentes estudos têm mostrado que são materiais altamente biocompatíveis e osteocondutores (MORAES *et al.*, 2004, THEISS *et al.*, 2005; LUVIZUTO *et al.*, 2012). Além dessas características, os CFC são atrativos para a reconstituição ou remodelação óssea pela facilidade de manipulação e moldagem, adaptando-se totalmente à forma da cavidade óssea, obtendo um íntimo contato entre o osso e o cimento desde os primeiros estágios da implantação e por não aquecerem durante o processo de endurecimento, evitando a necrose tecidual no sítio de implantação (DRIESSENS *et al.*, 1997; AMBARD e MUENINGHOFF

2006). A principal desvantagem dos cimentos de fosfato de cálcio é sua baixa resistência mecânica, que segundo Hench (1999) varia entre 2 e 12Mpa, semelhante ao osso trabecular, limitando assim a utilização desse material a regiões sujeitas a pequenas cargas, como o crânio. A presença de um material rígido que recubra o tecido nervoso exposto é desejável por promover sua proteção imediata contra impactos e contra as alterações hemodinâmicas oriundas da pressão atmosférica, que segundo Oyelese *et al.* (2005) e Han *et al.* (2008) são responsáveis pelas lesões cerebrais e disfunções neurológicas que frequentemente acometem pacientes submetidos a craniectomias.

Dentre os fosfatos de cálcio utilizados na produção dos cimentos ósseos, o β -fosfato de cálcio (β -TCP) têm se destacado por ser biocompatível, osteocondutor e por ter taxas de reabsorção mais adequadas a este tipo de aplicação, sendo parcialmente reabsorvido entre 6 e 15 semanas dependendo de sua porosidade. Desta forma, esse material atua como substituto temporário, sendo lentamente substituído por tecido ósseo novo (DRIESSENS *et al.*, 1998; KAWACHI *et al.*, 2000; THEISS *et al.*, 2005).

A biocompatibilidade refere-se à habilidade de um biomaterial realizar a função para qual foi criado, com relação a uma terapia médica, sem causar efeitos indesejados locais ou sistêmicos no paciente, mas gerando a resposta celular ou tecidual mais favorável naquela situação específica, otimizando o desempenho clínico daquela terapia (WILLIAMS, 2008). Quando se avalia biocompatibilidade, observa-se, dentre outros parâmetros a toxicidade sistêmica e possíveis alterações nas células sanguíneas da linhagem branca e vermelha. Essas análises são imprescindíveis para avaliar como o organismo se comporta em relação ao material de implante (KARLA *et al.*, 2006).

No processo de avaliação de possíveis alterações em células da linhagem branca ou vermelha, estão envolvidas as seguintes análises laboratoriais clínicas: leucograma (mensuração do número de leucócitos totais, segmentados, linfócitos, monócitos e eosinófilos) e eritrograma (contagem de hemácias, dosagem de hemoglobina, hematócrito, proteínas plasmáticas totais e plaquetas). A avaliação da toxicidade sistêmica envolve a mensuração das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT), aspartatoaminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA) e

provas de função renal, pela dosagem dos níveis plasmáticos de ureia e creatinina (ELEOTÉRIO, 2011).

Cimentos ósseos a base de β -TCP e uma solução aquosa de ácido fosfórico (H_3PO_4) têm sido testados (FRAYSSINET *et al.*, 1998; GROVER *et al.*, 2003), aonde após seu endurecimento tem-se a formação de fosfato de cálcio di-hidratado ($CaHPO_4 \cdot 2H_2O$), conhecido como brushita (BOHNER *et al.*, 1996; JUNCIONI, 2005). Xia *et al.* (2006) avaliaram a citotoxicidade de cimentos ósseos de brushita, formados a base de β -TCP e diferentes concentrações de H_3PO_4 1,5 – 3,5M em culturas de células precursoras de osteoclastos. Relataram que, aos sete dias, as menores taxas de mortalidade celular foram encontradas nas amostras obtidas a partir de H_3PO_4 2M.

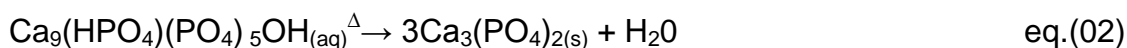
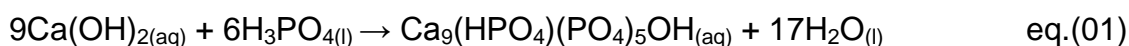
A tomografia computadorizada é uma técnica que utiliza radiação ionizante para a análise interna de corpos, consolidando-se como um método não destrutivo de diagnóstico não invasivo para a análise de resolução de densidade. Por isso, a maioria dos casos de cranioplastia em que se pretende reconstruir um crânio sob medida, a partir de imagens médicas, utiliza-se a tomografia como recurso mais apropriado. A avaliação da densidade tomográfica é baseada em uma escala de cinza, sendo sua unidade chamada Hounsfield (UH). Em relação às imagens, a escala de cinza é formada por espectro de representações de tonalidades entre branco, cinza e o preto. Os valores variam entre o preto (-1000 uh) onde o objeto não absorveu praticamente nenhum elétron, devido à baixa densidade e o branco (+1000 uh ou mais) onde o objeto absorveu quase todos os elétrons devido à elevada densidade (SOARES *et al.*, 2011).

O presente trabalho objetivou avaliar a utilização cirúrgica de um cimento ósseo de brushita formado a base de β -TCP através da observação de suas propriedades durante o procedimento cirúrgico, sua toxicidade local e sistêmica, através de observações macroscópicas do tecido em contato com o material e análises hematológicas e de bioquímica sérica. Além disso, avaliou-se a densidade tecidual no interior do defeito através da tomografia computadorizada. Espera-se que o material seja moldável, que seu endurecimento ocorra *in situ*, sem liberação de calor e que sua manipulação transcirúrgica seja de fácil realização. Espera-se também que não seja tóxico aos tecidos em contato direto e ao organismo.

MATERIAL E MÉTODOS

Biomaterial

O cimento ósseo utilizado no presente trabalho foi desenvolvido por Albuquerque (2012), sendo obtido a partir da mistura entre uma fase sólida composta por duas cerâmicas – β -fosfato tricálcico [$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] (β -TCP) e sulfato de cálcio di-hidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - gesso) e uma fase líquida - ácido fosfórico (H_3PO_4) 2M. O β -TCP foi obtido a partir da mistura das soluções de hidróxido de cálcio [$\text{Ca}(\text{OH})_2$], ácido fosfórico e ácido láctico ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$). A mistura obtida foi então sinterizada a uma taxa de aquecimento de $5^\circ\text{C}/\text{min}$, onde, após atingir a temperatura de 1200°C , foi mantida durante 1 hora, obtendo-se o β -fosfato tricálcico conforme as equações:



As proporções utilizadas de cada cerâmica utilizadas para composição da fase sólida não serão informadas ao longo do presente trabalho uma vez que a produção do cimento encontra-se em processo de patente.

Modelo experimental

O presente trabalho experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais da UFV número 116/11, sendo coordenado pela médica veterinária Andréa Pacheco Batista Borges, CRMV-MG 2772.

Foram utilizados 33 coelhos da raça Nova Zelândia, com peso médio de 3,5Kg e idade entre cinco e seis meses. Cada animal recebeu uma aplicação de ivermectina¹ na dose de 0,4 mg/Kg por via subcutânea, sendo acondicionado em gaiola individual, previamente higienizada com água corrente e desinfetada com fogo, onde permaneceram por dois meses para aclimação. Foi fornecido a cada um deles ração comercial e feno uma vez ao dia e água *ad libitum*.

¹ Ivermic®. Microsules. Porto Alegre, Brasil.

Os 33 animais foram divididos aleatoriamente em três momentos experimentais (Tabela 1) correspondentes a uma época de coleta, denominados MI, MII e MIII, onde cada momento avaliado foi composto por 8 animais tratados e 3 animais controle.

Tabela 1. Época do sacrifício dos coelhos submetidos ao procedimento cirúrgico dos grupos controle e tratado.

MOMENTO	ÉPOCA DE SACRIFÍCIO
Momento um (MI)	Sete dias
Momento dois (MII)	28 dias
Momento três (MIII)	90 dias

Coleta de sangue e análise hematológica

A coleta sanguínea para as análises hematológicas se deu em duas épocas, conforme tabela 2.

Tabela 2 - Períodos de coleta de sangue (X) para análises hematológicas e de bioquímica sérica dos coelhos submetidos ao procedimento cirúrgico dos grupos controle e tratado.

	(Pré-cirúrgico)	(sete dias)	(28 dias)	(90 dias)
MI	X	X		
II	X		X	
III	X			X

Após a contenção manual e posicionamento dos coelhos em decúbito lateral as amostras de sangue foram coletadas no plexo orbital, utilizando-se tubos de vidro de microhematócrito heparinizados. O material destinado ao hemograma e leucograma foi armazenado em tubo estéril com anticoagulante (EDTA). Posteriormente a realização do esfregaço sanguíneo e coloração das lamina pelas técnicas de hematoxilina-eosina foi realizada a contagem das células sanguíneas (leucócitos totais, neutrófilos segmentados – SEGM, linfócitos – LINF, eosinófilos – EOS, monócitos – MONO), com auxílio de um microscópio óptico OLYMPUS CX31

em aumento de 100x. Além disso, foi realizada a mensuração do hematócrito (HT), hemoglobina (HEMO), plaquetas (PLAQ), hemácias (HEMA) e proteínas plasmáticas totais (PROT) através de um equipamento automático (Humacount Plus Human). Comparou-se o resultado de cada grupo, em cada data de coleta, com seus próprios parâmetros observados antes da realização da cirurgia, onde os valores da mediana de cada variável foram confrontados com valores de referência disponíveis na literatura.

O material destinado à bioquímica sérica foi coletado em tubo estéril, sem a presença de anticoagulante, e submetido à centrifugação para obtenção do soro. A partir desse material foram mensuradas as enzimas hepáticas (alanina aminotransferase - ALT, aspartatoaminotransferase - AST e fosfatase alcalina - FA) bem como avaliada a função renal pela dosagem dos níveis plasmáticos de ureia e creatinina em equipamento automático (Humastar 300). Comparou-se o resultado de cada grupo em cada data de coleta com seus próprios parâmetros observados antes da realização da cirurgia, onde os valores da mediana de cada variável foram comparados aos valores de referência disponíveis na literatura. Aquelas variáveis que apresentaram valores diferentes das referências foram submetidas ao teste T pareado, comparando-se cada grupo em cada data de coleta com seus próprios parâmetros observados antes da realização da cirurgia e com valores de referência disponíveis na literatura. Quando os dados não apresentaram normalidade ou homogeneidade de variância, optou-se pelo teste de Wilcoxon. As análises foram realizadas no programa SigmaPlot 11.0 e foi considerado nível de significância de 5% para todos os testes.

Procedimento cirúrgico

Cada animal recebeu, imediatamente antes do procedimento, 20 mg/Kg de cefazolina² por via intravenosa como antibioticoterapia profilática. Para se realizar o procedimento cirúrgico os animais foram submetidos à anestesia geral. A indução anestésica se deu com propofol³ na dose de 6 mg/Kg por via intravenosa, a partir da cateterização da veia marginal do pavilhão auricular. Os animais foram intubados

²Cefazolina sódica – Aurobindo. Anápolis, Brasil.

³Propofol® – Eurofarma. São Paulo, Brasil.

com sonda endotraqueal nº 2,5 e mantidos anestesiados com isoflurano⁴, administrado por via inalatória, diluído em oxigênio 100% em quantidade suficiente para a realização do procedimento. A tricotomia abrangeu a porção dorsal do crânio, estendendo-se da base das orelhas até o processo supraorbital rostral, sendo as pálpebras superiores os limites laterais. A antissepsia seguiu o padrão adotado pelo Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (DVT-UFV) e os animais foram posicionados em decúbito esternal.

Foi realizada uma incisão retilínea na pele, no sentido caudo-rostral, com aproximadamente 4 cm de comprimento sobre a crista sagital externa, estendendo-se até a região interorbital. Após afastar lateralmente a pele foi realizada uma incisão de mesmo comprimento no periósteo, sendo este também afastado no sentido lateral, permitindo assim, a visualização do encontro entre a sutura coronal e sagital, ponto conhecido como bregma (Fig.1A). Um defeito de 15 mm de diâmetro foi demarcado na superfície óssea com uso de uma broca trefina⁵ conectada a uma perfuratriz elétrica⁶, na velocidade de 5000 rpm e irrigação contínua com solução fisiológica estéril. A trefina foi posicionada de tal forma que o bregma se encontrava no centro do defeito (Fig. 1B).

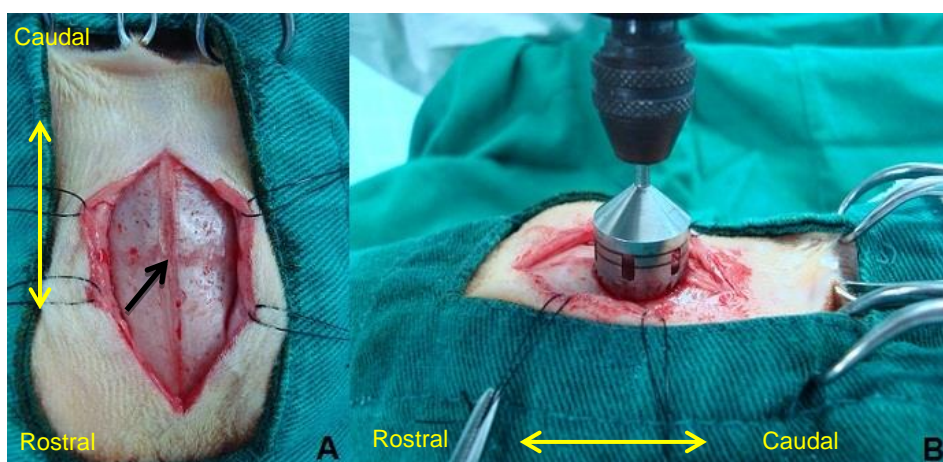


Figura 1. Procedimento cirúrgico para realização do defeito no crânio de coelho. A – Exposição do bregma (seta) após incisão de pele e periósteo. B – Demarcação do defeito crítico com auxílio da broca trefina.

