

Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras

Biomaterials for bone regeneration – Methods of analyses and future perspectives

Luciana Soares de Andrade Freitas Oliveira¹, Conceição Silva Oliveira¹, Ana Paula Lobo Machado¹, Fabiana Paim Rosa²
¹Mestranda do Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas – Instituto de Ciências da Saúde, UFBA, Salvador, Bahia, Brasil; ²Professora do Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas – Instituto de Ciências da Saúde, UFBA, Salvador, Bahia, Brasil

Resumo

A bioengenharia tecidual visa criar e aprimorar novas terapias e/ou desenvolver novos biomateriais que restaurem, melhorem ou impeçam o agravamento da função tecidual comprometida. Essa especialidade possui diversas aplicações, como, por exemplo, em situações com grande perda de integridade tecidual resultante de traumas, deformidades do desenvolvimento e doenças. Na perda ou comprometimento do tecido ósseo, vários biomateriais naturais ou sintéticos, como polímeros, cerâmicas e metais ou seus compósitos tem sido investigados e utilizados de diferentes maneiras, como uma alternativa aos enxertos ósseos. Para comprovar a eficácia destes biomateriais, testes *in vivo* podem ser realizados, e uma forma adequada de se avaliar os componentes celulares envolvidos na regeneração tecidual é a análise de biópsias através da microscopia eletrônica. O objetivo deste trabalho é, portanto, realizar uma revisão de literatura sobre os principais biomateriais utilizados na regeneração óssea, a contribuição da microscopia eletrônica e perspectivas futuras.

Palavras-chave: Regeneração Óssea – Engenharia Tecidual – Cerâmica – Microscopia Eletrônica – Materiais Biocompatíveis.

Abstract

The main objective of Tissue Engineering is to create and improve therapies and/or develop new biomaterials that restore, maintain or improve the tissue's function. It may be applied when extensive defects caused by traumas, development deformities or illness are present. Many bone grafts have been developed. They may come from natural or synthetic origin, as polymers, ceramics and metals, or composites derived from these materials. To prove the efficacy of these biomaterials, *in vivo* tests may be applied like biopsies and electron microscopy, which may be an adequate manner of visualizing the cells involved in tissue regeneration. The purpose of this article consists in making literature review about the main biomaterials applied in the bone's regeneration, the electron microscopy's contributions and the future perspectives in this field.

Keywords: Bone's Regeneration – Tissue Engineering – Ceramics – Electron Microscopy – Biocompatible Materials.

INTRODUÇÃO

A bioengenharia tecidual é um campo multidisciplinar que envolve a aplicação de princípios e métodos da engenharia e das ciências da saúde para assistir e acelerar a regeneração e o reparo de tecidos defeituosos ou danificados (TABATA, 2009). Deste modo, essa ciência visa criar e aprimorar novas terapias e/ou desenvolver novos biomateriais que restaurem, melhorem ou impeçam o agravamento da função tecidual comprometida (KAIGER; MOONEY, 2001; SACHLOS; CZERNUSZKA, 2003; MARINS et al., 2004).

Essa especialidade possui diversas aplicações, como em situações com grande perda de integridade tecidual resultante de traumas, deformidades do desenvolvimento e doenças (YOUNG et al., 2007). Um de seus maiores desafios é o desenvolvimento de biomateriais para a recuperação do tecido ósseo e, atualmente, o aumento

da expectativa de vida da população faz com que a osteoporose seja considerada um problema de saúde pública, levando a maior risco de fraturas ósseas (NAVARRO et al., 2008). As modalidades de tratamento convencional utilizadas na reconstrução do tecido ósseo apresentam resultados muitas vezes aquém do esperado. Não obstante, a inabilidade em restaurar a integridade do esqueleto pode levar a co-morbidades associadas, consultas médicas frequentes, diminuição na qualidade de vida e aumento dos custos médicos (CARLO et al., 2009).

Assim, o principal objetivo da bioengenharia é superar as limitações dos tratamentos convencionais vigentes, baseados na cirurgia reconstrutora ou no transplante de órgãos. Sobretudo, sendo capaz de produzir substitutos para órgãos e tecidos que apresentem tolerância imunológica, o que possibilita sua implantação no paciente sem risco de rejeição pelo organismo (SACHLOS; CZERNUSZKA, 2003).

A aplicação de biomateriais sintéticos na regeneração do tecido ósseo, como uma alternativa aos enxertos ósseos, é relevante, pois eles não danificam tecidos saudáveis, não aumentam os riscos de

Recebido em 22 de janeiro de 2010; revisado em 18 de maio de 2010.

