

Análise da influência de duas faixas granulométricas de microesferas de hidroxiapatita e alginato na fase inicial do reparo ósseo

Analysis of the influence of two granulometric ranges of hydroxyapatite and alginate microspheres on initial stage of bone repair

George Gonçalves dos Santos¹, Luisa Queiroz Vasconcelos², Aryon de Almeida Barbosa Júnior³, Silvia Rachel de Albuquerque Santos⁴, Alexandre Malta Rossi⁵, Fúlvio Borges Miguel⁶, Fabiana Paim Rosa^{7*}

¹Doutorando do Programa de Pós-graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas – UFBA. Integrante do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais – UFBA. Acadêmico do curso de Medicina – UFRB. Integrante do Laboratório de Ciências e Tecnologias da Saúde – UFRB; ²Doutoranda do Programa de Pós-graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas – UFBA. Integrante do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais – UFBA; ³Pesquisador do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais – UFBA; ⁴Pesquisador do LABIOMAT. Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas – MCTI-RJ; ⁵Pesquisador do LABIOMAT. Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas – MCTI-RJ; ⁶Coordenador do Laboratório de Ciências e Tecnologias da Saúde – UFRB. Pesquisador do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais – UFBA; ⁷Docente do Programa de Pós-graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas – UFBA. Coordenadora do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais – UFBA.

Resumo

Introdução: as pesquisas com uso de biomateriais substitutos ósseos têm crescido de forma exponencial nas últimas décadas, em todo o mundo. Estes materiais podem ser produzidos em diferentes geometrias e tamanhos de partículas que, dentre outros fatores físico-químicos, influenciam diretamente a resposta tecidual após a sua implantação *in vivo*. **Objetivo:** analisar a influência da diferença entre duas faixas granulométricas de microesferas de hidroxiapatita (HA) nanoestruturada associada ao alginato (HAN/alg), na fase inicial do reparo ósseo de defeito crítico, em calvária de rato. **Metodologia:** utilizou-se 10 ratos *Wistar* machos para compor os grupos experimentais: M1 – defeito ósseo preenchido com microesferas de HAN/alg, com dimensões de 250-425µm; M2 – defeito ósseo preenchido com microesferas de HAN/alg, com dimensões de 425-600µm, avaliados após 15 dias de implantação. **Resultados:** na análise histológica, observou-se resposta inflamatória crônica granulomatosa de permeio às microesferas, nos dois grupos, porém mais evidente no M2, no qual as microesferas mostraram fragmentação mais acentuada. Em relação ao reparo ósseo, notou-se neoformação óssea reparativa, adjacente às bordas, tanto no M1 quanto no M2. Contudo, no M1, este achado histológico foi também observado, ora circundante a algumas microesferas, ora no interior destas, principalmente daquelas localizadas próximas às margens do defeito. **Conclusão:** conclui-se que na fase inicial do reparo ósseo, o tamanho da microesfera influenciou, principalmente, na disposição espacial das partículas e as microesferas de faixa granulométrica menor – de 250-425µm – apresentaram melhor arcabouço de preenchimento e distribuição ao longo do defeito, mais favoráveis à regeneração óssea, em relação às partículas de faixa granulométrica de 425-600µm.

Palavras-chave: Biomateriais. Regeneração óssea. Microesferas. Ratos.

Abstract

Introduction: researches with use of bone substitute biomaterials have grown exponentially in the last decades, around the world. These materials can be produced in different geometries and particles sizes, among other physical and chemical factors, influencing directly the tissue response after its implantation *in vivo*. **Objective:** analyze the influence of the difference between two granulometric ranges of nanostructured hydroxyapatite microspheres (HA) associated to alginate (HAN/alg), in the initial phase of bone repair of critical defect, in rat calvarium. **Methodology:** 10 male *Wistar* rats were used to compose the experimental groups: M1 – bone defect filled with microspheres of HAN/alg, with dimensions of 250-425 µm; M2 – bone defect filled with microspheres of HAN/alg, with dimensions of 425-600 µm, assessed after 15 days of deployment. **Results:** in the histological analysis was observed chronic granulomatous inflammatory response, among the microspheres, in both groups, but more evident in the M2, in which the microspheres showed stronger fragmentation. In relation to the bone repair, it was noted reparative new bone formation adjacent to the edges, in both M1 and M2. However, in the M1, this histological finding was also observed surrounding some microspheres, as inside of these, especially those located near the margins of the defect. **Conclusion:** it is concluded that in the initial phase of bone repair, the microsphere size influenced mainly on spatial location of the particles and the smaller microspheres of granulometric range of 250-425µm presented best filling and distribution scaffold along the defect, more favorable to bone regeneration in relation to granulometric range particles of 425-600 µm.