⁴Isoflurano® - Cristália. São Paulo, Brasil.

⁵Trefina Dentoflex. São Paulo, Brasil.

⁶Perfuratriz Black & Decker RT 650. Towson, USA.

Em seguida, com o auxílio de um microscópio cirúrgico, foram utilizadas brocas de desbaste⁷ (Figura 2A) conectadas a mesma perfuratriz elétrica para desbastar o tecido ósseo, sob irrigação contínua com solução fisiológica estéril, até a exposição da dura mater em toda a extensão do defeito (Figura 2B). Para a obtenção do cimento, a fase sólida foi misturada à líquida, ambas previamente esterilizadas em autoclave a 120° durante sete minutos, em proporção de 1:1, em uma cuba de inox, com o auxílio de um bastão de vidro esterilizado, onde permaneceu por três minutos. O material formado, já com aspecto de um cimento moldável, foi depositado no interior do defeito de forma a cobri-lo em toda a sua extensão, sendo sua espessura limitada pela espessura do crânio de cada animal (Figura 2C).

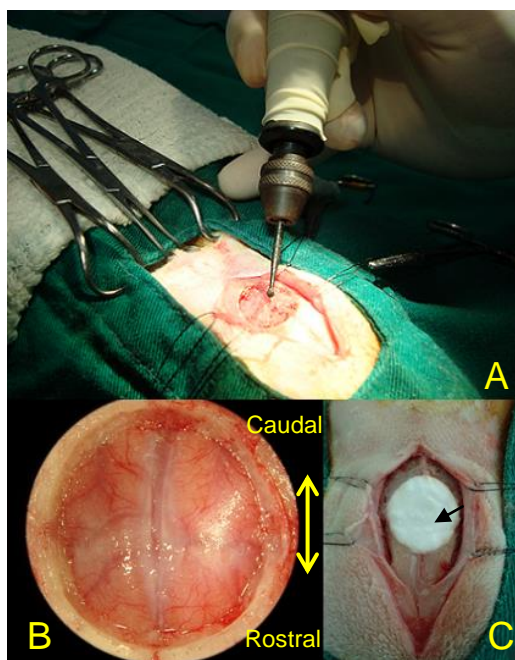


Figura 2. Confeção de defeito crítico em crânio de coelho. A – Broca de desbaste utilizada para remoção do tecido ósseo. B – Exposição de dura-máter ao longo de todo o defeito. C – Cimento ósseo (seta preta) posicionado no interior do defeito.

Foi realizado apenas um plano de sutura, uma vez que não foi possível a sutura do periósteo. A sutura da pele foi realizada em padrão colchoeiro com fio de náilon⁸. Todos os animais receberam no pós-operatório imediato 1 mg/Kg de morfina⁹ por via subcutânea, por dois dias com intervalo de 6 horas.

⁷KG Sorensen®.Medical Burs.Cotia.São Paulo, Brasil

⁸Nylon®. Shalon. Boa Vista, Brasil

⁹Dimorf®. Cristália LTDA. Itapira, Brasil.

O grupo controle foi submetido ao mesmo procedimento anestésico/cirúrgico bem como aos mesmos cuidados pós-operatórios, entretanto nenhum tipo de preenchimento foi realizado no defeito, permanecendo apenas o coágulo que normalmente é formado.

Para a análise da aplicação cirúrgica do cimento utilizado foram qualitativamente observados no transcirúrgico os aspectos de moldabilidade, manipulação, endurecimento *in situ* e liberação de calor, subjetivamente avaliado pelo contato manual.

Para avaliação clínica, os coelhos foram observados diariamente nos 10 primeiros dias após a cirurgia. A partir da retirada dos pontos (aos 10 dias após o procedimento cirúrgico), a avaliação clínica foi realizada semanalmente, até as eutanásias dos animais em seus respectivos momentos experimentais. Foram avaliadas, por um mesmo avaliador, a presença de reação inflamatória, deiscência e infecção do sítio cirúrgico. A inflamação foi qualitativamente avaliada com base na presença ou ausência de edema, a deiscência de sutura como presente ou ausente assim como a infecção da ferida cirúrgica, observada pela presença ou ausência de secreção purulenta no local.

Nos dias sete, 28 e 90 pós-cirúrgicos os animais dos momentos MI, MII e MIII respectivamente foram sacrificados com sobredoses de propofol e cloreto de potássio¹⁰, ambos por via intravenosa. Foram avaliados os aspectos macroscópicos da pele e do tecido nervoso que estiveram em contato direto com o cimento ósseo.

Para as análises tomográficas foi retirando um fragmento retangular de tecido ósseo craniano, contendo o defeito em seu interior. Todos os fragmentos retirados passaram por análise de tomografia computadorizada, juntamente com uma amostra de cimento ósseo não implantado (*in vitro*) com 15 mm de diâmetro e 2 mm de espessura. As amostras foram posicionadas, individualmente, no sentido horizontal em um aparelho de múltiplos detectores (multislices), com 16 canais helicoidais (General Electric High Speed Advantage scanner, GE Medical Systems Inc. Milwaukee, WI) de forma que os raios X do aparelho penetraram nos tecidos no sentido transversal, realizando uma média de 75 cortes por amostra.

Para determinar a densidade do tecido ósseo integro foram escolhidos, fora dos limites do defeito, dois pontos aleatórios em cada amostra de tecido ósseo

¹⁰ Kcl 10%. Isofarma. Precabura Eusébio, Brasil.

retirada do crânio dos animais totalizando 66 pontos. Foi obtido o valor da mediana das densidades para os pontos escolhidos. Uma área de 15 mm de diâmetro foi demarcada pelo aparelho, onde seu centro foi sobreposto ao bregma, de onde então foram obtidos os valores da densidade com base na escala de Hounsfield. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste ANOVA 2 - WAY, considerando tratamento e tempo como variáveis independentes, utilizando o teste Holm-Sidak quando o valor de $p < 0,05$, sendo as análises realizadas no programa SigmaPlot 11.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escolha da espécie animal utilizada no presente estudo baseou-se na experiência pessoal do grupo de pesquisa na utilização de coelhos da raça Nova Zelândia. Coelhos da raça Nova Zelândia brancos (*Orytolagus cuniculus*) são utilizados como modelo para experimentos de avaliação do crescimento craniofacial (CASTANEDA *et al.*, 2006; CARDOSO *et al.*, 2007). Como vantagens foram observadas a facilidade no manuseio pelo seu pequeno porte e por serem relativamente dóceis e a disponibilidade de informações básicas disponíveis sobre a espécie. Tais vantagens também foram relatadas por Calasans-Maia *et al.* (2009) em sua revisão sobre a utilização de coelhos como modelos experimentais para cirurgia.

A utilização da calvária para a realização do defeito ósseo deveu-se a sua pobre vascularização e relativa deficiência de medula óssea com relação a outros ossos. Para Dupoirieux *et al.* (2001) o pobre suprimento sanguíneo na região prejudica o processo de reparação espontânea, assim a análise dos resultados obtidos com o uso de um biomaterial na reparação óssea torna-se mais evidente. Ainda, a região escolhida está sujeita a pequenas forças mecânicas, condição necessária para a utilização de cimentos ósseos a base de fosfatos de cálcio.

Outro fator discutido na literatura é a localização do defeito na calvária. Neste trabalho, optou-se por realizar o defeito no centro por vários fatores, como: a ausência de interferência da musculatura da orelha, a disponibilidade de grande área óssea e a facilidade de acesso durante o trans-cirúrgico. Entretanto, é pertinente salientar que existem pesquisadores como Bosch *et al.* (1998) que contra indicam esta localização, devido ao risco de lesar durante a cirurgia a estrutura

anatômica vascular existente abaixo da sutura sagital e de introduzir o tecido conjuntivo proveniente da sutura óssea na avaliação da reparação óssea.

O procedimento cirúrgico empregado em estudos que envolvem craniectomias baseia-se na utilização de trefinas para a confecção do defeito ósseo, com a retirada do fragmento ósseo de forma íntegra (PAULO, 2009; OLIVEIRA, 2011; ZOU *et al.*, 2011). Como o tecido cerebral encontra-se imediatamente abaixo da região operada, é de se esperar que tal procedimento requeira um aprimoramento de técnica, pois, o mínimo erro culmina na incapacitação ou morte do animal envolvendo perda de um número elevado de animais. A técnica cirúrgica empregada no presente trabalho, apesar de não ser a rotineira, mostrou-se eficiente na criação do defeito craniano. A utilização do microscópio cirúrgico permitiu a manutenção da integridade das meninges e do tecido nervoso. Entretanto, destaca-se o grande tempo despendido em cada procedimento.

O cimento ósseo avaliado apresentou-se moldável e de fácil manipulação no trans-cirúrgico, adaptando-se adequadamente ao defeito, com endurecimento *in situ*, características compatíveis com as relatadas por Ambard e Mueninghoff (2006) para os biomateriais tipo cimentos. Essas características podem permitir a utilização do cimento avaliado em defeitos com grande complexidade geométrica, onde materiais em formatos pré-determinados teriam dificuldade na adequação ao local do implante (DRIESSENS *et al.*, 1997). Acredita-se que pela rigidez do cimento ósseo seco, tal material seja capaz de proteger o sistema nervoso de traumas mecânicos e da interferência da pressão atmosférica, que segundo Oyelese *et al.* (2005) e Han *et al.* (2008) são prejudiciais. Além disso, não foi percebida a liberação de calor durante o processo de endurecimento *in situ* do cimento, sendo esta propriedade também desejável para os cimentos ósseos (ALONSO, 2011), especialmente naqueles utilizados próximos a tecidos vitais como o nervoso.

Apesar da exposição das meninges para realização do defeito, não foram observadas alterações neurológicas durante o período pós-operatório, em ambos os grupos, e todos os coelhos permaneceram alertas, conscientes e deambulando normalmente.

Os valores das medianas das variáveis analisadas nos hemogramas e nas contagens diferenciais das células da linhagem branca estão indicados nas tabelas 3 e 4 respectivamente.

Tabela 3. Valores das medianas para as variáveis da linhagem vermelha e proteína total dos coelhos submetidos ao procedimento cirúrgico dos grupos controle e tratado

Grupos		Hemácias (x 10 ⁶ /mm ³)		Hemoglobina (g/dL)		Hematócrito (%)		Proteína total (g/dL)		Plaquetas (x 10 ³ /mL)	
		Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
Controle	MI	5,8	5,9	12,9	12,9	37,3	38,2	7,0	7,6	342	387
	MII	4,9	5,0	11,5	12,5	34,2	35,9	6,8	7,4	214	270
	MIII	4,8	6,8	12,2	14,1	34,2	43,8	6,8	7,0	269	319
Tratado	MI	6,2	5,5	13,5	12,3	40,2	36,3	7,2	7,0	295	303
	MII	6,0	5,7	13,6	12,8	39,3	38,5	7,4	7,0	320	269
	MIII	5,8	6,2	13,2	13,6	38,4	42,7	7,4	7,4	246	212
V.R ¹		4-8		8-17,5		30-50		5,4-7,5		290-650	
V.R ²		5,1-7,9		10-17,4		33-50		5,4-8,3		250-650	

V.R¹. Valores de referência para a espécie, segundo Carpenter , 2010.

V.R². Valores de referência para a espécie, segundo Brito *et al.*, 2004.

Tabela 4. Valores das medianas para as variáveis da linhagem branca dos coelhos submetidos ao procedimento cirúrgico dos grupos controle e tratado

		Leucócitos (/mm ³)		Segmentados (%)		Linfócitos (%)		Monócitos (%)		Eosinófilos (%)	
		Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
Controle	MI	7500	5800	29,0	47,0	56,0	33,0	9,0	5,0	3,0	1,0
	MII	6600	7300	35,0	37,0	53,0	55,0	5,0	8,0	2,0	2,0
	MIII	8900	8300	26,0	32,0	61,0	59,0	6,0	9,0	2,0	3,0
Tratado	MI	5950	5950	32,5	35,0	57,0	59,0	7,5	6,5	2,5	1,5
	MII	5300	4600	41,0	33,0	52,0	58,0	4,0	8,0	4,0	3,0
	MIII	8000	7350	29,0	37,5	63,5	50,0	3,5	7,0	2,0	3,0
V.R ¹		5000-12000		35-55		25-50		2-10		0-5	
V.R ²		5.200-12.500		20-75		30-85		1-4		1-4	

V.R¹. Valores de referência para a espécie, segundo Carpenter , 2010

V.R². Valores de referência para a espécie, segundo Brito *et al.*, 2004.

Observam-se valores das medianas dentro da referência da espécie para as variáveis da linhagem vermelha e da linhagem branca, após comparação dos valores obtidos para cada uma das variáveis, no pré e pós-cirúrgico.

A tabela 5 indica os valores da mediana das variáveis utilizadas na avaliação do perfil renal e hepático.

Tabela 5. Valores das medianas da bioquímica sérica dos coelhos submetidos ao procedimento cirúrgico dos grupos controle e tratado

Grupos		Ureia		Creatinina		ALT		AST		FA	
		Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
Controle	MI	33*	40*	1,2	1,0	134*	178*	44	76	144	284*
	MII	50*	47*	1,2	1,1	69	90*	41	45	139	201*
	MIII	42*	44*	1,2	1,2	106*	78*	42	30	210*	148*
Tratado	MI	39*	33*	1,3	1,1	119*	113*	53	34	195*	191*
	MII	43*	41*	1,3	1,1	84*	117*	44	49	153*	196*
	MIII	45*	48*	1,4	1,4	116*	119*	46	59	151*	158*
V.R ¹		15-30		0,8-2,5		14-80		14-113		15-30	
V.R ²		13-29		X		40-80		14-113		70-145	

V.R¹. Valores de referência para a espécie, segundo Carpenter , 2010.

V.R². Valores de referência para a espécie, segundo Brito *et al.*, 2004.

* Parâmetros acima dos valores de referência para a espécie segundo a literatura consultada.