Correspondência / Correspondence: Universidade Federal da Bahia. Av. Reitor Miguel Calmon, s/n, Vale do Canela. 40.110-100 Salvador Bahia Brasil.

contaminações virais e bacterianas, além de serem disponibilizados comercialmente (WILLIAMS, 1987). Podem, ainda, ser de fácil dissolução e absorção, ao mesmo tempo em que permitem e estimulam a formação óssea (WAN; NACAMULI; LONGAKER, 2006; CHEN et al., 2009).

O tecido ósseo, por sua vez, está em constante remodelação e sua massa total depende da relação de equilíbrio existente entre a formação e a reabsorção óssea (SILVA et al., 2007). A consolidação do reparo neste tecido está condicionada a determinadas condições, tais como amplo suprimento sanguíneo, estabilidade mecânica, presença de um arcabouço tridimensional e tamanho do sítio lesionado. Em regiões em que a morfologia e dimensão do defeito são extensas e críticas ao reparo, o mecanismo regenerativo torna-se limitado e, desta forma, há formação de cicatriz fibrosa (KIM et al., 2006).

Por isso, os biomateriais utilizados como substitutos do tecido ósseo devem possuir características peculiares. Eles devem ser biocompatíveis, biodegradáveis e osteocondutivos, proporcionando a condução de osteoblastos ou de células precursoras de osteoblastos para o sítio lesado e de fatores regulatórios que promovam esse recrutamento, assim como o crescimento celular neste sítio (LIU; MA, 2004; WAN; NACAMULI; LONGAKER, 2006; CHEN et al., 2009). Além disso, precisam proporcionar uma estrutura adequada, que servirá de suporte para a neoformação óssea (PRECHEUR, 2007).

Esses biomateriais ainda devem possuir função imediata após a implantação e ter habilidade de remodelação e integração com o organismo (VUNJAK-NOVAKOVIC; KAPLAN, 2006). A bioengenharia tecidual, deste modo, visa desenvolver biomateriais com estrutura tridimensional que sirvam de suporte físico estrutural e que afetem a fisiologia celular, estimulando sua migração e diferenciação (LIU; HAN; CZERNUSKA, 2009).

O objetivo desse trabalho é, portanto, o de realizar uma revisão de literatura sobre os principais biomateriais utilizados na regeneração óssea, a aplicação da microscopia eletrônica na bioengenharia óssea e as perspectivas futuras.

TIPOS E CLASSIFICAÇÃO DOS BIOMATERIAIS PARA A REGENERAÇÃO ÓSSEA

Por definição, biomaterial é qualquer substância ou combinação de substâncias, naturais ou não, que não sejam drogas ou fármacos, utilizadas em aplicações biomédicas e que interagem com sistemas biológicos, que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo (VON RECUM; LABERGE, 1995; GIL; FERREIRA, 2006).

A escolha de um material para ser usado como biomaterial depende da análise de uma série de requisitos que devem ser encontrados. Nesse sentido, a biocompatibilidade (efeito do ambiente orgânico no

material e efeito do material no organismo), a biodegradabilidade (fenômeno em que o material é degradado ou solubilizado em fluidos tissulares, desaparecendo do sítio de implantação), bem como a velocidade de degradação do material são características desafiadoras para o desenvolvimento e fundamentais para a escolha de um biomaterial (PEREIRA; VASCONCELOS; ORÉFICE, 1999; TABATA, 2009).

Essas propriedades conferem ao biomaterial uma interação benéfica com o organismo onde é implantado, desde que:

1. O material não desencadeie resposta inflamatória sustentada ou tóxica na sua implantação *in vivo*;
2. O tempo de degradação do material permita a ocorrência do processo de regeneração ou cura do sítio comprometido;
3. O material apresente propriedades mecânicas adequadas à aplicação para que foi indicado e que qualquer variação das propriedades mecânicas decorrente da sua degradação *in vivo* seja compatível com o processo de regeneração ou restabelecimento do sítio de implantação;
4. Sua degradação não gere produtos tóxicos e que sejam facilmente metabolizados e liberados do corpo (CAO; WANG, 2009).