Keywords: Biomaterials. Bone Regeneration. Microspheres. Rats.

Correspondente/Corresponding: * Fabiana Paim Rosa – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia. – Endereço: Av. Reitor Miguel Calmon s/n, Vale do Canela, Salvador, Ba. CEP: 40.110-100 – Tel: (71) 99104-5138 – E-mail: fabianapaim@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os pesquisadores da bioengenharia tecidual óssea observaram que os biomateriais nanométricos, com área de superfície inferior a centenas

de micrômetros, favorecem melhor adesão, proliferação e migração celulares em relação aos materiais convencionais, e, conseqüentemente, otimizam a regeneração óssea (PARK et al., 2014). Neste sentido, os biomateriais nanoestruturados têm sido amplamente testados em estudos *in vitro*, e experimentações *in vivo* para posterior ensaios e aplicações clínicas (VASCONCELOS et al., 2014). Esses biomateriais podem apresentar área superficial que varia entre 20 e 100 μm^2 e podem ser produzidos a partir de diferentes substratos cerâmicos e poliméricos ou resultantes da associação destes dois, denominados de compósitos (STRIETZEL; REICHART; GRAF, 2007; TELLEMAN et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2014; WALMSLEY et al., 2015).

Dentre as diferentes propriedades dos biomateriais nanoestruturados, fundamentais para aplicações na regeneração tecidual óssea, destaca-se boa adesão aos tecidos circunjacentes, bioabsorção compatível com a neoformação tecidual e capacidade de adsorver diferentes moléculas em sua superfície (LIU; MA, 2004; KASAJ et al., 2008). Deste modo, no tecido ósseo, o mecanismo de biomineralização induzido por estes materiais estimula o fosfato de cálcio (CaP) amorfo e os nanocristais de HA a iniciarem a nucleação nos espaços situados entre as fibras de colágeno, (CHAE et al., 2013) que os torna promissores para o uso clínico.

A utilização da HA projetada em nanoescala torna-se promissora devido às suas características ultraestruturais e propriedades físico-químicas, pois os cristais de HA nanoestruturados se dissolvem mais rapidamente que aqueles com tamanhos convencionais, de mesma composição. Isto ocorre em função da maior área de superfície exposta aos fluidos biológicos. Desta forma, estes materiais favorecem a adesão, proliferação e migração de células da linhagem osteogênica e, conseqüentemente, aceleram a deposição e crescimento da camada de apatita biologicamente ativa observada entre os biomateriais e o osso neoformado (VALENZUELA et al., 2012).

Buscando otimizar ainda mais as características físico-químicas da HA, os pesquisadores têm associado polímeros, como alginato, à sua estrutura, a fim de produzir compósitos. Estes últimos têm estruturas formadas por mais de um tipo de substrato, os quais podem mimetizar o tecido ósseo e favorecer a osteogênese (LIU; MA, 2004).

Durante a síntese e processamento destes arcabouços tridimensionais (3D), é fundamental levar em consideração o grau de porosidade, o diâmetro dos poros e a interligação entre estes, pois estas características favorecem a angiogênese e influenciam a neovascularização, a migração e proliferação dos osteoblastos, assim como a deposição de matriz osteoide no interior do arcabouço. Entretanto, a concepção do tamanho, da distribuição, da geometria espacial têm sido tarefa desafiadora para os pesquisadores desta área (BRUN et al., 2011).

Quando produzidos na geometria de microsferas – partículas esféricas microscópicas que, por definição, apresentam diâmetro que varia entre 1 μm e 1000 μm

(SAHIL et al., 2011; SARALIDZE; KOOLE; KNETSCH, 2010) –, os compósitos de HAn/Alg têm como principal propriedade a formação de arcabouço 3D poroso com poros interligados que, após implantação *in vivo*, favorecem a difusão de micronutrientes e fatores de crescimento no interior do material; formação de interstícios entre as esferas, o que possibilita a migração, proliferação e diferenciação celular, especialmente de células mesenquimais indiferenciadas e osteoprogenitoras; síntese de nova matriz extracelular (MEC) e neovascularização, eventos fundamentais para a neoformação óssea. Além disso, as microsferas podem ser implantadas por meio de técnica cirúrgica minimamente invasiva (PICCININI, 2012; RIBEIRO, 2013; RIBEIRO et al., 2014).