Os resultados dos perfis hepático e renal demonstraram valores dentro da referência da espécie para as variáveis creatinina e AST e valores acima para as variáveis ureia, ALT e FA. As variáveis que apresentaram valores fora da referência, foram submetidas ao teste T pareado e quando não apresentaram normalidade ou homogeneidade de variância, optou-se pelo teste de Wilcoxon. Os resultados estatísticos indicaram que houve diferença apenas para os valores de ureia ($p=0,008$) no grupo tratado de MI, havendo uma diminuição desses valores nesse grupo quando comparado ao controle. As demais variáveis, apesar de estarem acima dos valores de referência não apresentaram diferenças estatísticas entre grupo controle e tratado. Acredita-se que fatores como alimentação, o estresse da manipulação diária e o ambiente podem ser responsáveis por essas variações prévias ao tratamento. Com base nos resultados laboratoriais pode-se concluir que o biomaterial não apresentou toxicidade sistêmica e não causou alterações nas células da linhagem vermelha e branca.

Ao exame macroscópico do local da implantação do biomaterial foi observada na pele dos animais tratados, ao final da primeira semana pós-operatória, uma área circular, hiperêmica, com diâmetro variável, exatamente sobre o local onde o cimento ósseo havia sido implantado. A evolução desse achado ocorreu de duas formas distintas: houve a redução da hiperemia, não havendo mais sinais de alterações locais no momento da eutanásia (Figura 3) ou houve o aumento da hiperemia, com crescimento da lesão, culminando, em oito animais, no

aparecimento de áreas circulares enegrecidas, sugestivas de necrose da pele, visualizadas no momento da eutanásia (Figura 4). Os animais do M1 apresentaram hiperemia discreta da pele sobre o implante, entretanto não ficou evidenciada a presença de alterações sugestivas de necrose e nem foi observada a resolução das lesões existentes, talvez pela data da eutanásia, impedindo a possível evolução ou a resolução das lesões. Os animais do MII apresentaram as duas formas de evolução da lesão, entretanto o tempo transcorrido até a data da eutanásia não foi suficiente para que houvesse a resolução da necrose de pele. Esta afirmação se confirma pelos os animais do MIII, que também apresentaram as duas formas de evolução, mas que devido ao maior tempo decorrido apresentaram resolução completa das lesões ao término da avaliação.

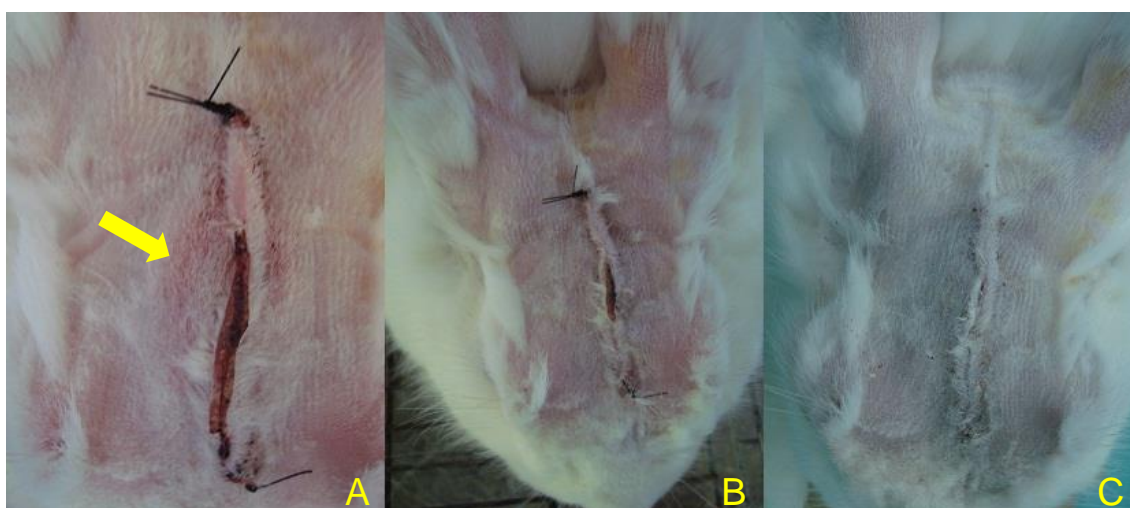


Figura 3. Fotografia representando a resolução macroscópica da lesão de pele em um animal tratado, aos 28 dias de pós-operatório. A – Notar a presença de área discretamente hiperêmica, circular, com diâmetro semelhante ao do cimento ósseo implantado (seta) aos seis dias de pós-operatório em um coelho do MII. B e C – Notar a resolução da lesão, não sendo mais observada a área hiperêmica aos dez dias de pós operatório e no momento da eutanásia respectivamente.

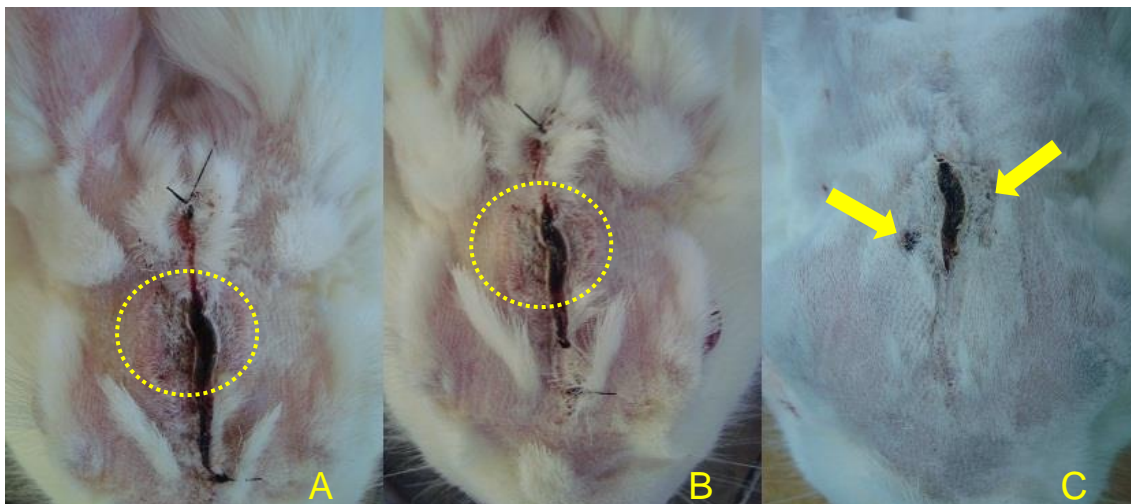


Figura 4. Fotografia representando a evolução macroscópica da lesão de pele em animal do grupo tratado, aos 90 dias de pós-operatório. A e B – Notar a presença de área hiperêmica com discreto enegrecimento, circular, com diâmetro semelhante ao do cimento ósseo implantado (círculos) aos seis e dez dias de pós operatório respectivamente. C – Presença de pontos enegrecidos no local, sugestivos de necrose (setas), no momento da eutanásia.

Ao exame macroscópico do tecido nervoso foram observadas lesões macroscópicas na região dorsal do cérebro ou sinais de sua cicatrização em todos os animais tratados no estudo. Em todos os oito animais tratados de MI foram visualizadas, na superfície cerebral, áreas circulares com diâmetros semelhantes aos do cimento ósseo, de coloração esverdeada e com vasos sanguíneos congestos (Figura 5 A). Em MII e MIII todos os animais apresentaram alterações no local do implante do cimento ósseo, contudo o tecido de coloração esverdeada deu lugar a um tecido de cor branca, com aspecto cicatricial, onde não se observou macroscopicamente a presença de vasos sanguíneos (Figura 5 B e C). Os animais dos grupos controle não apresentaram alteração da coloração cerebral na região operada em nenhum dos momentos experimentais (Figura 5 D, E e F). Apesar das alterações macroscópicas no tecido nervoso dos animais do estudo não foram observadas alterações neurológicas, e todas as coelhas permaneceram alertas, conscientes e deambulando normalmente.

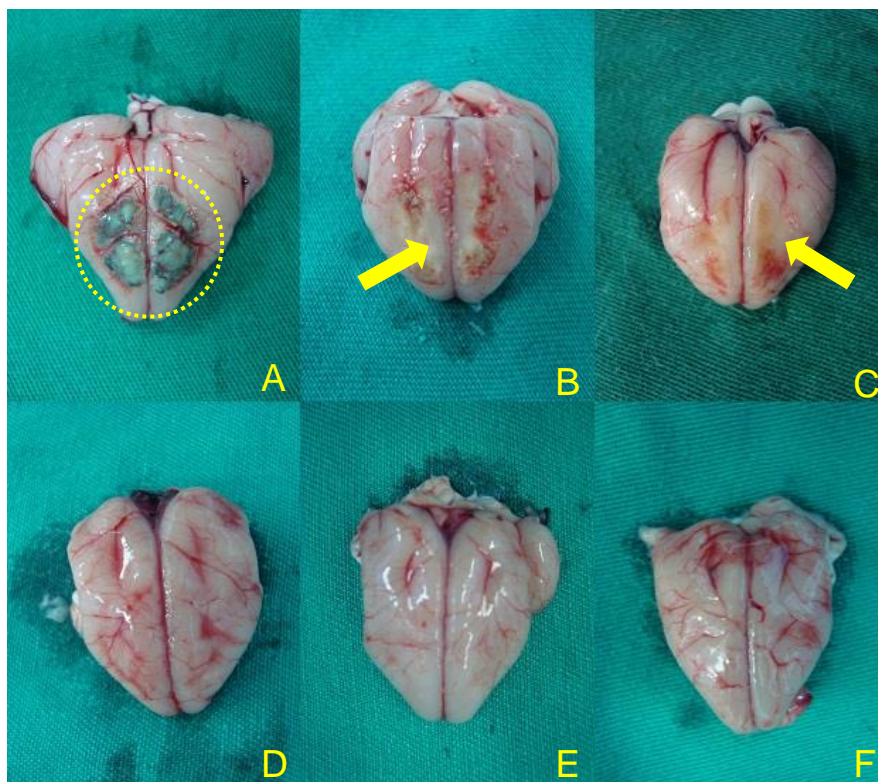


Figura 5. Fotografia do cérebro de animal do grupo tratado com o cimento ósseo a base de β -TCP e de animal do grupo controle. A, B, C - cérebro dos animais dos grupos tratados do MI, MII e MIII respectivamente. A - Notar alteração local (círculo) com formato semelhante ao do cimento ósseo, de coloração esverdeada com congestão vascular. Em B e C notar mudança da coloração do tecido, com a formação de um tecido com aspecto cicatricial, onde não foram visualizados macroscopicamente os vasos sanguíneos (seta). D, E, F. - cérebro dos animais dos grupos controle do MI, MII, e MIII respectivamente, onde não foram observadas as alterações encontradas no grupo tratado.

A localização, o formato e o tamanho das lesões, condizentes com os do cimento utilizado e a ausência de alterações semelhantes no grupo controle levantou a possibilidade da participação do biomaterial no processo. Pelo caráter agudo das lesões, suspeitou-se que as alterações pudessem estar ocorrendo no momento da implantação do material, e o primeiro passo foi verificar o pH do cimento ainda moldável. Para essa análise foram obedecidas todas as orientações do fabricante para a mistura dos componentes. Após 3 minutos, o cimento ainda moldável foi completamente diluído em 30 ml de água destilada e, com auxílio de um peagâmetro, seu pH foi mensurado, chegando-se a um valor de 3,38. O valor do pH encontrado é inferior a faixa de 6,5 – 8,5 relatada por Driessens et al. (1997) como ideal para os cimentos ósseos, durante e após a implantação, para evitar os efeitos citotóxicos.

O baixo valor de pH encontrado pode ter relação direta com a proporção de líquido/pó utilizada na preparação do cimento ósseo. No presente estudo foi utilizada uma relação líquido/pó de 1:1, diferente da utilizada por Xia *et al.* (2006). Estes autores, utilizando uma relação líquido/pó de 0,57 relataram as menores taxas de mortalidade celular *in vitro* nas amostras obtidas a partir de H₃PO₄ 2M. Sendo assim, acredita-se que as lesões encontradas no exame anatomopatológico ocorreram devido ao excesso de ácido utilizado para a preparação do cimento ósseo que, ao não reagir totalmente com a fase sólida, reduziu o pH do biomaterial no momento da sua implantação.

Análise por Tomografia computadorizada

A reconstrução em três dimensões (3D) das imagens tomográficas das amostras do tecido ósseo craniano retirado dos coelhos está demonstrada na figura 6. Como as imagens dos animais do segundo momento experimental foram perdidas no banco de dados do tomógrafo elas não serão apresentadas.

Na imagem tomográfica das amostras do grupo controle aos sete dias (Figura 6A) a coloração escura observada no interior do defeito indica que o tecido presente nesse local possui baixa densidade, não sendo detectado pelo tomógrafo, permanecendo o defeito com diâmetro semelhante ao inicial. Na imagem 6B (grupo tratado aos sete dias) observa-se o preenchimento do defeito por material com densidade semelhante a do tecido ósseo, observada pela coloração homogênea na região. Acredita-se que esse material seja o cimento ósseo, pelo tempo transcorrido da sua implantação até a análise. Não foram observados indícios de absorção ou migração do biomaterial, sugeridas pela uniformidade da coloração no local. Observar na figura 6C (grupo controle aos 90 dias) a redução do diâmetro do defeito devido ao aparente crescimento de tecido ósseo. Acredita-se que as regiões de cor preta observadas no interior do defeito tenham sido preenchidas por tecido conjuntivo, que pela baixa densidade não são detectados pelo tomógrafo. O preenchimento de um defeito ósseo por tecido conjuntivo, de tal forma que esse impeça a reparação óssea completa, caracteriza, segundo Schmitz e Hollinger (1986), um defeito de tamanho crítico. Na figura 6D (grupo tratado aos 90 dias) nota-se alteração de coloração na região do defeito ósseo bem como a presença de pontos pretos no interior do defeito, sugerindo uma possível absorção do biomaterial.

Devido a semelhança entre as densidades do tecido ósseo (1310 UH) e do biomaterial (1357 UH) não foi possível a diferenciação entre o biomaterial implantado e um possível crescimento de tecido ósseo novo, pois ambos se apresentaram nas imagens com mesma coloração.



Figura 6. Reconstrução em três dimensões das imagens tomográficas das amostras de tecido ósseo retirado do crânio dos coelhos. A e B - Face externa de amostras de tecido ósseo retirados do crânio de coelhos do grupo controle e tratado, respectivamente, aos sete dias. C e D - Face externa de amostras de tecido ósseo retirados do crânio de coelhos do grupo controle e tratado, respectivamente, aos 90 dias.