Entretanto, observando-se a evolução dos biomateriais, estes conceitos de biocompatibilidade e biodegradabilidade fazem parte de uma segunda geração de biomateriais. Na primeira geração, foram desenvolvidos os materiais bioinertes, cujo foco para seu desenvolvimento era o de não provocar reação de corpo estranho no organismo (HENCH, 1980). Já a terceira geração, inclui os materiais capazes de estimular respostas celulares específicas no nível molecular (HENCH; POLAK, 2002).

Essas três gerações são interpretadas de forma conceitual e não cronológica, visto que cada uma delas representa uma evolução nas propriedades dos materiais envolvidos, de acordo com as necessidades e exigências que surgiam (NAVARRO et al., 2008).

O uso de biomateriais para substituir a perda óssea tem sido uma prática comum há décadas (CHOW, 2009). Inicialmente, para restituir perdas ósseas os cirurgiões utilizavam autoenxertos, considerados ideais por representarem material do próprio indivíduo. Entretanto, esse procedimento apresenta desvantagens, como maior incidência de enfermidades no sítio doador e tamanho limitado do material passível de doação, que, na maioria das vezes, é insuficiente (OLIVEIRA et al., 2009). Diante dessas limitações, os aloenxertos (compostos de materiais de outro indivíduo da mesma espécie) e os xenoenxertos (materiais obtidos de outra espécie) surgiram como possíveis substitutos. Entretanto, eles também apresentam limitações importantes, como risco de rejeição ou de transmissão de doenças (PRECHEUR, 2007).

Surgiram, então, os enxertos aloplásticos, que correspondem a biomateriais, classificados ou

subdivididos conforme sua origem (natural ou sintética) ou sua composição química (metálicos, cerâmicas, polímeros ou compósitos) (OLIVEIRA et al., 2009). Atualmente, para a utilização como substitutos do tecido ósseo, existem diversos biomateriais disponíveis. Eles variam não somente em relação à sua origem e composição química, mas também quanto à sua ação mecânica e configuração espacial (blocos sólidos, lâminas, esponjas porosas e hidrogéis) (GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; ABUKAWA et al., 2006).

Os primeiros biomateriais metálicos utilizados com sucesso para reparo ósseo foram o aço inoxidável e as ligas de cobalto e cromo, por volta de meados do século XX (CHARNLEY, 1960). A principal característica desses biomateriais é seu potencial de grande resistência à corrosão no ambiente *in vivo*, porém também apresentam boa resistência mecânica, conformabilidade adequada, além de alta resistência à fadiga, à tração e à fratura (RATNER; HOFFMAN; SCHOEN, 2004). A partir desses primeiros biomateriais produzidos, novas constituições de aço inoxidável, assim como novas ligas metálicas, como as de titânio, tem sido produzidas a fim de melhorar suas propriedades de resistência mecânica e anticorrosão (BRANEMARK et al., 1964; BUEHLER; WANG, 1967; LONG; RACK, 1998). Entretanto, alguns elementos metálicos tem demonstrado uma ação tóxica no ambiente *in vivo*, como o Vanádio (V) e o Níquel (Ni) (FRIBERG; NORDBERG; VOUK, 1979; STEINMANN, 1985; THOMPSON; PULEO, 1996; DALEY et al., 2004; SUZUKI et al., 2006).

Os biomateriais metálicos em atrito direto sofrem desgaste acentuado, e sua interação com o tecido adjacente ocasiona a liberação de íons metálicos por dissolução, desgaste ou corrosão (MORAIS; GUIMARÃES; ELIAS, 2007). Desta forma, suas superfícies devem sofrer modificações e associações com outros materiais, como os polímeros, que lhe conferem maior resistência mecânica, permitindo o contato adequado em regiões de grande atrito, como nas próteses de quadril, por exemplo, e minimizando a liberação de íons metálicos por interação do biomaterial com os fluidos fisiológicos (MCKEE; WATSON-FARRA, 1966; WALKER; GOLD, 1971; PUNT et al., 2008).

Outra desvantagem dos biomateriais metálicos relaciona-se à perda do estímulo mecânico no osso, sítio de implante do material, podendo induzir a reabsorção óssea local, que pode, por sua vez, ocasionar a eventual falência e perda do implante (HUISKES; WEINANS; RIETBERGEN, 1992; BAUER; SCHILS, 1999). Além disso, muitos biomateriais metálicos possuem fases ferromagnéticas, produzindo interações adversas em meio a campos magnéticos, atualmente com ampla utilização em métodos diagnósticos como a ressonância magnética (GIORDANI; FERREIRA; BALANCIN, 2007).