No decurso do desenvolvimento destes biomateriais, a influência do tamanho do material utilizado ainda é muito controversa, tendo em vista que tal característica possui influência na resposta celular e tecidual aos enxertos ósseos (SICCA et al., 2000). Por isto, tem-se levantado questionamentos a respeito da relação entre a medida do diâmetro das partículas e a magnitude da reação “corpo estranho” e, mais especificamente, o comportamento das células inflamatórias que entram em contato com estas partículas (ZANDSTRA et al., 2014).

Diferentes estudos observaram que partículas de tamanhos muito pequenos – 4 μm a 8 μm – são, geralmente, fagocitadas precocemente pelo organismo e, por outro lado, partículas maiores – 20, 40, 100 μm ou tamanho superior – podem não ser totalmente reabsorvidas em tempo desejado e, conseqüentemente, encapsuladas por tecido conjuntivo fibroso (LEMPERLE et al., 2004). Embora alguns estudos tenham utilizado partículas com diâmetros que variavam entre 250-425 μm (BARRETO, 2011; CARVALHO, 2010) e 425-600 μm , (BARRETO, 2008; PAULA et al., 2009; RIBEIRO et al., 2014; ROLIM, 2010; ROSSI et al., 2012) tanto a composição quanto a natureza química dos materiais avaliados eram distintas.

Face ao exposto e à necessidade da realização de estudos padronizados que estabeleçam a correta relação entre dois diferentes tamanhos das partículas e manutenção das características e composição do material com o tipo e local do defeito ósseo, (SICCA et al., 2000) o objetivo do presente trabalho foi analisar histomorfologicamente a influência da diferença entre duas faixas granulométricas de microsferas de HAn/alg na fase inicial do reparo de defeito ósseo crítico em ratos.

METODOLOGIA

BIOMATERIAIS

Os biomateriais avaliados neste estudo foram produzidos, caracterizados e fornecidos pelos pesquisadores do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, Rio de Janeiro. A síntese do biomaterial foi realizada pela mistura de uma solução de hidrogenofosfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$, mantida em pH 11, à uma solução de nitrato de cálcio

tetra hidratado $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$, sob agitação constante. O precipitado resultante foi filtrado e lavado até que o pH verificado das águas de lavagem fosse 7. Em seguida, o sólido obtido foi seco por liofilização durante 24h e, posteriormente, separado usando peneiras com abertura *mesh* desejada; 15g do sólido obtido foram pesados em *becker* e, em seguida, adicionado a uma solução de alginato de sódio, a 1,5% m/v, e misturado vigorosamente até obter uma mistura homogênea. Para obtenção das microesferas, a pasta formada foi extrudada com o auxílio de seringa em solução de cloreto de cálcio 0,15M, em temperatura ambiente. As esferas obtidas foram lavadas e secas em estufa a 50°C. Posteriormente, duas amostras distintas foram tamizadas. A primeira a ser implantada nos animais do grupo M1 foi submetida à tamiz com faixa de 250-425µm. Já a segunda amostra, referente ao grupo M2, à tamiz com faixa de 425-600µm. Logo após, as esferas foram alíquotadas, acondicionadas em tubos *ependorff* e esterilizadas por radiação gama.

AMOSTRA

Este trabalho foi desenvolvido de acordo com as Normas Éticas de Pesquisas em Animais (Lei nº. 11.794 de 2008), após a aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisas no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (Protocolo Nº038/2012). Os procedimentos cirúrgicos experimentais foram realizados no Biotério Central da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

A amostra deste estudo foi composta por 10 ratos da linhagem *Wistar* albinos, machos, adultos, com peso corporal entre 350 e 400g, fornecidos pelo Biotério Central da UEFS. Esses animais foram distribuídos aleatoriamente, para compor dois grupos experimentais (Tabela 1): M1 – defeito ósseo preenchido com microesferas de HAn/alg, com dimensões de 250-425µm; M2 – defeito ósseo preenchido com microesferas de HAn/alg, com dimensões de 425-600µm. Todos os grupos foram avaliados após 15 dias de pós-operatório (Tabela 1):

Tabela 1 – Número de animais de acordo com o grupo experimental e ponto biológico

Grupo Experimental	Animais
M1	5
M2	5
Total	10

PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Previamente aos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos à anestesia com injeção intramuscular de cloridrato de quetamina, na proporção de 0,1mL/100g de massa corpórea, e sedação e analgesia

por injeção intramuscular de cloridrato de xilazina a 2%, na proporção de 0,04mL/100g de massa corpórea, administradas em dose única. Após certificação da ausência de reflexos à dor, os animais foram posicionados em decúbito ventral, para realização da tricotomia e antisepsia do campo operatório com álcool iodado, na região da calvária.