A tabela 6 indica a média e os desvios padrão das densidades em UH do material retirado do crânio dos coelhos dos grupos controle e tratado ao longo dos momentos experimentais.

Tabela 6. Médias e desvios padrão das densidades em UH dos grupos controle e tratado nos momentos experimentais MI, MII e MIII

	Densidade (UH)			Valores de p		
	MI	MII	MIII	MI-MII	MI-MIII	MII-MIII
Controle (C)	-183,45 (±102,4)	-60,32 (±2,5)	-7,43 (±29)	0,41	0,23	0,71
Tratado (T)	985,05 (±213,1)	692,09 (±186,7)	427,85 (±179,3)	0,003*	< 0,001*	0,006*
Valores de P Controle x tratado	< 0,001*	< 0,001*	0,001*			

* Houve diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste ANOVA. C – grupo controle. T - grupo tratado.

Densidade do tecido ósseo - 1310 UH

Densidade do biomaterial -1357

A análise revelou que houve aumento dos valores das médias das densidades na região do defeito ósseo no grupo controle entre sete, 28 e 90 dias sem haver, contudo, diferença estatística entre os três momentos, conforme tabela 6. Com base no princípio da escala Hounsfield (UH), onde materiais de baixa densidade apresentam coloração mais escura, é possível afirmar que existe uma menor quantidade de tecido no interior do defeito ósseo aos sete dias comparado aos 28, que apresentou menor quantidade do que aos 90 dias, entretanto, conforme já relatado, não foi possível identificar o tipo de tecido presente no interior do defeito em cada momento.

A tomografia também revelou uma diminuição das médias das densidades na região do defeito ósseo nos animais dos grupos tratados, ao longo do tempo, com diferenças estatísticas entre os momentos experimentais, como pode ser observado na tabela 6. A densidade do cimento ósseo antes de sua implantação, obtida a partir da escala de cinza, foi 1357 (UH). Com esse dado é possível sugerir a absorção do cimento ósseo ao longo do tempo, visto que todos os valores das médias das densidades obtidos para o grupo tratado decrescem ao longo do tempo.

Ainda de acordo com a tabela 6, foi observada diferença estatística entre as médias das densidades entre os grupos controle e tratado em cada momento experimental, sendo esse resultado esperado pela presença do cimento ósseo até a última observação, já que segundo Kawachi et al. (2000) este material é apenas parcialmente reabsorvido em 15 semanas após implantação. Apesar do valor das médias das densidades ósseas no local do defeito ser inferior ao do tecido ósseo íntegro (1310 UH) em todos os momentos experimentais, a presença do biomaterial exerce função mecânica protetora ao tecido nervoso. Essa característica é importante visto que a exposição desse tecido gera, ao longo do tempo, altos índices de lesões cerebrais e disfunções neurológicas (HAN *et al.*, 2008).

CONCLUSÕES

O cimento ósseo avaliado é moldável, de fácil manipulação transcirúrgica e tem seu endurecimento *in situ* com ausência de liberação de calor.

O biomaterial não causa toxicidade sistêmica nem alterações nas células da linhagem vermelha e branca.

PERSPECTIVAS

O cimento ósseo avaliado apresentou características desejáveis para a utilização *in situ*, entretanto são necessárias modificações em sua formulação. Sugere-se a redução da relação líquido/pó para permitir a completa reação do ácido com a fase sólida, elevando pH, não ocasionado assim as alterações anatomopatológicas macroscópicas acima descritas.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, J.S.V. **Produção de biocimentos de apatitas nanométricas aplicados como sistema de liberação controlada de fármacos.** 2012. 221f. Tese (Doutorado em engenharia e ciência de materiais) – Departamento de engenharia metalúrgica e de materiais, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

ALONSO, L.M. **Avaliação de cimentos ósseos de fosfato de cálcio com adições de aluminato e silicato de cálcio.** 2011. 175f. Tese (Doutorado em engenharia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

AMBARD, A.J.; MUENINGHOFF, L. Calcium Phosphate Cement: Review of Mechanical and Biological Properties. **Journal of Prosthodontics**.v.15, n.5, p.321-328, 2006.

ANDRADE, J.C.T. **Osteointegração de corpos cerâmicos densos e porosos de hidroxiapatita em cavidades produzidas do fêmur do rato.** 1997. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- BOHNER, M.; LEMAITRE, J.; RING, T.A. Effects of sulphate, pyrophosphate and citrate ions on the physiochemical properties of cements made of b-tricalcium phosphate-phosphoric acid-water mixtures. **Journal of the American Ceramics Society**.v.79, p. 1427–1427, 1996.
- BOSCH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. **Journal of Craniofacial Surgery**.v.9, p.310-316, 1998.
- BRITO, M.T.V. Caracterização de um modelo experimental de hipertensão portal. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v.99, p.199-205, 2004.
- CALASANS-MAIA, M.D.; MONTEIRO, M.L.; ÁSCOLI, F.O.; GRANJEIRO, J.M. The rabbit as an animal model for experimental surgery. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.24, n.4, p.325-328, 2009.
- CARDOSO, E.S.; CANÇADO, R. P.; HEITZ, C.; GERHARDT DE OLIVEIRA, M. Estudo exploratório do emprego de coelhos brancos da Nova Zelândia (*Orytolagus cuniculus*) como modelo animal na avaliação dos padrões de crescimento craniofacial. **Revista Odonto Ciência**. v. 22, n.55, p.66-71, 2007.
- CARPENTER, J.W. **Formulário de Animais Exóticos**. Terceira edição. São Paulo: MedVet, 2010.
- CASTANEDA, S.; LARGO, R.; CALVO, E.; RODRIGUEZ –SALVANES, F.; MARCOS, M.E.; DIAZ-CURIEL M.; HERRERO-BEAUMONT, G. Bone mineral measurements of subchondral ant trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits. **Skeletal Radiology**.v.35, n.1, p.34-41, 2006.
- DRIESENS, F.C.M.; FERNÁNDEZ, E.; GINEBRA, M.P.; BOLTONG, M.G.; PLANELL, J.A. Calcium phosphates and ceramic bone cements vs acrylic cements. **Anales de Química Internacional**. v. 93: p. S38-S43, 1997.
- DRIESENS, F.C.M.; BOLTONG, M.G.; DE MAEYER, E.A.P.; VERCRUYSSSE, C.W.J.; WENZ, R.; VERBEECK, R.M.H. IN: LEGEROS, R.Z.; LEGEROS, J.P. **Bioceramics** In: 11th International Symposium on Ceramics in Medicine, 11., New York, World Scientific Publishing, 1998 p. 231-233.
- DUPOIRIEUX, L.; POURQUIER, D.; PICOT, M.C.; NEVES, M. Comparative study of three diferente membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v.30, p.58-62, 2001.

ELEOTÉRIO, R.B. **Efeito do sulfato de condroitina e glucosamina na reparação de defeitos osteocondrais experimentais no côndilo femoral de cão.** 2011. 145f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Veterinária – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FRAYSSINET,P.; GINESTE, L.; CONTE, P.; FAGES, J.; ROUQUET, N. Short-term implantation effects of a DCPD-based calcium phosphate cement. **Biomaterials.** v.19, p.1971-1977,1998.

GAO, T.J.; LINDHOLM, B.; KOMMONEN, P.; RAGNI, P.; PARONZINI, A.; LINDHOLM, T.C. Microscopic evaluation of bone implant contact between hydroxyapatite, bioactive glass and tricalcium phosphate implant in sheep diaphyseal defects. **Biomaterials**, v.16, p.1175-1179, 1995.

GROVER, L.M.; KNOWLES, J.C.; FLEMING, G.J.P.; BARRALET, J.E. In vitro ageing of brushite calcium phosphate cement. **Biomaterials.**v.24, p.4133-4141, 2003.

HAN, P.Y.; KIM, J.H.; KANG, H.I.; KIM, J.S. “Syndrome of the Sinking Skin-Flap” Secondary to the ventriculoperitoneal shunt after craniectomy. **Journal of Korean neurosurgical society.**v.43, p.51-53, 2008.

HENCH, L.L.; WILSON, J. **An introduction to bioceramics.**v. 1, London, World Scientific, 1999.

HOLLINGER J.O.; KLEINSCHMIDT, J.C. The Critical Size Defect as an Experimental Model To Test Bone Repair Materials. **Journal of Craniofacial Surgery.**v.1, n.1, p.60-68, 1990.

JUNCIONI, B.C. Hidrólise de cimento de fosfato de cálcio de DCPD para obtenção de HÁ. In: Congresso Brasileiro de Cerâmica, 49^o, 2005, São Pedro. **Anais eletrônicos.** São Pedro: Universidade Federal de São Carlos, 2005. Disponível em: <http://www.ipen.br/biblioteca/cd/cbc/2005/artigos/49cbc-16-14.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2012.

KARLA, R.P. Hemocompatibilidade da liga candidata a biomaterial: Ti-Si-B. In: 17^o CBECIMat - **Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais**, Foz do Iguaçu, PR, Brasil, 2006. p. 4630 – 4639.

KAWACHI, E.Y., BERTRAN, C.A., REIS, R.R., ALVES, O. L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v.23, n.4, p.518-522, 2000.

LUVIZUTO, E.R.; QUEIROZ, T.P.; MARGONAR, R.; PANZARINI, S.R.; HOCHULI-VIEIRA, E.; OKAMOTO, T.; OKAMOTO, R. Osteoconductive Properties of alfa-TricalciumPhosphate

Matrix, Polylactic and Polyglycolic Acid Gel, and Calcium Phosphate Cement in Bone Defects. **Journal of Craniofacial Surgery**.v.23, n.5, p.e430-e433, 2012).

MORAES, P.C.; FILHO, J.G.P.; CANOLA, J.C.; SANTOS, L.A.; MACORIS, D.G.; ALESSI, A.C.; CASTRO, M.B.; NETO, F.A.D. Biocompatibilidade do cimento de fosfato de cálcio implantado no rádio de coelhos. **Acta Cirúrgica Brasileira**.v.19, n.4, p.351-359, 2004.

OLIVEIRA, L.C. **Influência do enxerto de tecido adiposo autógeno no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico: estudo histológico e histomorfométrico em calvária de coelhos** 2011. 68f. Dissertação (Mestrado em odontologia clínica) – Universidade Positivo.Curitiba.

OYELESE, A.A.; STEINBERG, G.K.; HUHN, S.L.; WIJMAN, C.A. Paradoxical herniation secondary to lumbar puncture after decompressive craniectomy for a large space-occupying hemisphere stroke: case report. **Neurosurgery**.v. 57,n.3, p.E594, 2005.

PAULO, A.O. **Terapia de defeito crítico em crânio de ratos pela associação de xenoenxerto bovino e células derivadas de periósteo autógeno**.2009. 116f. Tese (Doutorado em endodontia) – Universidade Estadual Paulista. Araraquara.

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

TAKAGI, K.; URIST, M.R.The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects.**Annals of Surgery**.v.196, n.1, p.100-109, 1982.

THEISS, F.; APELT, D.; BRAND, B.; KUTTER, A.; ZLINSZKY, K.; BOHNER, M.; MATTER, S.; FREI, C.; AUER, J.A.; RECHENBERG, B. Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. **Biomaterials**.v.26, p.4383-4394, 2005.

SOARES, M.G.; TANAKA, J.L.O.; DAVID, S.M.N.; DAVID, A.F.; MORAES, M.E.L.; MEDICI-FILHO, E. Tomografia convencional, computadorizada e computadorizada volumétrica com tecnologia cone beam. In:**Radiologia e Inovação**, 2011. Disponível em: <<http://radiologiaeinovacao.wordpress.com>>. Acesso em 05 jan..2013.

WILLIAMS, D.F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**. v.29, n.20, p. 2941 – 2953, 2008.

ZOU, D.; ZHANG, Z.; HE, J.; ZHU, S.; WANG, S.; ZHANG, W.; ZHOU, J. XU, Y. *et al.* Repairing critical-sized calvarial defects with BMSCs modified by a constitutively active form

of hypoxia-inducible factor-1 α and a phosphate cement scaffold. **Biomaterials**.v.32, p.9707-9718, 2011.

XIA, Z.; GROVER, L.M.; HUANG, Y.; ADAMOPOULOS, I.E.; GBURECK, U.; TRIFFITT, J.T.; SHELTON, R.M.; BARRALET, J.E. In vitro biodegradation of three brushite calcium phosphate cements by a macrophage cell-line. **Biomaterials**.v.27, p.4557-4565, 2006.

CAPÍTULO IV

CIMENTO A BASE DE β -FOSFATO TRICÁLCICO EM DEFEITOS ÓSSEOS CRIADOS NO CRÂNIO DE COELHOS - AVALIAÇÕES POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X E HISTOLÓGICAS.

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar a utilização de um cimento ósseo a base β -fosfato tricálcico (β -TCP), em defeitos ósseos de tamanho crítico no crânio de coelhos. Foi realizado um defeito ósseo de 15 mm no crânio de coelhos, onde foi implantado o cimento ósseo ainda moldável. Os 33 coelhos operados foram separados em três momentos experimentais de acordo com o tempo até sua eutanásia (sete, 28 e 90 dias), sendo cada momento composto por oito animais tratados e três controles. Após a eutanásia foram retiradas amostras de tecido ósseo craniano contendo o defeito e encaminhadas a análises. Duas amostras dos animais tratados, em cada momento, foram analisadas por difração de raios X (DRX), sendo previamente desintegrado em almofariz de porcelana até assumir aspecto farináceo para análise por um difratômetro. Foi avaliada a alteração de cristalinidade do biomaterial no decorrer do tempo. Em seguida, as amostras restantes foram processadas conforme técnicas rotineiras para realização da análise histológica. A DRX revelou a redução da cristalinidade do biomaterial ao longo do tempo e sua substituição por materiais orgânicos de baixa cristalinidade. A histologia revelou a osteocondutividade do biomaterial, sua capacidade de se integrar ao tecido ósseo e a possível participação celular em sua absorção. Entretanto, as alterações causadas no momento de sua implantação aparentemente retardaram o início da formação de tecido ósseo novo, culminando em uma menor produção óssea aos 90 dias, comparando-se ao grupo controle. Conclui-se que o material é absorvido *in vivo*, osteocondutor e osteointegrável.