Já as cerâmicas podem ser tanto sintéticas quanto naturais e possuem diversas vantagens como biomateriais, para utilização em substituição ao tecido

ósseo, dentre as quais destacam-se: são estruturalmente semelhantes ao componente inorgânico do osso; são biocompatíveis, osteocondutivas e, principalmente, não possuem proteínas em sua composição, o que proporciona ausência de resposta imunológica (ABUKAWA et al., 2006), diminuindo o risco de rejeição pelo organismo (BURG; PORTER; KELLAM, 2000), além de possuírem um alto tempo de degradação *in vivo* (ABUKAWA et al., 2006), permitindo a remodelação óssea no sítio do implante. Suas limitações estão relacionadas à sua baixa rigidez estrutural, de forma que não podem ser utilizadas em regiões de grande esforço mecânico, e à sua natureza porosa, o que aumenta o risco de fraturas (WAN; NACAMULI; LONGAKER, 2006). Estão amplamente indicadas na ortopedia e odontologia no reparo de defeitos ósseos, manutenção do rebordo alveolar e como implantes ortopédicos e dentários (LEGEROS, 2002). As principais cerâmicas disponíveis comercialmente e utilizadas para reparação e substituição do tecido ósseo são a Hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e o β -Tricálcio fosfato ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), a alumina e a zircônia (SARTORIS et al., 1986; BUCHOLZ; CARLTON; HOLMES, 1987; NISHIKAWA; OHGUSHI, 2004).

Quanto aos polímeros, eles podem ser de origem natural ou sintética, e sua principal característica é a biodegradabilidade. Os polímeros sintéticos são geralmente degradados por hidrólise simples, enquanto os polímeros naturais são principalmente degradados enzimaticamente (TABATA, 2009). Ambos, polímeros naturais e sintéticos, tem sido utilizados pela engenharia tecidual para o desenvolvimento de moldes (“*scaffolds*”) tridimensionais para confecção de cartilagens, ligamentos, meniscos e discos intervertebrais, particularmente os polímeros sintéticos biodegradáveis (NAVARRO, 2008). Os principais polímeros utilizados com a finalidade de reparo do tecido ósseo são o ácido poliglicólico (PGA), ácido polilático (PLA), ácido Polihidroxibutirato (PHB) e a policaprolactona (PCL). Dentre suas vantagens, destacam-se o fácil controle de síntese, origem ilimitada, não sofrem degradação mediada por células, são biodegradáveis e biocompatíveis. Porém possuem pouca resistência mecânica, sofrem redução de tamanho ao longo do tempo, a interação célula-polímero é questionável, possuem superfície hidrofóbica e existe a possibilidade de reação tóxica local pela liberação de produtos ácidos de degradação (ABUKAWA et al., 2006; OH et al., 2006; PRECHEUR, 2007). Estão indicados na ortopedia e como dispositivos implantados para liberação de fármacos (OH et al., 2006).

Para solucionar as desvantagens das cerâmicas e polímeros, novos estudos têm sido realizados no intuito de desenvolver biomateriais sintéticos híbridos ou compósitos, que possuam as vantagens das cerâmicas e polímeros, porém com melhores taxas de reabsorção após a implantação e melhor resistência mecânica (WAN; NACAMULI; LONGAKER, 2006).

Idealmente, o enxerto deve propiciar adequada formação óssea no seu sítio de implante e para isso é necessário que três tipos de fenômenos osteogênicos, relacionados ao crescimento ósseo, ocorram: osteoestimulação, osteoindução e osteocondução. A osteoestimulação corresponde à formação de novo osso a partir de osteoblastos derivados do próprio material do enxerto. A osteoindução é a habilidade do material para estimular a migração de células indiferenciadas e induzir sua diferenciação em osteoblastos ativos no sítio de implantação do enxerto, promovendo a formação óssea. Já a osteocondução é a capacidade de o material direcionar ou conduzir o crescimento ósseo em sua superfície (PRECHEUR, 2007).

Intervenções cirúrgicas com utilização de autoenxertos ou aloenxertos podem promover o reparo do defeito ósseo em vários graus. Contudo, nenhum dos autoenxertos ou aloenxertos utilizados na prática corrente agrega todas as características ideais para a formação óssea adequada, quais sejam: alta osteoindutividade e potencial angiogênico, segurança biológica, baixa morbidade para o paciente, não ter restrições de quantidade, ser de fácil e rápido acesso para os cirurgiões e de custo razoável. Por sua vez, os enxertos ósseos engenherados demonstram capacidade para osteogênese, pela osteoestimulação, osteoindução e osteointegração (conexão funcional entre o sítio de implantação e o enxerto) (FRÖHLICH; GRAYSON; WAN, 2008).