A técnica cirúrgica para confecção do defeito ósseo crítico na calvária foi a mesma descrita em Miguel et al. (2006, 2013). Nesta, o defeito ósseo crítico de aproximadamente 8,5mm de diâmetro e aproximadamente 0,8mm de espessura foi confeccionado pela utilização de fresa trefina de 8mm acoplada ao motor cirúrgico de implante. Em seguida, fez-se o preenchimento do defeito ósseo crítico com as microesferas, de acordo com cada grupo experimental. Por fim, o retalho foi reposicionado e suturado com pontos interrompidos, utilizando-se fio de seda 4.0. Durante todo o experimento, os animais receberam ração e água *ad libitum* em bebedouro usual para ratos e foram mantidos em caixas plásticas individuais identificadas de acordo com o grupo experimental e ponto biológico.

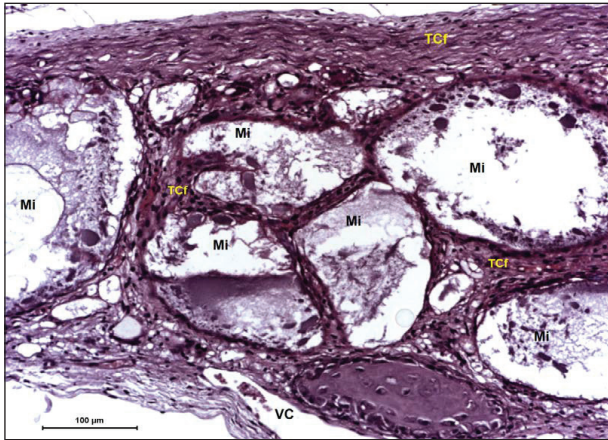
PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Completado o ponto biológico de 15 dias, os animais foram eutanasiados e as calvárias removidas e fixadas em formaldeído tamponado a 4%, por 72 horas. Posteriormente, as amostras foram reduzidas e divididas no diâmetro máximo do defeito crítico, em porção anterior e posterior. A porção posterior de cada espécime foi decalcificada com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), durante sete dias, processadas e incluídas em parafina. Os blocos foram cortados com aproximadamente 5µm de espessura e corados com hematoxilina-eosina (HE) para avaliação histomorfológica, *picrossírius-red* (PIFG), para identificação de proteína colagênica e tricrômico de *Masson-Goldner* (GOLD), para observação de matriz osteoide e células ósseas. Subsequentemente, os cortes histológicos foram analisados em microscópio óptico de luz comum (*LEICA*® – DM1000).

RESULTADOS

A análise histomorfológica evidenciou, no M1, uma disposição em monocamada das microesferas, que apresentaram pequena variação de tamanho em toda região de preenchimento do defeito ósseo. A maioria das esferas manteve-se íntegra, porém, algumas fragmentaram parcial ou totalmente. Ao redor das microesferas observou-se reação inflamatória crônica granulomatosa, com presença de macrófagos, células gigantes multinucleadas e alguns linfócitos, principalmente naquelas localizadas na periferia do defeito ósseo (Figura 1). Já no M2, as microesferas apresentaram-se em multicamadas com fragmentação acentuada. A resposta inflamatória observada foi também do tipo crônica granulomatosa, todavia, bem mais evidente que aquela vista no M1 (Figura 2).

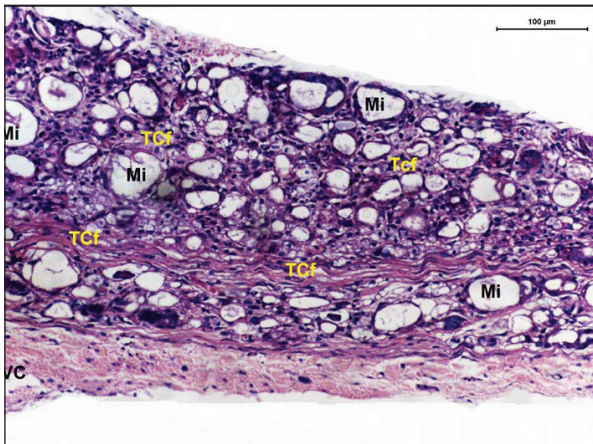
Figura 1 – Fragmentação das microsferas e reação inflamatória crônica no grupo



Nota: Na região central do defeito ósseo, nota-se as células inflamatórias no tecido conjuntivo circunjacente e no interior da microesfera parcialmente fragmentada.

Microesferas (Mi). Tecido conjuntivo frouxo (TCf). Veia Central (VC) HE. Barra 100 µm.