Palavras-chave: biocompatibilidade, reparação óssea, osteocondução.

B-TRICALCIUM PHOSPHATEBASEDCEMENT IN CRANIAL BONE DEFECTS OF RABBITS – X-RAY DIFFRACTION AND HISTOLOGICAL ANALYSIS.

ABSTRACT

The objective of the present work was to evaluate the use of a bone cement based on β -tricalcium phosphate(β -TCP), in critically sized-bone defects in the skull of rabbits. A 15mm diameter defect was made on the skull of the animals, where bone cement was implanted while still moldable. The 33 rabbits operated were separated into 3 experimental moments according to the date of euthanasia (7, 28 and 90 days); 8 treated and 3 control animals were euthanized in each moment. After the animals' euthanasia in each experimental moment, samples containing the defect and cranial bone tissue were collected. Two samples of treated group animals were directed to X-ray diffraction (DRX), being previously disintegrated in porcelain mortar to powder and then analyzed in a diffractometer. The alteration in the biomaterial crystallinity was evaluated through time-points. Ultimately, 27 samples were processed according to routine techniques for histological analysis. Bone formation from the biomaterial was evaluated, as well as its absorption and cellular aspects at the cement/bone tissue interface. DRX showed a reduction in the crystallinity of the biomaterial and the possible replacement of it for organic material of low crystallinity. Histology revealed the biomaterial osteoconductivity, its capacity to integrate to bone tissue and a possible participation of cells during its absorption. However, alterations caused in the moment of its implantation have delayed the beginning of bone formation, resulting in an apparent lower bone production at 90 days, comparing to control group. It can be concluded that the material is degraded in vivo and that it is osteoconductive and integrates to bone tissue.

Key words: biocompatibility, bone regeneration, osteoconduction

INTRODUÇÃO

Cimentos ósseos formulados a partir de fosfatos de cálcio (CFC) foram desenvolvidos (GROVER *et al.*, 2006; XIA *et al.*, 2006) e testados para a reparação de defeitos ósseos (CHEN *et al.*; 1998; THEISS *et al.*, 2005), merecendo destaque por serem osteocondutores e biocompatíveis. Os principais produtos obtidos a partir da interação entre os componentes utilizados para obtenção dos CFCs são: a apatita deficiente em cálcio $[\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}]$ e a brushita $[\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$. A maioria dos estudos tem se dedicado a cimentos de apatita devido a três motivos: (i) a apatita é a fase de fosfato de cálcio presente no tecido ósseo, (ii) os cimentos de apatita são mecanicamente mais favoráveis e (iii) ao contrário do cimentos de brushita, os cimentos de apatita tem sua reação em pH próximo ao fisiológico (LEMAITRE, 1995; BOHNER, 2000). Entretanto, a brushita é mais solúvel do que a apatita em condições fisiológicas e, conseqüentemente, tem demonstrado ser mais rapidamente absorvida após sua implantação em modelos animais (KLEIN *et al.*, 1985, APELT *et al.*, 2004). Dessa forma, tal característica permite que sua absorção seja intimamente seguida pelo crescimento de tecido ósseo novo (CONSTANZ *et al.*, 1997).

Segundo Theiss *et al.* (2005) a absorção de cimentos ósseos de brushita ocorre a partir da dissolução do biomaterial nos fluidos extracelulares e pela ação direta de macrófagos. A absorção desse biomaterial através da dissolução em meio fisiológico foi avaliada *in vitro* por Grover *et al.* (2006) em seu estudo do comportamento desse biomaterial em solução salina tamponada e soro fetal bovino. Os autores relataram que o processo envolve a erosão, a fragmentação e por fim a dissolução nos fluidos adjacentes, com liberação de íons cálcio e fosfato para o meio. A absorção dos cimentos ósseos de brushita *in vivo*, segundo Apelt *et al.* (2004) ocorre através de mecanismos celulares, principalmente através de macrófagos. Esses, quando não se deparam com partículas suficientemente pequenas para serem fagocitadas individualmente se fundem, formando células conhecidas como células multinucleadas (HAM, 1972).

A absorção dos cimentos ósseos ou de diferentes biomateriais osteocondutores deve ocorrer paralelamente à reparação do tecido ósseo. Gosain *et al.* (2003) comprovaram que nos defeitos ósseos cranianos há a participação direta dos tecidos moles adjacentes no processo da reparação. Os autores

avaliaram o efeito do isolamento da dura-máter e do periósteo na reparação de defeitos cranianos em coelhos imaturos e maduros esqueléticamente. Afirmaram que a dura-máter exerce papel maior que o periósteo na osteogênese, em ambos os grupos, e que essa meninge é responsável pelo crescimento ósseo no interior do defeito em forma de “ilhas”. Demonstraram ainda que o periósteo tem um papel importante no crescimento ósseo periférico.

Embora o tecido ósseo possua alta capacidade de reparação espontânea, esse potencial é limitado pelo tamanho do defeito. Sendo assim, para ser utilizado de forma a permitir uma real avaliação da participação do biomaterial no reparo ósseo de determinado enxerto ou implante, o defeito ósseo criado deve ser considerado crítico, ou seja, grande o suficiente para prevenir que o coágulo organize-se levando ao fechamento espontâneo por tecido ósseo, ocorrendo, em vez deste, a formação de um tecido conjuntivo fibroso (FRAME, 1980; SCHMITZ e HOLLINGER, 1986). Diversos autores trabalharam com esse conceito de defeito crítico em coelhos e afirmaram, ao término de seus estudos, que um defeito de 15 mm de diâmetro realizado no crânio dessa espécie é considerado um defeito crítico (FRAME 1980; CHEN *et al.*, 1998; MOGHADAM *et al.*, 2004).

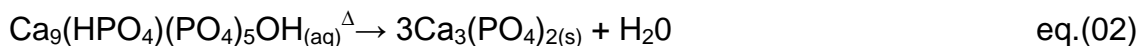
O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de um cimento ósseo formulado a partir do β - fosfato tricálcico (β -TCP) aplicado em defeitos ósseos de tamanho crítico no crânio de coelhos através de análises por difração de raios X e pela histologia. A hipótese levantada é que o biomaterial seja biocompatível, osteocondutor, absorvido e osteointegrável.

MATERIAL E MÉTODOS

Biomaterial

O cimento ósseo utilizado no presente trabalho foi desenvolvido por Albuquerque (2012) e obtido a partir da mistura entre uma fase sólida composta por duas cerâmicas – β -fosfato tricálcico [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] (β -TCP) e sulfato de cálcio dihidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - gesso) e uma fase líquida - ácido fosfórico (H_3PO_4) 2M. O β -TCP foi obtido a partir da mistura das soluções de hidróxido de cálcio [$\text{Ca}(\text{OH})_2$], ácido fosfórico e ácido láctico [$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$]. A mistura obtida foi então sinterizada a uma

taxa de aquecimento de 5°C/min, onde, após atingir a temperatura de 1200°C, foi mantida durante 1 hora, obtendo-se o β-fosfato tricálcico conforme as equações:



As proporções das cerâmicas utilizadas para composição da fase sólida não serão informadas ao longo do presente trabalho uma vez que a produção do cimento encontra-se em processo de patente.

Modelo experimental

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais – UFV número 116/11, sendo coordenado pela médica veterinária Andréa Pacheco Batista Borges, CRMV-MG 2772.

Foram utilizados neste projeto 33 coelhos da raça Nova Zelândia, com peso médio de 3,5Kg e idade entre cinco e seis meses. Para controle de ectoparasitas, cada animal recebeu ivermectina¹¹ na dose de 0,4 mg/Kg por via subcutânea e foi acondicionado em gaiola individual, previamente higienizada com água corrente e desinfetada com fogo, onde permaneceram por dois meses para aclimatação. Foi fornecida ração comercial e feno uma vez ao dia e água *ad libitum*.

Os 33 animais foram divididos separados aleatoriamente em três momentos experimentais (Tabela 1) correspondentes à respectiva época de eutanásia, denominados MI, MII e MIII, onde cada momento avaliado foi composto por 8 animais tratados e 3 animais controle.

Tabela 1. Época do sacrifício dos animais por momentos e em dias

MOMENTO	ÉPOCA DE EUTANÁSIA
Momento um (MI)	Sete dias
Momento dois (MII)	28 dias
Momento três (MIII)	90 dias

¹¹Ivermic®. Microsules. Porto Alegre, Brasil

Procedimento cirúrgico

Cada animal recebeu imediatamente antes do procedimento 20 mg/Kg de cefazolina¹² por via intravenosa como antibioticoterapia profilática. A indução anestésica se deu com propofol¹³, na dose de 6 mg/Kg, por via intravenosa. Os animais foram intubados com sonda endotraqueal nº 2,5 e mantidos anestesiados com isoflurano¹⁴, diluído em oxigênio 100% em quantidade suficiente para a realização do procedimento. A tricotomia abrangeu a porção dorsal do crânio, estendendo-se da base das orelhas até o processo supraorbital rostral, sendo as pálpebras superiores os limites laterais. A antissepsia seguiu o padrão adotado pelo DVT-UFV e os animais foram posicionados em decúbito esternal.

Foi realizada uma incisão retilínea na pele, no sentido caudorostral, com aproximadamente 4 cm de comprimento sobre a crista sagital externa, estendendo-se até a região interorbital. O periósteo foi incisado e também afastado no sentido lateral, permitindo assim, a visualização do encontro entre a sutura coronal e sagital, ponto conhecido na medicina humana como bregma.

Um defeito de 15 mm de diâmetro foi demarcado na superfície óssea com uso de uma broca trefina¹⁵ conectada a uma perfuratriz elétrica¹⁶, na velocidade de 5000 rpm e irrigação contínua com solução fisiológica estéril. A trefina foi posicionada de tal forma que o bregma se encontrava no centro do defeito (Figura 1 A e B).

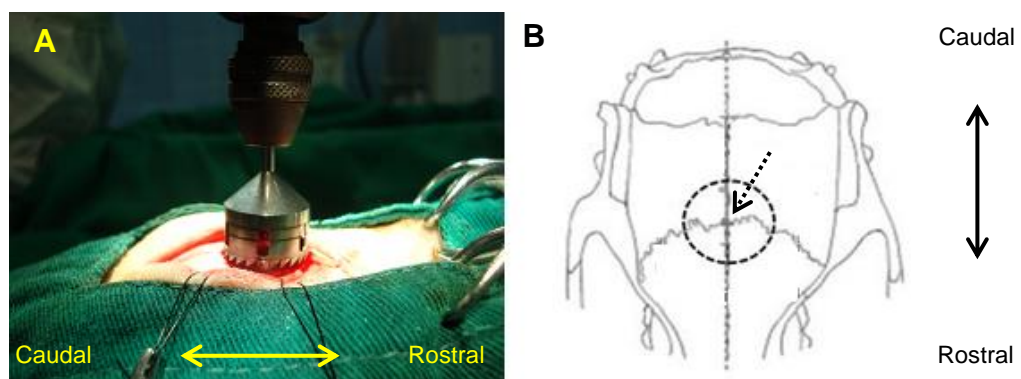


Figura 1. Procedimento cirúrgico para realização do defeito experimental no crânio de coelho. Posicionamento da trefina (A) de forma que seu centro foi sobreposto ao bregma (seta tracejada) (B).

¹²Cefazolina sódica – Aurobindo. Anápolis, Brasil.

¹³Propofol® – Eurofarma. São Paulo, Brasil.

¹⁴Isoflurano® - Cristália. São Paulo, Br

¹⁵Trefina Dentoflex. São Paulo, Brasil.

¹⁶Perfuratriz Black & Decker RT 650. Towson, USA.

Em seguida, com o auxílio de um microscópio cirúrgico, foram utilizadas brocas de desbaste¹⁷ conectadas à perfuratriz elétrica para desbastar o tecido ósseo, sob irrigação contínua com solução fisiológica estéril, até a exposição da dura-máter em toda a extensão do defeito. Para a obtenção do cimento a fase sólida foi misturada a líquida, ambas previamente esterilizadas em autoclave a 120° durante sete minutos, em proporção de 1:1, com auxílio de uma cuba inox e um bastão de vidro esterilizado, onde permaneceu por três minutos. O material formado, já com aspecto de um cimento moldável, foi depositado no interior do defeito de forma a cobri-lo em toda a sua extensão, sendo sua espessura limitada pela do crânio de cada animal (Figura 2).

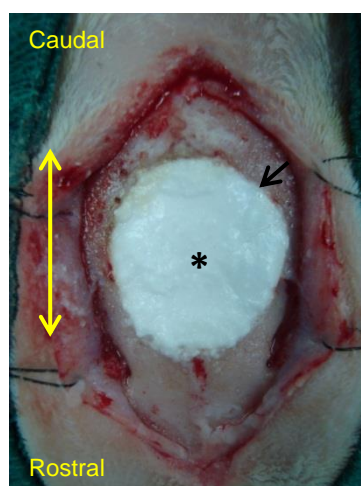


Figura 2. Defeito crítico em crânio de coelho realizado com preenchido com cimento ósseo a base de β -TCP. * - centro do defeito; limite do defeito (seta preta).

Foi realizado apenas um plano de sutura, uma vez que não foi possível realizá-la no perióstio. A sutura da pele foi realizada em padrão colchoeiro com fio não-absorvível de náilon¹⁸. Todos os animais receberam no pós-operatório imediato 1mg/Kg de morfina¹⁹ por via subcutânea, por dois dias com intervalo de 12 horas. O grupo controle foi submetido ao mesmo procedimento anestésico/cirúrgico bem como aos mesmos cuidados pós-operatórios, entretanto nenhum tipo de preenchimento foi realizado no defeito, permanecendo apenas o coágulo que normalmente é formado.

¹⁷BrocaKG Sorensen@.Medical Burs.Cotia, Brasil

¹⁸Nylon@.Shalon.Boa Vista, Brasil

¹⁹Dimorf@. Cristália LTDA. Itapira, Brasil

Aos dias sete, 28 e 90 pós-cirúrgicos os animais dos momentos MI, MII e MIII respectivamente foram sacrificados com sobredose anestésica de propofol e cloreto de potássio²⁰, ambos por via intravenosa. Foi removido um fragmento retangular de tecido ósseo craniano, contendo o defeito em seu interior, conforme figura 3. Os fragmentos foram armazenados em formol 10% até o início das análises por difração de raios X e histológica.