Os biomateriais utilizados na regeneração óssea, independentemente de serem permanentes ou biodegradáveis, naturais ou sintéticos, necessitam ser biocompatíveis e idealmente osteoindutivos, osteocondutivos, porosos, integrativos e mecanicamente compatíveis com o osso nativo (EL-GHANNAM, 2005).

Mais recentemente, visando melhorar a qualidade do reparo e a regeneração óssea, tem-se utilizado células cultivadas e fatores de crescimento associados a biomateriais em *scaffolds* (OLIVEIRA *et al.*, 2009). A promessa da engenharia tecidual é a de combinar os avanços no campo dos biomateriais e da biologia celular, de modo que os enxertos ósseos possam abranger a maioria ou todas as características citadas. Até o momento, o foco da bioengenharia tecidual tem sido a criação de tecido para enxerto, capaz de promover ou aumentar a osteogênese no sítio de defeito ósseo (FRÖHLICH; GRAYSON; WAN, 2008).

BIOMATERIAIS EM SCAFFOLDS

Biomateriais em *scaffolds* são aqueles que possuem arcabouço tridimensional poroso, propriedades bioativas e biodegradáveis, que servem de molde para a formação do novo tecido (LIU; MA, 2004). Devem possuir uma estrutura tridimensional que mimetize os meios físicos e químicos do tecido saudável, para guiar a migração, diferenciação e proliferação tecidual (VUNJAK-NOVAKOVIC; KAPLAN, 2006; TAYLOR; KHAN; LAURENCIN, 2009).

Os *scaffolds* normalmente possuem propriedades osteocondutivas, e raramente propriedades osteoindutivas ou osteogênicas, além de possuírem a grande vantagem de servir de suporte mecânico (BLOM, 2007).

Quando utilizados para regeneração do tecido ósseo os *scaffolds* podem ser classificados em dois tipos: arcabouços que induzem a migração e o crescimento celular, provenientes de tecidos vizinhos, para a formação de tecido ósseo; arcabouços carreadores de células osteogênicas autógenas, que foram colonizadas em biorreatores e subsequentemente reimplantadas no paciente (BURG; PORTER; KELLAM, 2000; CHAN *et al.*, 2009). Eles podem ser de origem natural, como as cerâmicas, a exemplo do coral; sintéticos bioabsorvíveis, como o PGLA (Poli ácido glicólico - ácido láctico), caprolactama (CPL) e cerâmicas porosas; ou híbridos (AHSAN; NEREM, 2005; HUTMACHER *et al.*, 2007).

As propriedades mecânicas e de degradação estão diretamente relacionadas com o material que compõe o *scaffold*. Dessa forma, as principais interações biológicas, como adesão entre proteínas e peptídeos, adesão celular, migração, proliferação e diferenciação, são funções primárias das propriedades de superfície do material em questão (HUTMACHER *et al.*, 2007).

Para atuar como substituto ósseo adequado, o biomaterial em *scaffold* deve ser poroso, de diâmetro adequado e com boa conexão entre os poros (YOSHIKAWA *et al.*, 2009) para permitir adequada nutrição celular e crescimento tecidual. A porosidade, desta forma, irá permitir a migração e proliferação de osteoblastos e células mesenquimais, além da deposição de matriz óssea nos espaços vazios (MASTROGIACOMO *et al.*, 2006).

Como o biomaterial deve mimetizar a morfologia, estrutura e função óssea para otimizar a integração com os tecidos vizinhos (KARAGEORGIU; KAPLAN, 2005), sua estrutura deve ser altamente porosa, cerca de 90%, quando utilizado como molde para o osso trabecular (LIU; MA, 2004; KLEIN *et al.*, 2009). Desta forma, esta estrutura deve possuir macroporos, com tamanho entre 200-400µm para que ocorra uma adequada formação óssea (MASTROGIACOMO *et al.*, 2006; KLEIN *et al.*, 2009). A interconexão entre esses poros desempenha papel fundamental neste processo, por permitir adequada migração e proliferação dos vasos sanguíneos, condição que consiste na base para o crescimento tecidual. Além de fornecer nutrientes, a vascularização, irá coordenar a atividade das células ósseas e sua migração para o sítio de implantação (MASTROGIACOMO *et al.*, 2006).