Figura 2 – Fragmentação das microsferas e reação inflamatória crônica no grupo M2



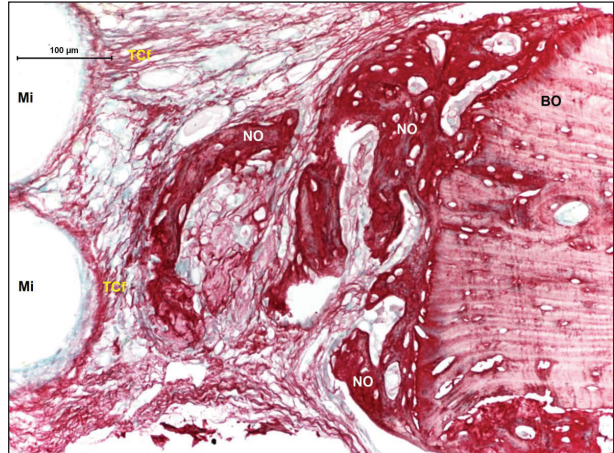
Nota: Na região central do defeito ósseo, com base na visualização da veia central, nota-se intensa inflamação crônica granulomatosa, com presença abundante de células inflamatórias no tecido conjuntivo circunjacente as partículas remanescentes das microsferas que foram fragmentadas.

Microesferas (Mi). Tecido conjuntivo frouxo (TCf). Veia Central (VC). HE. Barra 100 µm.

Em relação à neoformação óssea, a análise histomorfológica evidenciou a deposição de matriz osteoide reacional restrita às bordas do defeito ósseo, com alcance menor que, aproximadamente, cinco centésimos da área total do defeito, tanto no M1 quanto no M2. Circunja-

cente a esta matriz, notou-se a presença de osteoblastos ativos (Figura 3 e 4). Na área remanescente do defeito, em ambos os grupos, o reparo ósseo ocorreu por meio da formação de tecido conjuntivo frouxo, edemaciado, com proliferação de capilares sanguíneos de permeio aos biomateriais, notadamente, mais abundante em M1. A espessura tecidual produzida na região do defeito manteve-se proporcional às bordas ósseas no M1 e no M2 (Figura 5 e 6).

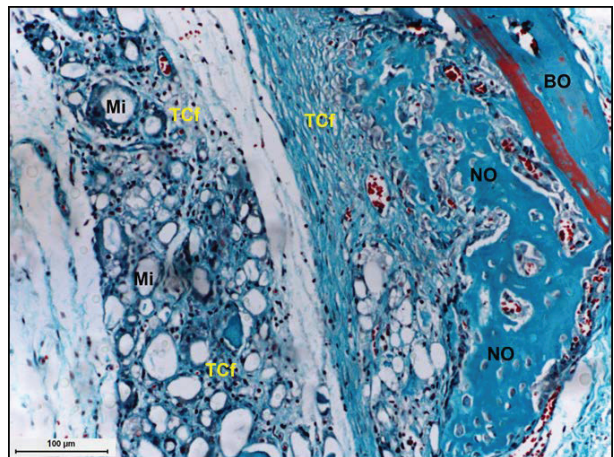
Figura 3 – Região da borda óssea, do grupo M1



Nota: Nota-se neoformação de matriz osteoide reacional, rica em proteína colagênica, destacada pelo PIFG.

Microesferas (Mi). Tecido conjuntivo frouxo (TCf). Neoformação óssea (NO). Borda óssea (BO). PIFG. Barra 100 µm.

Figura 4 – Região da borda óssea, do grupo M2



Nota: Nota-se neoformação de matriz osteoide reacional, rica em proteína colagênica, destacada pelo GOLD.

Microesferas (Mi). Tecido conjuntivo frouxo (TCf). Neoformação óssea (NO). Borda óssea (BO). GOLD. Barra 100 µm.

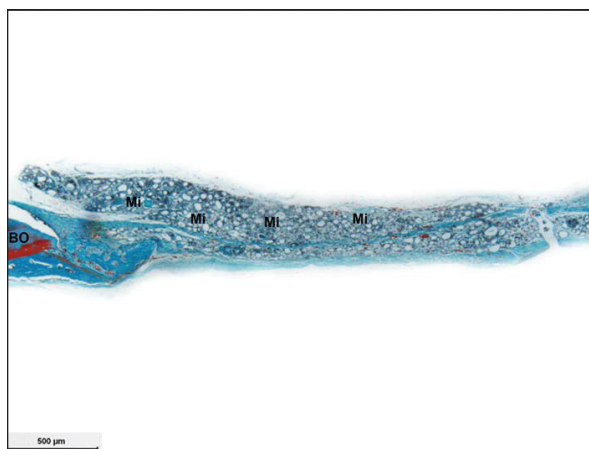
Figura 5 – Análise da espessura do defeito e das bordas no grupo M1



Nota: Nota-se neoformação tecidual na região do defeito ósseo, com implantação dos biomateriais, com espessura proporcional àquela da região da borda óssea.