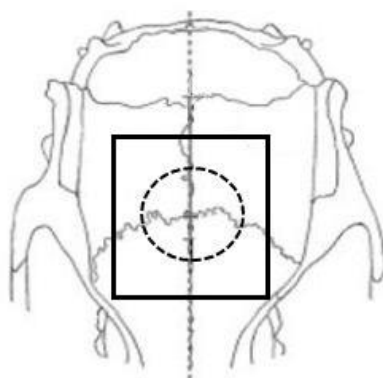


Figura 3. Desenho esquemático do crânio de coelho representando o fragmento ósseo retangular retirado, contendo o defeito ósseo em seu interior (círculo).

Com o objetivo de determinar a natureza (orgânica ou inorgânica) do material presente no interior do defeito aos sete, 28 e 90 dias, utilizou-se o teste de difração de raios X (DRX). Foram selecionadas aleatoriamente, dentro do grupo tratado, duas amostras de cada momento experimental para a realização da DRX, sendo as demais reservadas para histologia. As amostras destinadas a DRX foram secas em estufa elétrica a 55°C durante 72 horas. Para a retirada do material foi utilizada a mesma trefina de 15 mm de diâmetro e a mesma perfuratriz elétrica utilizada para criar o defeito ósseo, na velocidade de 5000 rpm. O centro da trefina foi posicionado no bregma, sendo retirada uma amostra com o mesmo diâmetro inicial do defeito. Foi realizada também a DRX no tecido ósseo integro e no biomaterial antes de sua implantação como controle para comparação com as amostras experimentais.

Em seguida o material obtido foi desagregado em almofariz de porcelana até assumir aspecto farináceo e acondicionado no interior de um difratômetro da marca Rigaku D-Max modelo Geiger Flex equipado com tubo de cobalto (radiação Co-K α , $\lambda = 1,79026 \text{ \AA}$), com um monocromador de cristal curvo de grafite no feixe difratado,

²⁰KCl 10%. Isofarma. Precabura Eusébio, Brasil.

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 10 a 70° 2 θ com 0.05° de incremento e 2 segundos de contagem de tempo em cada passo. Os resultados obtidos foram apresentados na forma de gráficos obtidos a partir do programa “*X Powderver.2010.01.28 pro*” e em análise descritiva.

As amostras dos crânios destinadas ao exame histológico foram fixadas em formol 10% tamponado por um período de aproximadamente sete dias. Em seguida o material foi descalcificado, individualmente, em uma solução de ácido fórmico a 10% tamponado com citrato de sódio para pH 4,5 por aproximadamente 40 dias sendo então seccionado no sentido transversal ao eixo do crânio. Terminada a fase de descalcificação, as amostras foram lavadas em água corrente e então desidratadas em álcool etílico a 70, 80, 90 e 100% durante 90 minutos em cada etapa e repetida a 100%. Posteriormente, foram diafanizadas em dois banhos de xilol por 30 minutos cada e embebidas em dois banhos de parafina, em estufa a 58 °C por 45 minutos. De cada bloco de parafina foram obtidos dois cortes de 5 μ m em micrótomo rotativo e montados em laminas de vidro, sendo submetidos às técnicas de coloração com Hematoxilina-Eosina. Os resultados histológicos foram interpretados e apresentados por análise descritiva avaliando-se os tipos celulares presentes, caracterizando-se o processo de formação óssea no interior do defeito.

Para a aquisição das imagens fotográficas das lâminas histológicas utilizou-se um microscópio Olympus CX31, com câmera Olympus SC20 acoplada e programa amalySISgetIT versão 5.1. As imagens panorâmicas dos defeitos ósseos foram obtidas a partir de uma lupa Wild Heerbrugg, Modelo M5A em aumento de 25 vezes e sobrepostas utilizando o programa *Abode Photoshop CS2*.

RESULTADOS E DISCUSSAO

Análise pela difração de raios X

A análise do difratograma do cimento ósseo antes de sua implantação (Figura 4) identificou picos altos e agudos, característicos do β -TCP, do gesso e da brushita (DCPD), identificados a partir de seus respectivos CPDS Cards (MINCRYST, 2012), condizentes com amostras de elevada cristalinidade. De forma semelhante, Xia *et*

al., (2006) e Juncioni *et al* (2005) também relataram o aparecimento de brushita em cimentos ósseos formulados a partir de β -TCP e ácido fosfórico.

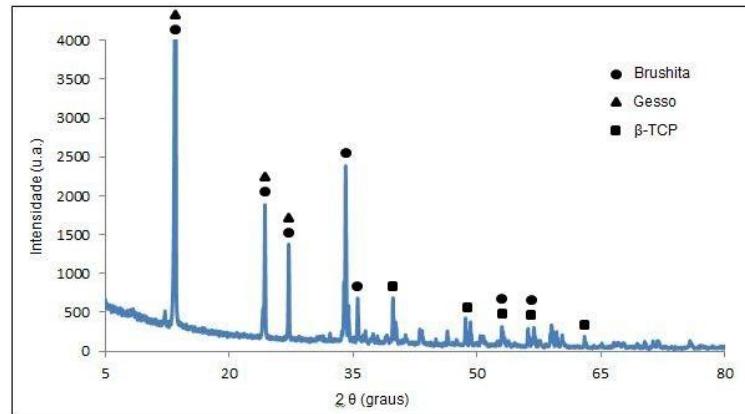


Figura 4. Difratograma do cimento ósseo a base de β -TCP, antes da implantação.

Na figura 5 tem-se o difratograma do tecido ósseo intacto, onde não são visualizados os picos altos e agudos característicos de materiais cristalinos, sendo, entretanto observada uma ombreira típica de materiais orgânicos de baixa cristalinidade.

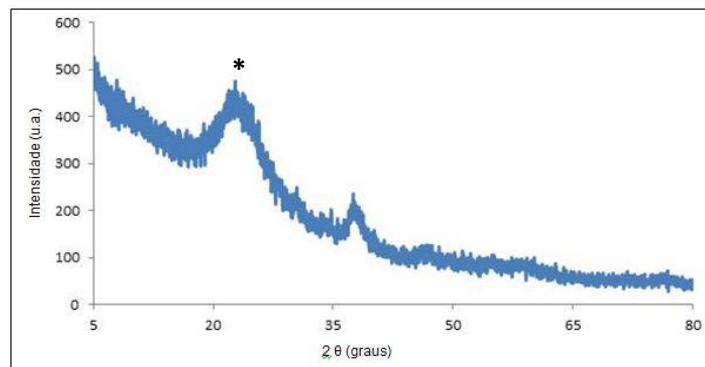


Figura 5 - Difratograma do tecido ósseo íntegro. Notar a presença de uma estrutura denominada ombreira, característica de materiais orgânicos de baixa cristalinidade (*).

Os difratogramas do cimento ósseo após sua implantação estão demonstrados na figura 6, onde se tem a evolução das alterações ocorridas no local do defeito ósseo em cada momento experimental, comparando-se com o difratograma do cimento ósseo antes de sua implantação e com o difratograma do tecido ósseo íntegro.

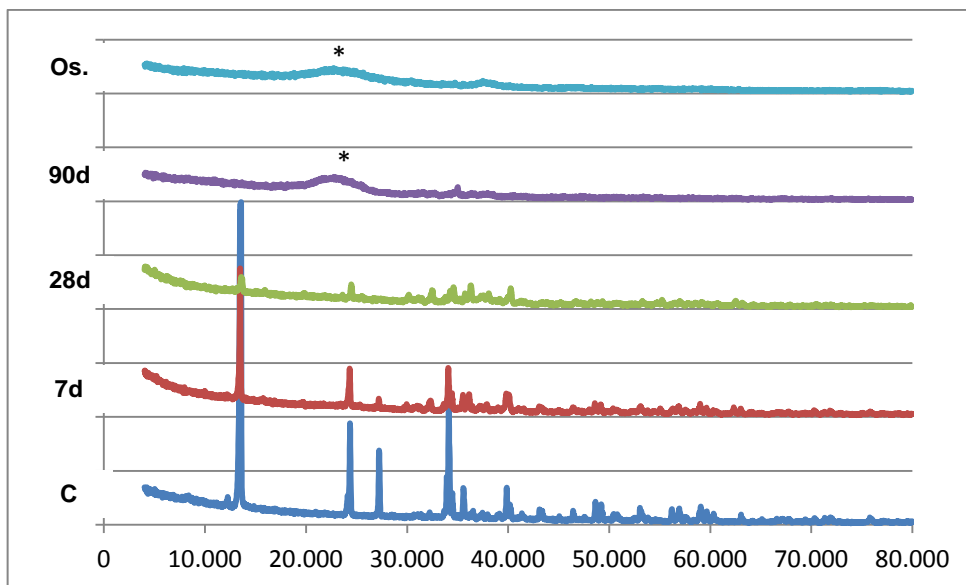


Figura 6. Representação dos difratogramas do cimento ósseo (C) antes de sua implantação, do material obtido no interior do defeito ósseo, ao longo dos momentos experimentais (sete, 28 e 90 dias) e do tecido ósseo craniano (Os). * Ombreira.

Aos sete dias percebe-se a manutenção de todos os picos observados antes da implantação do biomaterial, confirmando sua presença no local nessa data. Entretanto, ressalta-se uma discreta redução na cristalinidade da amostra, observada pela diminuição do tamanho de alguns picos. Tal fato sugere o início da absorção do biomaterial e sua substituição por materiais orgânicos de baixa cristalinidade. Aos 28 dias após sua implantação, a perda da cristalinidade acentuou-se, sendo observada pela redução significativa de alguns picos bem como o desaparecimento de outros, sugerindo a contínua absorção do biomaterial. Aos 90 dias, observou-se uma completa perda de cristalinidade, pelo desaparecimento quase total dos picos característicos do cimento ósseo antes de sua implantação. De forma semelhante a Martinez *et al.* (2012) foi observado também, aos 90 dias, o aparecimento de uma ombreira na linha do gráfico, típica de materiais orgânicos de baixa cristalinidade. A perda gradual da cristalinidade do cimento ósseo analisado pela DRX ao longo dos momentos experimentais e o surgimento de uma ombreira característica de materiais orgânicos com baixa cristalinidade, comparável ao do tecido ósseo, sugerem a absorção do biomaterial e sua substituição por tecido ósseo.

Análise histológica

No grupo controle, ao longo dos momentos experimentais, não foi observado o preenchimento completo do defeito por tecido ósseo, sendo a maior parte preenchida por tecido conjuntivo orientado paralelamente à superfície da ferida (Figura 7), semelhante ao relatado por Chen *et al.* (1998) e Moghadam *et al.* (2004). Esse fato caracteriza o defeito crítico, permitindo assim, avaliação fidedigna da influência do cimento ósseo na reparação de lesões no crânio (OLIVEIRA, 2011). O crescimento ósseo, aos sete dias, ocorreu a partir das bordas da ferida, onde foram observadas células mesenquimais indiferenciadas, osteoblastos, matriz óssea não mineralizada e tecido ósseo recém formado (Figura 8). Nos momentos experimentais seguintes o crescimento ósseo também ocorreu a partir das bordas, entretanto foram vistas trabéculas ósseas recém formadas, a partir de agora chamadas de “ilhas ósseas”, na região central do defeito (Figura 9), envoltas por tecido conjuntivo e células da linhagem osteogênica. Gosain *et al.* (2003) sugeriram que este crescimento ósseo central estaria relacionado ao fornecimento de células osteogênicas pela dura-máter, ao constatarem menor formação óssea semelhante no crânio de coelhos que tiveram a meninge coberta por uma membrana impermeável, quando comparados àqueles em que a meninge foi mantida descoberta.

Em nenhum grupo ao longo dos momentos experimentais foi observada a presença de células que indicassem um processo inflamatório crônico indesejável, como os linfócitos. Aos sete dias observou-se, nos grupos controle e tratado, um infiltrado inflamatório predominantemente polimorfonuclear caracterizado como agudo, que diminuiu aos 28 dias, não sendo mais observado aos 90 dias, sugerindo a biocompatibilidade do biomaterial.

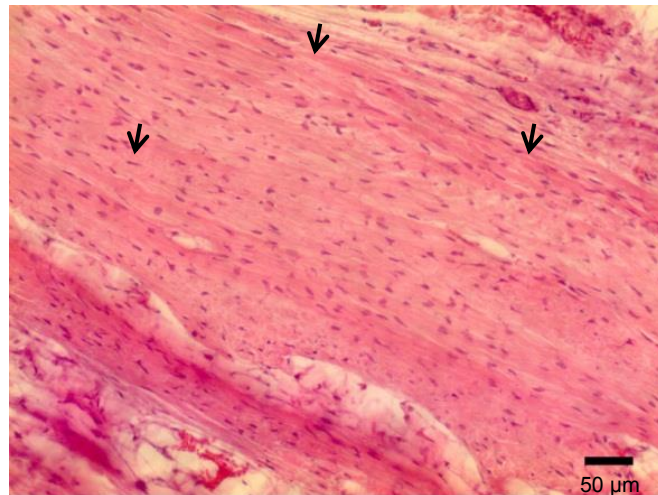


Figura 7. Fotomicrografia do interior do defeito ósseo no crânio de um coelho do grupo controle aos 90 dias. Notar a presença de tecido conjuntivo (setas).H&E.