Para facilitar o processo de formação e migração de tecido vascular e de células progenitoras para o sítio de implantação, novos biomateriais estão sendo confeccionados no intuito de direcionar um comportamento celular específico e para responder a sinais celulares específicos (ANDERSON; BURDICK; LANGER, 2004). Para isso, podem-se adicionar à estrutura do biomaterial fatores de crescimento que aumentam a

sua efetividade, como o fator de crescimento endotelial vascular ou a proteína óssea morfogênica, ou, ainda, sequências específicas de peptídeos (BURG; PORTER; KELLAM, 2000; AHSAN; NEREM, 2005; ABUKAWA et al., 2006).

Os biomateriais podem atuar, ainda, como sistemas de liberação de fármacos através de um mecanismo funcional de sensibilidade a mínimos estímulos do meio, como alteração na temperatura, força iônica e no pH local. Dessa forma, alterações no pH levam a alterações conformacionais, fazendo com que o biomaterial saia de um estado estável e passe para um estado ativo, o que permite a liberação de drogas para o meio (STAYTON et al., 2005).

A grande vantagem desta nova classe de biomateriais denominados de biomateriais inteligentes é o de promover uma invasão capilar precoce, manutenção da atividade celular e de fenótipo adequado, induzir diferenciação das células progenitoras em osteoblastos (ABUKAWA et al., 2006). Desse modo, direcionam a adesão, migração e proliferação celular, além de ser possível controlar a sua taxa de degradação, ao se alterarem suas características físicas e químicas (FURTH; ATALA; VAN DYKE, 2007). Todas essas características são essenciais para uma regeneração óssea adequada, porém essas vantagens podem ser perdidas caso o biomaterial não seja implantado de forma correta (ANDERSON; BURDICK; LANGER, 2004).

Alguns fatores ainda devem ser esclarecidos para que esses materiais revolucionem a prática clínica, como o desenvolvimento de mecanismos que permitam a liberação de fármacos a níveis terapêuticos (ABUKAWA et al., 2006). Outro fator está relacionado ao sítio receptor, já que teoricamente estes mecanismos foram desenvolvidos no intuito de se obter uma resposta máxima do hospedeiro. Porém, se o sítio receptor não estiver saudável, seja por infecções ou por sequelas de irradiação, as funções fisiológicas podem não funcionar adequadamente e a regeneração óssea não ocorrer da maneira esperada (CALVERT; WEISS; SUNDINE, 2003). Uma maneira adequada de se avaliar a resposta do organismo ao biomaterial é através da microscopia eletrônica.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA

A principal função de qualquer microscópio é tornar visível ao olho humano o que for muito pequeno para tal. A forma mais antiga e usual é a lupa, seguida do microscópio óptico, que ilumina o objeto com luz visível ou luz ultravioleta. O limite máximo de resolução dos microscópios ópticos é estabelecido pelos efeitos de difração, devido ao comprimento de onda da radiação incidente (KESTENBACHK, 1994).

Um microscópio eletrônico de varredura (MEV) utiliza um feixe de elétrons no lugar de fótons utilizados em um microscópio óptico convencional, o que permite solucionar o problema de resolução relacionado com a fonte de luz branca (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

A microscopia eletrônica tem sido uma ferramenta de trabalho utilizada pelos pesquisadores em várias áreas de concentração, uma vez que ela abrange um conjunto de técnicas que possibilitam a caracterização da morfologia do material, composição química e determinação da estrutura atômica, tanto de metais, cerâmicas e polímeros, como de espécimes biológicas. Estudos histológicos e de microscopia eletrônica de varredura têm demonstrado análises morfológicas de partículas de substituição do osso, incluindo medições do tamanho de partícula, e resultados sugerem que o tamanho da partícula pode interferir na atividade de reabsorção celular osteoclástica (HOLINK et al., 1979; CRUZ et al., 2007).

A microscopia eletrônica de varredura possui diversas aplicações na bioengenharia tecidual: visualizar arcabouços porosos de forma adequada, possibilitando, inclusive, observar as interconexões entre os poros (OSATHANON et al., 2008; YU et al., 2008); visualizar a interface entre materiais bioativos e o osso (NI et al., 2006); avaliar citocompatibilidade de amostras (OSATHANON et al., 2008); observar a proliferação endotelial (YU et al., 2009); visualizar morfologia de superfície, antes do tratamento e após implantação no sítio receptor (YU et al., 2008; MALAFAYA; REIS, 2009); assim como a visualização de pequenos defeitos da estrutura, como, por exemplo, a presença de microfissuras e a sua quantidade (CARDOSO et al., 2006). Esse exame é, portanto, muito importante na caracterização do biomaterial, por possibilitar visualizar além da sua morfologia, a sua textura (BARRETO, 2008).