Microesferas (Mi). Borda óssea (BO). PIFG. Barra 500 µm.

Figura 6 – M2. Análise da espessura do defeito e das bordas do grupo M2



Nota: Observa-se que houve neoformação tecidual na região do defeito ósseo, com implantação dos biomateriais, onde manteve espessura proporcional àquela da região da borda óssea.

Microesferas (Mi). Borda óssea (BO). GOLD. Barra 500 µm.

DISCUSSÃO

As pesquisas na área da bioengenharia tecidual óssea têm por principal finalidade o desenvolvimento de técnicas regenerativas ou biomateriais que estimulem os fenômenos biológicos presentes no mecanismo de regeneração óssea. Para isto, os cientistas buscam produzir materiais que apresentem, dentre outras características, biocompatibilidade, biodegradação e bioabsorção ajustável de acordo com a aplicação desejada, e baixo custo de fabricação para maior acessibilidade.

O compósito de Han/alg utilizado neste estudo foi resultante da associação de um biomaterial cerâmico – a

HA – e um polímero natural – o alginato – com a união das propriedades de ambos os substratos que mimetizam a MEC óssea, formada por componentes orgânicos e inorgânicos. Essa associação é capaz de otimizar, dentre outras propriedades físico-químicas, a osteocondutividade, a biocompatibilidade e taxa de biodegradação e bioabsorção do compósito, o que o torna promissor para aplicações como substituto ósseo.

Há de se destacar que, principalmente, devido aos métodos de síntese e processamento dos biomateriais do presente estudo, os tamanhos das microesferas, de cada amostra, M1 e M2, apresentaram variação em relação a sua esfericidade, uniformidade e distribuição do tamanho das partículas. Desta forma, tendo em vista o fato das partículas do grupo M1 apresentar faixa granulométrica de 250-425µm, e do grupo M2 de 425-600µm, levou-se em consideração que, antes da implantação, a variação entre o tamanho das microesferas dentro de cada grupo poderia resultar em heterogeneidade da distribuição espacial dos biomateriais no defeito ósseo. Contudo, a avaliação microscópica evidenciou que, após implantação, as microesferas do grupo M1 apresentaram homogeneidade de tamanho das partículas que permitiu uma distribuição espacial, ao longo do defeito ósseo, onde o interstício formado entre as partículas forneceu microambiente mais propício para neoformação óssea, neste ponto biológico (SAHIL et al., 2011). Por outro lado, as microesferas do M2 se fragmentaram de forma exacerbada.

A distribuição das partículas também promoveu mecanismo de angiogênese mais evidente, associada à maior integridade das microesferas do grupo M1 em relação ao grupo M2, que favoreceu uma neoformação tecidual mais notória devido ao maior influxo de nutrientes pelos vasos sanguíneos (VENKATESAN et al., 2015) e arcabouço mantido pela permanência das esferas no sítio de implantação, o que é essencial para a regeneração óssea, pois a velocidade da biodegradação e biorreabsorção influenciam diretamente a neoformação tecidual óssea. (LIU; MA, 2004) Nosso estudo corrobora com Barreto (2011), que também avaliou microesferas com o mesmo diâmetro daquelas do grupo M1, e também observou-se que não houve biodegradação e bioabsorção expressiva das mesmas. A ausência de arcabouço 3D compromete os eventos celulares envolvidos na regeneração e culmina em reparo ósseo por fibrose (BARRETO, 2011; MIGUEL et al., 2013).

A fragmentação exacerbada dos biomateriais, observada em M2, diferencia-se daqueles descritos por Paula et al. (2009) e Ribeiro et al. (2014), quando utilizaram microesferas de diâmetro semelhante, 400µm e de 425-600µm, respectivamente. Nesses estudos, houve biodegradação parcial das microesferas, com formação de fibras de colágeno no interior dos biomateriais, enquanto que no nosso estudo notou-se uma fragmentação acentuada das esferas. Isto limitou o potencial osteogênico dos biomateriais, visto que, em um curto intervalo de tempo, os osteoblastos do tecido ósseo remanescente não dis-

puseram de arcabouço 3D necessário para a regeneração óssea. Todavia, nos estudos supracitados, as microesferas de HA foram produzidas com 1% de alginato, enquanto que as esferas do presente estudo foram sintetizadas com 1,5% deste polímero. É possível que tenha influência do alginato na composição química do arcabouço, de forma que o componente orgânico, em maior quantidade no nosso estudo, ao entrar em contato com os fluidos teciduais, desencadeou uma dissolução mais rápida pelas enzimas contidas teciduais (CHAE et al., 2013).