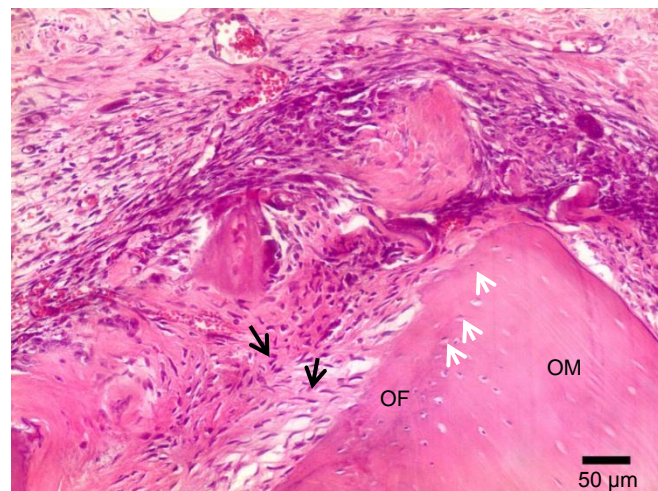


Figura 8. Fotomicrografia da borda do defeito ósseo no crânio de coelho do grupo controle aos sete dias. OM - osso maduro. OF – tecido ósseo recém formado. Células mesenquimais indiferenciadas (seta preta). Osteócitos (seta branca). H&E.

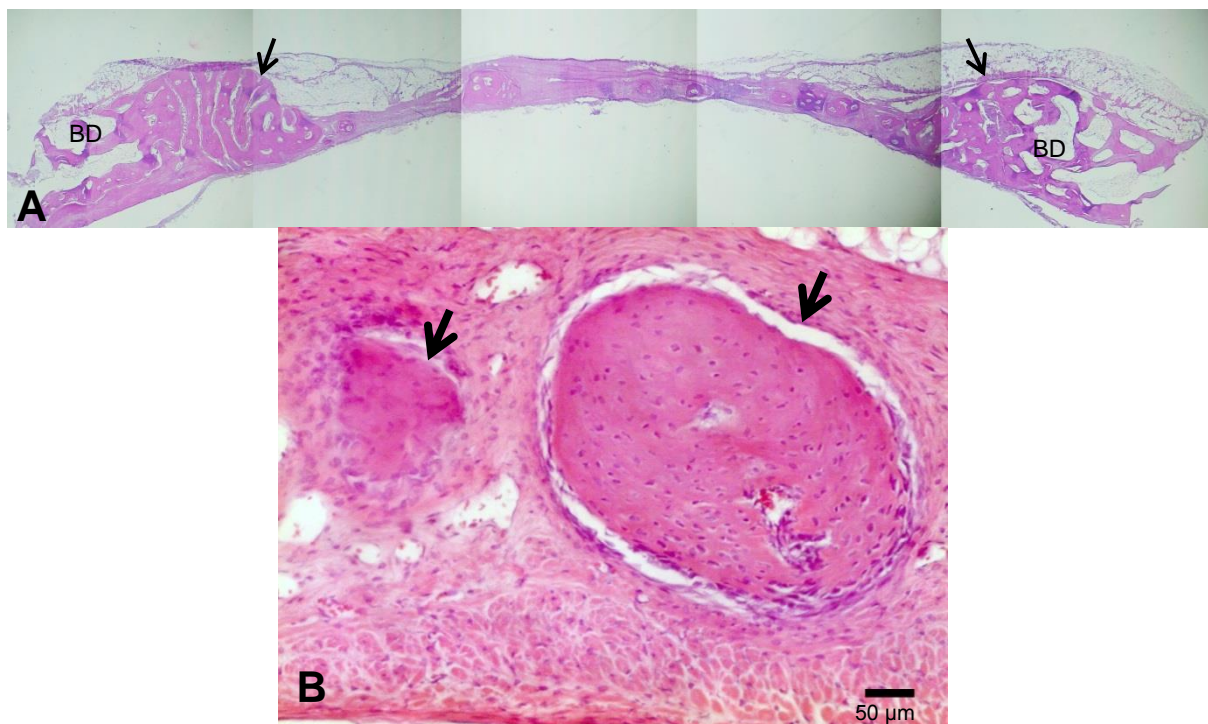


Figura 9. Fotomicrografia panorâmica do defeito ósseo no craniano de coelho do grupo controle aos 90 dias. A – Crescimento de tecido ósseo novo (seta fina) a partir das bordas do defeito (BD)25x, H&E .B - Crescimento ósseo em formato de “ilhas ósseas” no interior do defeito (seta larga). H&E.

No grupo tratado, aos sete dias, foi observada a presença do biomaterial no interior do defeito ósseo, entretanto não foi visualizada a atividade osteogênica nas bordas da lesão, diferente do observado no grupo controle na mesma data. Não foram observadas nesse local as células mesenquimais, os osteoblastos, a matriz óssea não mineralizada nem o crescimento de tecido ósseo novo a partir das bordas (Figura 10). Não foram visualizados também capilares sanguíneos entremeados ao biomaterial. Acredita-se que o meio ácido propiciado pelo baixo pH do biomaterial (3,38), conforme relatos pessoais de Dornas (2013), no momento de sua implantação, tenha interferido no processo de absorção e reparação óssea das bordas do defeito. Tal fato deve-se, possivelmente a destruição local de células precursoras de macrófagos, osteoclastos e osteoblastos, que segundo Park *et al.*(2001)são os responsáveis pelos processos iniciais de reparação, assim como a destruição de proteínas indutoras do recrutamento e diferenciação celular, como as proteínas morfogenéticas (WOZNEY, 2002) e a destruição dos vasos sanguíneos, responsáveis pelo aporte nutricional e celular aos locais lesionados segundo Chow, (2009).

Nas amostras teciduais obtidas aos 28 dias não foi observado o completo fechamento do defeito por tecido ósseo, quadro semelhante ao encontrado no grupo controle. Foi observado o crescimento de tecido ósseo no interior do cimento, limitando-se às bordas do defeito, com a presença de osteócitos e áreas de formação de matriz óssea recente (Figura 11), assim como relatado por Moghadam *et al.* (2004). Não foi observado crescimento ósseo no centro do defeito. Acredita-se que uma lesão da dura-máter ocasionada pelo contato direto da meninge com o cimento ósseo tenha sido a causa para a ausência de formação óssea no centro do defeito, uma vez que segundo Gosain *et al.* (2003) ela tem participação no processo de reparação de defeitos ósseos cranianos por fornecer células osteoprogenitoras às regiões distantes das bordas

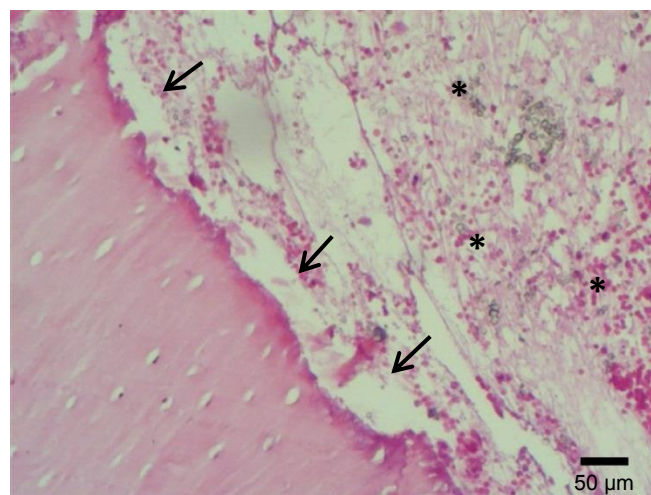


Figura 10. Fotomicrografia da borda do defeito ósseo no crânio de coelho do grupo tratado aos sete dias. Observar a presença do biomaterial no interior do defeito (*), sem formação óssea na sua interface (setas) com o tecido ósseo. H&E.

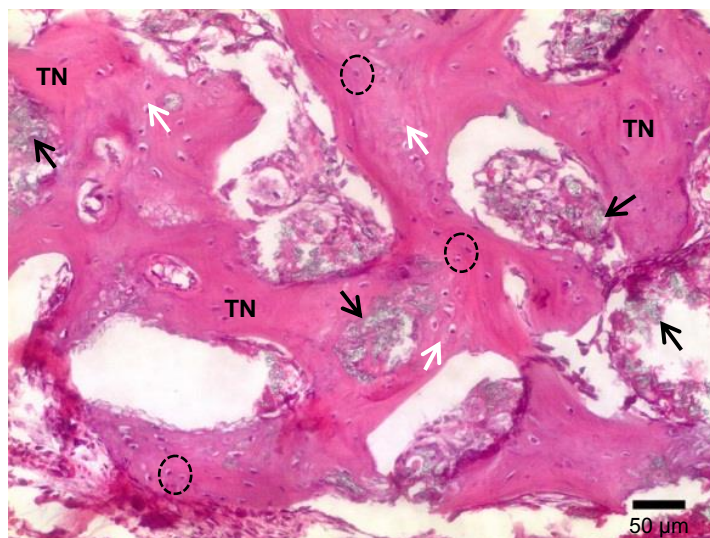


Figura 11. Fotomicrografia demonstrando o crescimento ósseo a partir da borda do defeito ósseo do crânio de coelho do grupo tratado aos 28 dias. Cimento ósseo (setas pretas). Tecido ósseo recém formado (TN). Osteócitos (círculos). Matriz óssea recente (seta branca).H&E.

Foi observado ainda aos 28 dias um íntimo contato do biomaterial com o tecido ósseo recém formado nas bordas do defeito, sem a interposição de tecido fibroso, demonstrando sua osteointegração (Figura 12), de forma semelhante ao descrito por Theiss *et al.* (2005) no estudo da implantação de cimentos ósseos de brushita em tíbia de ovelhas. Berghaus *et al.* (1984) definiram osteointegração como a capacidade do material estabelecer uma ligação direta entre a superfície do osso, sem a formação de um tecido fibroso entre eles, sendo uma das características que destacam os CFC como substitutos ósseos (LEMAITRE *et al.*, 1995). Segundo Albrektsson e Johansson (2001), a osteointegração não é um evento isolado, estando intimamente relacionado à biocompatibilidade e a osteocondutividade. Sendo assim, segundo ele, materiais tóxicos ou insuficiente para impedirem a osteocondução não serão osteointegrados. Dessa forma, a osteointegração demonstrada pela figura 12 confirma a biocompatibilidade e a capacidade osteocondutora do cimento ósseo avaliado.

Diferentemente do grupo tratado aos sete dias, foi observado aos 28 dias, no interior do defeito ósseo a presença de capilares sanguíneos (Figura 13), fato necessário para permitir o suprimento adequado de oxigênio e nutrientes, um pré-requisito para a absorção e crescimento de tecido ósseo novo (CHOW, 2009). Observou-se também uma quantidade aparentemente menor do biomaterial no

defeito ósseo comparado ao grupo tratado de sete dias, fato esse condizente com a redução da cristalinidade observada aos 28 dias pela DRX.

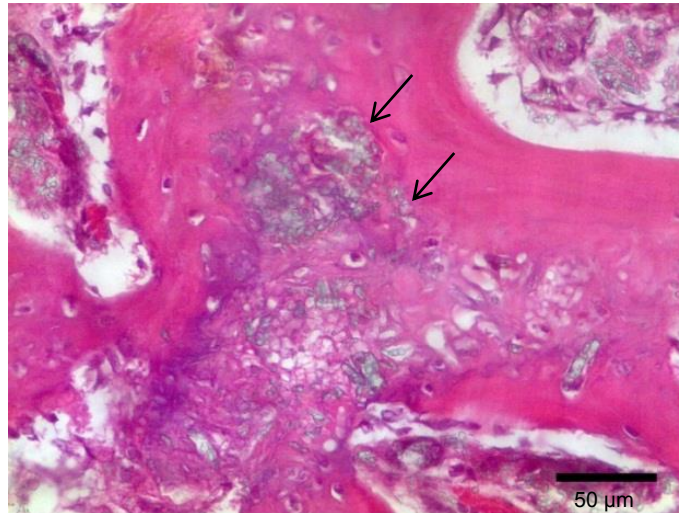


Figura 12. Fotomicrografia do defeito ósseo craniano do grupo tratado aos 28 dias demonstrando a interface do biomaterial com o tecido ósseo. Setas pretas indicam um íntimo contato entre o tecido ósseo e o biomaterial.H&E.

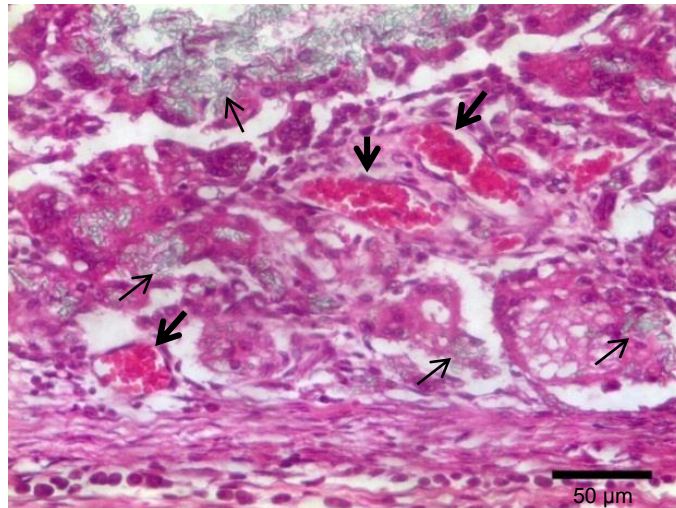


Figura 13. Fotomicrografia do defeito ósseo craniano do grupo tratado aos 28 dias demonstrando a presença de vasos (seta larga) entremeados ao biomaterial (setas finas).H&E.

No terceiro momento experimental ainda não havia ocorrido o fechamento completo do defeito por tecido ósseo, assim como no grupo controle na mesma data, sendo observado um padrão de crescimento ósseo limitado às bordas do defeito (Figura 14). Relato semelhante foi feito por Haddad *et al.* (2006) que utilizou um cimento ósseo de fosfato de cálcio, já comercializado, em defeitos ósseos críticos de

15 mm no crânio de coelhos. Além disso, como relatado aos 28 dias, não foram visualizadas ilhas ósseas no interior do defeito. Esse fato reforça a tese da influencia da lesão na dura mater no crescimento ósseo no centro do defeito, não permitindo uma maior formação óssea apesar do tempo transcorrido. Observou-se redução da quantidade de biomaterial no defeito ósseo de forma mais evidente do que o relatado aos 28 dias, fato esse reforçado pela completa perda de cristalinidade do biomaterial observada na DRX.