Apesar de sua grande aplicação clínica, esse método de análise possui algumas limitações, uma vez que fornece informações apenas em duas dimensões. A microtomografia computadorizada (μ -TC) é um método que soluciona essa limitação da ME, além de permitir a quantificação das propriedades estruturais dos tecidos duros (KLEIN et al., 2009). Outra limitação da ME está relacionada ao fato de ser um método invasivo, envolvendo a realização de biópsias teciduais, enquanto μ -TC é um método não-invasivo (COOPER et al., 2004). Em contrapartida, a ME permite a visualização dos componentes celulares envolvidos no processo de regeneração do tecido ósseo, característica que a μ -TC não possui.

A utilização de MEV depende, então, do objetivo de cada observação. No caso de maiores resoluções, é recomendado utilizar um Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET), o que requer, na maioria das vezes, a ultramicrotomia de filmes finos em amostras sólidas, podendo causar uma série de riscos indesejáveis à análise do material. Em contraste, o MEV permite observações diretas da estrutura polimérica, sendo a principal vantagem o método simples de preparação na maioria dos casos, além de fornecer riqueza de detalhes visuais e de precisão para medições de tamanho de partícula. Contudo sua resolução é inferior à do MET e,

muitas vezes, não é possível chegar a resoluções necessárias para o estudo (HOLINK *et al.*, 1979; CRUZ *et al.*, 2007).

A caracterização da microestrutura pode ser realizada em uma escala de dimensões que variam de alguns milímetros a frações nanométricas. O MEV é usado para estudar as superfícies dos materiais poliméricos, tais como, plásticos, filmes, membranas, fibras e compósitos (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

O MEV é um aparelho que pode fornecer rapidamente informações sobre a morfologia, topografia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida, necessárias para se entender o comportamento das superfícies. Sua utilização é comum em biologia, odontologia, farmácia, engenharia, química, metalurgia, física, medicina e geologia (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007; FOOK, 2008). Este aparelho é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos. Os modos de contrastes diferentes permitem melhorar tanto a topografia induzida por deformação plástica e danos, ou a heterogeneidade na composição química ou na orientação cristalográfica (NAGATANI *et al.*, 1987; BRETHERAU; CREPIN; BORNERT, 2001).

A principal razão de sua utilidade é a alta resolução que pode ser obtida quando as amostras são observadas; valores da ordem de 2 a 5 nanômetros (nm) são geralmente apresentados por instrumentos comerciais, enquanto instrumentos de pesquisa avançada são capazes de alcançar uma resolução melhor que 1 nm (NAGATANI *et al.*, 1987).

A MEV, com uma grande câmara, é essencial para a instalação de fases de testes mecânicos *in situ* adequados para amostra muito maior do que as heterogeneidades do material microestrutural (BRETHERAU; CREPIN; BORNERT, 2001).

Outra característica importante do MEV é a aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo. Permite, também, o exame em pequenos aumentos e com grande profundidade de foco, o que é extremamente útil, pois a imagem eletrônica complementa a informação dada pela imagem óptica (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O paradigma clássico da bioengenharia tecidual consiste na integração entre biomaterial, células e fatores de crescimento. O primeiro fornece a base para que as células depositem a matriz tecidual, enquanto os fatores de crescimento direcionam as células para um fenótipo mais adequado (CALVERT; WEISS; SUNDINE, 2003). O desenvolvimento de tecnologias que permitam uma correta integração entre esses três componentes levaria a um melhor prognóstico e a um resultado mais adequado do tratamento. O controle mais preciso sobre este processo poderia, ainda, levar a uma redução de custos e do trauma cirúrgico.