Os núcleos de matriz osteoide neoformados no interior das microesferas, parcialmente biodegradadas, no grupo M1, com presença osteócitos aprisionados e viáveis, mostram que, como proposto Valenzuela et al. (2012), os cristais de HA nanoestruturados podem se dissolver mais rapidamente devido à maior área de superfície exposta ao ambiente biológico e acelerar a velocidade de formação e crescimento da camada de apatita biologicamente ativa e potencializar a interligação química entre os biomateriais e o osso neoformado, com conseqüente adesão, seguida de diferenciação das células-tronco locais.

Por outro lado, como observado em M2, a grande quantidade de macrófagos, linfócitos, células gigantes multinucleadas e fibroblastos, de permeio ao tecido conjuntivo formado entre as partículas residuais das microesferas, reforça a premissa de que quanto menor a partícula, maior será a área superficial de contato entre estas e o estroma circundante e, conseqüentemente, maior será a resposta celular modulada pelos biomateriais.

Apesar das diferenças observadas entre os grupos M1 e M2, em relação à resposta tecidual, é comum destacar a presença de inflamação crônica granulomatosa, após implantação *in vivo* dos biomateriais (ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008), como observado por outros trabalhos que também avaliaram biomateriais para regeneração óssea (CARDOSO et al., 2006; MIGUEL et al., 2006, 2013). Junto a isto, o fato de não ter havido rejeição pelo organismo, o que seria caracterizado por resposta inflamatória aguda exacerbada, comprova que os biomateriais avaliados no nosso estudo foram biocompatíveis. Essa potencialidade pode ser atribuída, principalmente, a composição físico-química dos biomateriais, formada por moléculas e íons que mimetizam a porção inorgânica do tecido ósseo natural (HA), bem devido às propriedades ultraestruturais do alginato, que otimiza este CaP e torna a estrutura do arcabouço atrativo para as células e viabiliza sua atividade.

Os resultados histológicos deste trabalho evidenciaram que os biomateriais formaram um arcabouço 3D favorável à neoformação tecidual, semelhante à espessura do tecido ósseo remanescente, tanto no grupo M1 quanto no grupo M2. No entanto, o grupo de faixa granulométrica menor, M1, permitiu a formação de interstício entre as partículas de forma mais regular quanto ao tamanho e quanto à sua distribuição ao longo do defeito. Estas partículas mantiveram-se mais íntegras, o que favoreceu a formação de micro ambiente mais propício para neoformação óssea.

CONCLUSÃO

Conclui-se que, na fase inicial do reparo ósseo, o tamanho da microesfera influenciou, especialmente, na disposição espacial das partículas e as microesferas de faixa granulométrica menor – de 250-425µm – apresentaram melhor arcabouço de preenchimento e distribuição ao longo do defeito, mais favoráveis à regeneração óssea, em relação às partículas de faixa granulométrica de 425-600µm.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. S. **Obtenção e caracterização de nanocompósitos de poli(l-lactídeo) e nanopartículas de argila sódica, argilas organofílicas e óxidos de sílica**. 2010. 132 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Polímeros) – Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
- ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin. Immunol.*, Philadelphia, v. 20, p. 86-100, 2008.
- BARRETO, I. C. **Utilização de microesferas de hidroxiapatita no reparo de defeitos críticos em calvária de rato**. 2008. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro/Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2008.
- _____. **Utilização de ranelato de estrôncio associado a biometrias para regeneração óssea**. 2011. 176f. Tese (Doutorado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.
- BRUN, F. et al. Automated quantitative characterization of alginate/hydroxyapatite bone tissue engineering scaffolds by means of micro-CT image analysis. *J. Mater. Sci., Mater. Med.*, London, v. 22, n. 12, p. 2617-2629, 2011.
- CARDOSO, A. K. M. V. et al. Histomorphometric analysis of tissue responses to bioactive glass implants in critical defects in rat calvaria. *Cells Tissues Organs*, [Basel], v. 184, n. 3-4, p. 128-137, 2006.
- CARVALHO, A. C. A. **Reparo ósseo de defeito crítico em calvária de rato com microesferas de hidroxiapatita e selante de fibrina**. 2010. 120 f. Dissertação (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.
- CHAE, T. et al. Novel biomimetic hydroxyapatite/alginate nanocomposite fibrous scaffolds for bone tissue regeneration. *J. Mater. Sci., Mater. Med.*, London, v. 24, n. 8, p. 1885-1894, 2013.
- KASAJ, A. et al. Clinical evaluation of nanocrystalline hydroxyapatite paste in the treatment of human periodontal bony defects--a randomized controlled clinical trial: 6-month results. *J. Periodontol.*, Indianapolis, v. 79, n. 3, p. 394-400, 2008.
- LEMPERLE, G. et al. Migration studies and histology of injectable microspheres of different sizes in mice. *Plast. Reconstr. Surg.*, Baltimore, v. 113, n. 5, p. 1380-1390, 2004.
- LIU, X.; MA, P. X. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann. Biomed. Eng.*, v. 32, n. 4, p. 477-486, 2004.
- MIGUEL, F. B. et al. Morphological assessment of the behavior of three-dimensional anionic collagen matrices in bone regeneration in rats. *J. Biomed. Mater. Res.*, Hoboken, v. 78, n. 2, p. 334-339, 2006.
- _____. Regeneration of critical bone defects with anionic collagen matrix as scaffolds. *J. Mater. Sci., Mater. Med.*, London, v. 24, n. 11, p. 2467-2575, 2013.