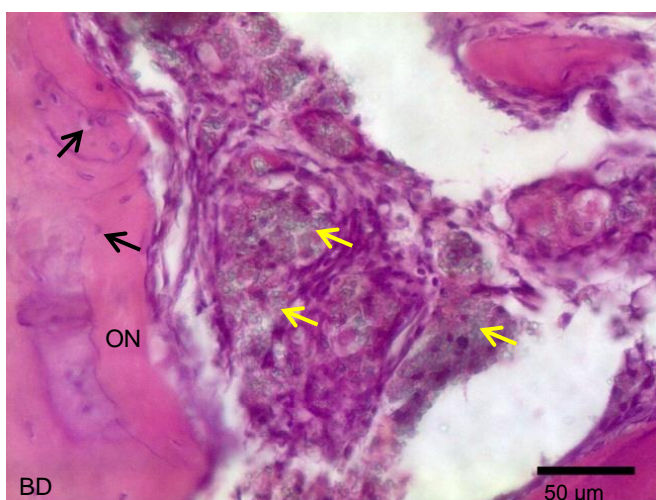


Figura 14. Fotomicrografia demonstrando o crescimento ósseo a partir das bordas do defeito craniano de coelhos do grupo tratado aos 90 dias. Crescimento de tecido ósseo novo (ON) a partir das bordas do defeito (BD), com osteócitos ativos (setas pretas). Biomaterial (setas amarelas).H&E.

Não foi possível quantificar a produção óssea em nenhum dos momentos experimentais pela dificuldade em estabelecer de forma confiável as bordas iniciais do defeito pelo fato do tecido ósseo recém formado assumir um aspecto maduro, confundindo-se com os limites iniciais do defeito. Além disso, devido provavelmente ao processamento, as amostras assumiram um formato curvo, impedindo a mensuração linear do defeito. Contudo, comparando-se qualitativamente as imagens panorâmicas do defeito ósseo entre os grupos aos 90 dias (Figura 15), observa-se uma formação óssea maior no grupo controle, a partir das bordas e a presença das “ilhas ósseas”, o que pode estar relacionado com os mecanismos já discutidos. Mesmo assim, foi possível caracterizar o biomaterial como osteocondutor, por permitir o crescimento de tecido ósseo em seu interior. A característica osteocondutora do cimento testado no presente estudo pode ser explicada devido ao fato de que, no caso dos cimentos ósseos, a absorção do biomaterial precisa existir para que o processo de osteocondução ocorra, como relatado por Luvizuto *et al.*

(2012). Segundo os autores, os cimentos de fosfato de cálcio são previamente fagocitados por células multinucleadas, ocorrendo a partir daí um aumento no diâmetro dos poros existentes, permitindo assim o crescimento vascular, o aporte de nutrientes e células, culminando na formação de tecido osso novo no interior do biomaterial.

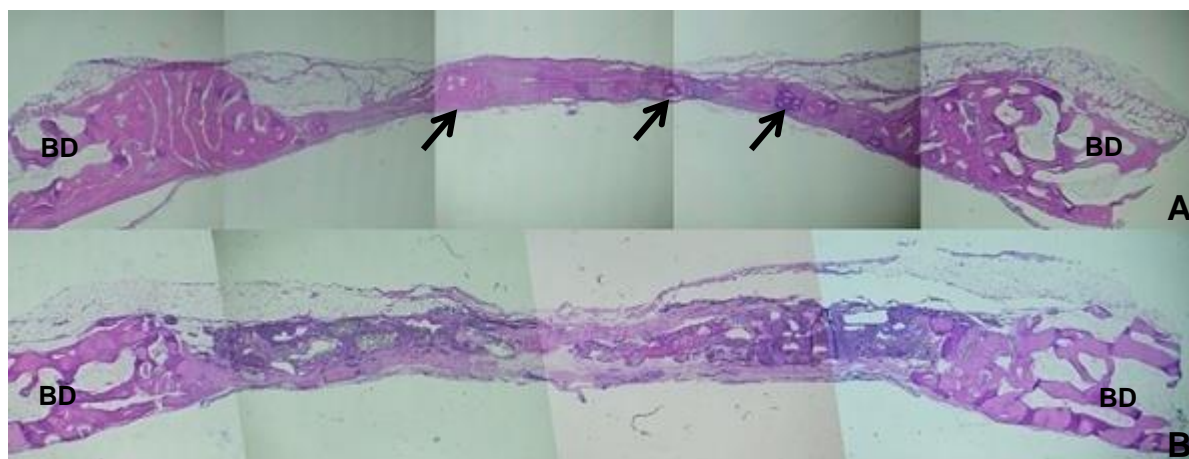


Figura 15. Fotomicrografia panorâmica do defeito ósseo craniano em coelho do grupo controle aos 90 dias (A) e do grupo tratado (B). Observa-se em A uma produção óssea aparentemente maior, a partir das bordas do (BD) defeito, além das ilhas ósseas (setas), que não são observadas na figura B. 25x, H&E.

Os mecanismos da absorção dos cimentos ósseos de fosfato de cálcio ainda não estão completamente esclarecidos, mas já foi demonstrado que ela pode ocorrer a partir da dissolução em fluidos biológicos (GROVER *et al.*, 2006) e pela atividade fagocitária celular, principalmente por parte dos macrófagos ou por células gigantes multinucleadas. Grover *et al.* (2006) relataram a redução da massa de cimentos ósseos, aos 28 e 90 dias *in vitro* em soro fetal bovino e fluido biológico simulado, formulados a partir de β -TCP e ácido pirofosfórico. A absorção do biomaterial promove um aumento no diâmetro dos poros existentes, fato esse que permite o crescimento vascular no interior do biomaterial, através dos quais chegam células mesenquimais que dão origem aos osteoblastos, iniciando a produção de tecido ósseo novo (CONSTANZ *et al.*, 1997; APELT *et al.*, 2004; THEISS *et al.*, 2005). Baseado nesses relatos acredita-se que a dissolução seja um dos mecanismos responsáveis pela absorção do biomaterial avaliado. Foram observadas células gigantes multinucleadas ao redor de partículas do biomaterial

aos 28 e 90 dias (Figura 16), sugerindo a participação celular no processo de absorção do biomaterial. A absorção do biomaterial *in vivo* sugerida pela histologia é reforçada pela ausência de migração do biomaterial para os tecidos adjacentes no exame macroscópico após as eutanásias.

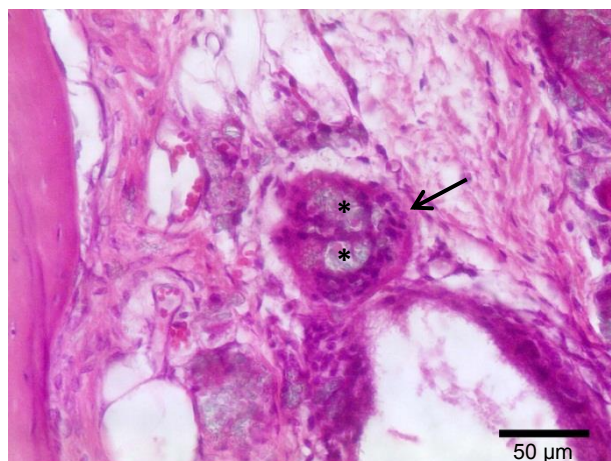


Figura 16. Fotomicrografia do defeito ósseo no crânio de coelhos do grupo tratado aos 90 dias. Observar a presença de uma célula gigante multinucleada (seta) ao redor de partículas do biomaterial (*), sugerindo o processo celular como um das formas de absorção do biomaterial. H&E.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pela DRX e pelas análises histológicas, nas condições em que o presente estudo foi realizado, foi possível caracterizar o biomaterial como biocompatível e osteocondutor a nível histológico, possuindo a capacidade de se osteointegrar, sendo absorvido *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **European Spine Journal**.v.10, s96-s101, 2001.
- ALBUQUERQUE, J.S.V. **Produção de biocimentos de apatitas nanométricas aplicados como sistema de liberação controlada de fármacos**. 2012. 221f. Tese (Doutorado em engenharia e ciência de materiais) – Departamento de engenharia metalúrgica e de materiais, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- APELT, D.; THEISS, F.; EL-WARRAK, A.O.; ZLINSZKY, WOLFISBERGER, R.B.; BOHNER, M.; MATTER, S.; AUER, J.A.; RECHENBERG, B. In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements. **Biomaterials**.v.25, p. 1439-1451, 2004.
- BOHNER, M. Calcium Orthophosphates in Medicine: from Ceramics to Calcium Phosphate Cements. **Injury: International Journal of the Care of the Injured**. v.31,p. D37-D47, 2000.
- BERGHAUS, A.; MULCH, G.; HANDROCK, M. Porous polyethylene and proplast: their behavior in a bony implant bed. **Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery**. v.240, p.115-119, 1984.
- CHEN, T.M.; YAO, C.H.; WANG, H.J.; CHOU, G.H.; LEE, T.W.; LIN, F.H. Evaluation of a novel malleable, biodegradable osteoconductive composite in a rabbit cranial defect model. **Materials chemistry and physics**.v. 55, p. 44 - 50, 1998.
- CHOW, L.C. Next generation calcium phosphate-based biomaterials. **Dental Materials Journal**.v.28, n.1, p.1-10, 2009.
- CONSTANZ, B.R.; BARR, B.M.; ISON, I.C.; FULMER, M.T.; BAKER, J.; MCKINNEY,L.; GOODMAN, S.B.; GUNASEKAREN, S.; DELANEY, D.C.; ROSS, J.; POSER, R.D. Histological, Chemical, and Crystallographic Analysis of Four Calcium Phosphate Cements in Different Rabbit Osseous Sites. **Journal of Biomedical Materials Research**. v.43, n.4, p.451-461, 1998.
- FRAME, J.W.A convenient animal model for testing bone substitute materials. **Journal of oral surgery**. v.38, n.2, p.176-180, 1980.
- GOSAIN, A.K.; SANTORO, T.D.; SONG, L.S.; CAPEL, C.C.; SUDHAKAR, P.V.; MATLOUB, H.S. Osteogenesis in calvarial defects: contribution of the Dura, Pericranium, and de Surrounding Bone in Adult versus Infant Animals. **Plastic and reconstruct surgery**.v.112, n.2, p.515-527, 2003.

GROVER, L.M.; GBURECK, U.; WRIGHT, A.J.; TREMAYNE, M.; BARRALET, J.E. Biologically mediated resorption of brushite cement in vitro. **Biomaterials**.v.27, p. 2178-2185, 2006.

HADDAD, A.J.; PEEL, S.A.F.; CLOKIE, C.M.L.; SANDOR, G.K.B. Closure of Rabbit Calvarial Critical-Sized Defects Using Protective Composite Allogeneic and Alloplastic Bone Substitutes. **Journal of craniofacial surgery**.v.15, n.5, p. 926-934, 2006.

HAM, A.W. **Histologia**.6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1972.

HAN, P.Y.; KIM, J.H.; KANG, H.I.; KIM, J.S. "Syndrome of the Sinking Skin-Flap" Secondary to the ventriculoperitoneal shunt after craniectomy. **Journal of Korean neurosurgical society**. v.43, p.51-53, 2008.

JUNCIONI, B.C. Hidrólise de cimento de fosfato de cálcio de DCPD para obtenção de HA. In: Congresso Brasileiro de Cerâmica, 49º, 2005, São Pedro. **Anais eletrônicos**. São Pedro: Universidade Federal de São Carlos, 2005. Disponível em: <http://www.ipen.br/biblioteca/cd/cbc/2005/artigos/49cbc-16-14.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2012.

KLEIN, C.P.; DE GROOT, K.; DRIESSEN, A.A.; VAN DER LUBBE, H.B. Interaction of biodegradable beta-whitlockite ceramics with bone tissue: an in vivo study. **Biomaterials**.v.6, p.189-192, 1985.

LEMAITRE, J. Injectable calcium phosphate hydraulic cements: new developments and potential applications. **Innovation et technologie en biologie et médecine**.v.16, n.1, p.109-120, 1995.

LUVIZUTO, E.R.; QUEIROZ, T.P.; MORGONAR, R.; PANZARINI, S.R.; VIEIRA, E.H.; OKAMOTO, T.; OKAMOTO, R. Osteoconductive Properties of β -Tricalcium Phosphate Matrix, Polylactic and Polyglycolic Acid Gel, and Calcium Phosphate Cement in Bone Defects. **Journal of craniofacial surgery**.v.23, n.5, p.e430-e433, 2012.

MARTINEZ, M.M.M.; PACHECO, A.B; FONTES, M.F. Implantación de hidroxiapatita-lignina en canal medular de conejos: evaluación macroscópica y difractográfica. **Revista MVZ Córdoba**.v.17, n.3, 2012.

MINCRYST. **Crystallographic and Crystallochemical Database for Minerals and their Structural Analogues**: banco de dados. Disponível em: <http://database.iem.ac.ru/mincryst/>. Acesso em: 29 nov. 2012.

MOGHADAM, H.G.; SANDOR, G.K.B.; HOLMES, H.H.I.; CLOKIE, C.M.L. Histomorfometric evaluation of bone regeneration using allogeneic and alloplastic bone substitutes. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**.v.62, n. 2, p. 202 – 212, 2004.

OLIVEIRA, L.C. **Influência do enxerto de tecido adiposo autógeno no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico: estudo histológico e histomorfométrico em calvária de coelhos** 2011. 68f. Dissertação (Mestrado em odontologia clínica) – Universidade Positivo.Curitiba.

PARK, J.Y.; GEMMELL, C.H.; DAVIES, J.E. Platelet interactions with titanium: modulation of platelet activity by surface topography. **Biomaterials**.v.22, p.2671-2682, 2001.

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

THEISS, F.; APELT, D.; BRAND, B.; KUTTER, A.; ZLINSZKY, K.; BOHNER, M.; MATTER, S.; FREI, C.; AUER, J.A.; RECHENBERG, B. Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. **Biomaterials**.v.26, p.4383-4394, 2005.

WOZNEY, J.M. Overview of bone morphogenetic proteins. **Spine**.v.15, s2-s8, 2002.

XIA, Z.; GROVER, L.M.; HUANG, Y.; ADAMOPOULOS, I.E.; GBURECK, U.; TRIFFITT, J.T.; SHELTON, R.M.; BARRALET, J.E. In vitro biodegradation of three brushite calcium phosphate cements by a macrophage cell-line. **Biomaterials**.v.27, p.4557-4565, 2006.