14. PARK, J. H. et al. Preparation of in situ hardening composite micro-carriers: calcium phosphate cement combined with alginate for bone regeneration. **J. Biomater. Appl.**, v. 28, n. 7, p. 1079-1084, 2014.
15. PAULA, F. L. et al. Hidroxiapatite-alginate biocomposite promotes bone mineralization in different length scales *in vivo*. **Front. Mater. Sci. China**, [China], v. 3, n. 2, p. 145-153, 2009.
16. PICCININI, M. **Porous calcium phosphate granules for biomedical applications**. Thesis (Doctoral School in Materials Science and Engineering) – Department of Materials Engineering and Industrial Technologies, University of Trento, Italy, 2012.
17. RIBEIRO, I. Í. A. **Estudo da implantação *in vivo* de biomateriais compostos de fosfato de cálcio e polímero**. 2013. 78 f. Dissertação (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.
18. _____. et al. Biocerâmicas e polímero para a regeneração de defeitos ósseos críticos. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.**, Salvador, v. 13, p. 298-302, 2014.
19. ROLIM, A. E. H. **Avaliação de microesferas de hidroxiapatita, dopadas ou não com estrôncio, no reparo de defeito ósseo crítico, em calvária de rato**. 2010. 91 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.
20. ROSSI, A. L. et al. Ultrastructure of regenerated bone mineral surrounding hydroxyapatite alginate composite and sintered hydroxyapatite. **Bone**, New York, v. 50, b.1, p. 301-310, 2012.
21. SAHIL, K. et al. Microsphere: a review. **Int. J. Res. Pharm. Chem.**, [S. I.], v. 1, n. 4, p. 1184-1198, 2011.
22. SARALIDZE, K.; KOOLE, L. H.; KNETSCH, L. W. Polymeric Microspheres for Medical Applications. **Materials**, Switzerland, v. 3, p. 3537-3564, 2010.
23. SICCA, C. M. et al. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito do tamanho da partícula. **Rev. FOB**, Bauru, v. 8, n. 1-2, p.1-10, jan./jun, 2000.
24. STRIETZEL, F. P.; REICHART, P. A.; GRAF, H. L. Lateral alveolar ridge augmentation using a synthetic nano-crystalline hydroxyapatite bone substitution material (Ostim): preliminary clinical and histological results. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 18, n. 6, p. 743-751, 2007.
25. TELLEMAN, G. et al. Peri-implant endosseous healing properties of dual acid-etched mini-implants with a nanometer-sized deposition of CaP: a histological and histomorphometric human study. **Clin. Implant. Dent. Relat. Res.**, Hamilton, v. 12, n. 2, p. 153-160, 2010.
26. VALENZUELA, F. et al. Preparation and bioactive properties of novel bone-repair bionanocomposites based on hydroxyapatite and bioactive glass nanoparticles. **J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.**, v. 100, n. 6, p.1672-1682, 2012.
27. VASCONCELOS, L. Q. et al. Utilização de nanobiomateriais na regeneração óssea: uma revisão baseada em ensaios clínicos. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.**, Salvador, v. 13, p. 377-380, 2014.
28. VENKATESAN, J. et al. Alginate composites for bone tissue engineering: a review. **Int. J. Biol. Macromol.**, Guildford, v. 72, p. 269-281, 2015.
29. WALMSLEY, G. G. et al. Nanotechnology in bone tissue engineering. **Nanomedicine**, New York, v.11, n. 5, p. 1253-1263, 2015.
30. ZANDSTRA, J. et al. Microsphere size influences the foreign body reaction. **Eur. Cell. Mater.**, Wales, v. 28, p. 335-347, 2014.

Submetido em: 27/10/2016

Aceito em: 10/11/2016