A ME se apresenta como método indicado para a avaliação desse processo *in vitro* ou em *ex vivo*, porém, como envolve a realização de biópsias teciduais, não é o método mais adequado para avaliação em tratamentos clínicos. A microtomografia computadorizada seria uma solução nestes casos, mas esta permite apenas uma avaliação da regeneração óssea, não sendo possível analisar os componentes celulares envolvidos neste processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUKAWA, H. *et al.* The Engineering of Craniofacial Tissues in the Laboratory: A Review of Biomaterials for Scaffolds and Implant Coatings. *Dent. Clin. N. Am.*, v.50, p.205-216, 2006.
- AHSAN, T.; NEREM, R.M. Bioengineered tissues: the science, the technology, and the industry. *Orthod. Craniofacial Res.*, v.8, p.134-140, 2005.
- ANDERSON, D.G.; BURDICK, J.A.; LANGER, R. Smart Biomaterials. *Science*, v.305, n.5692, p.1923-1924, 2004.
- BARRETO, I.C. **Utilização de microesferas de hidroxiapatita no reparo de defeitos críticos em calvária de rato**. 2008. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- BAUER, T.W.; SCHILS, J. The pathology of total joint arthroplasty. II. Mechanisms of implant failure. *Skeletal Radiol.*, v.28, p.483-497, 1999.
- BLOM, A. Which scaffold for which application?. *Curr. Orthop.*, v.21, p.280-287, 2007.
- BRANEMARK, P.I. *et al.* Regeneration of bone marrow. *Acta Anat.*, v.59, p.1-46, 1964.
- BRETHERAU, T.; CREPIN, J.; BORNERT, M. Materials mechanics inside the scanning electron microscope. *Rev. Latin Am. Met. Mat.*, v.2, n.2, p.21-26, 2001.
- BUCHOLZ, R.W.; CARLTON, A.; HOLMES, R.E. Hydroxyapatite and tricalcium phosphate bone graft substitute. *Orthop. Clin. North Am.*, v.18, p.323-334, 1987.
- BUEHLER, W.J.; WANG, F.E. A summary of recent research on the Nitinol alloys and their potential application in ocean engineering. *Ocean Eng.*, v.1, p.105-120, 1967.
- BURG, K.J.L.; PORTER, S.; KELLAM, J.F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v.21, p.2347-2359, 2000.
- CALVERT, J.W.; WEISS, L.E.; SUNDINE, M.J. New frontiers in bone tissue engineering. *Clin. Plastic Surg.*, v.30, p.641-648, 2003.
- CAO, Y.; WANG, B. Biodegradation of Silk Biomaterials. *Int. J. Mol. Sci.*, v.10, p.1514-1524, 2009.
- 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*, v.184, n.3-4, p.128-137, 2006.
- CARLO, E.C. *et al.* Comparison of In Vivo Properties of Hydroxyapatite-Polyhydroxybutyrate Composites Assessed for Bone Substitution. *J. Craniofac. Surg.*, v.20, p.853-859, 2009.
- CHAN, W.D. *et al.* Tissue Engineering Scaffolds for the Regeneration of Craniofacial Bone. *J. Can. Dent. Assoc.*, v.75, n.5, p.373-377, 2009.
- CHARNLEY, J. Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur. *J. Bone Joint Surg.*, v.42B, p.28-30, 1960.
- CHEN, K-Y. *et al.* Reconstruction of calvarial defect using a tricalcium phosphate-oligomeric proanthocyanidins cross-linked gelatin composite. *Biomaterials*, v.30, n.9, p.1682-1688, 2009.

- CHOW, L.C. Next generation calcium phosphate-based biomaterials. **Dent. Mater. J.**, v.28, n.1, p.1-10, 2009.
- COOPER, D.M. et al. Comparison of micro-computed tomographic and microradiographic measurements of cortical bone porosity. **Calcif. Tissue Int.**, v.74, n.5, p.437-447, 2004.
- CRUZ, G.A. et al. Morphological and chemical analysis of bone substitutes by scanning electron microscopy and microanalysis by spectroscopy of dispersion energy. **Braz. Dent. J.**, v.18, n.2, p.129-133, 2007.
- DALEY, B. et al. Wear debris from hip or knee replacements causes chromosomal damage in human cells in tissue culture. **J. Bone Joint Surg. Br.**, v.86, p.598-606, 2004.
- DEDAVID, B.A.; GOMES, C.I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. Disponível em: < <http://www.pucrs.br/edipucrs/online/microscopia.pdf>>. Acesso em: 20 out 2009.
- EL-GHANNAM, A. Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering. **Expert Rev. Med. Devices**, v.2, n.1, p.87-101, 2005.
- FOOK, A.C.B.M. **Desenvolvimento de biocerâmicas porosas para regeneração óssea**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Campina Grande, 2008.
- FRIBERG, L.; NORDBERG, G.F.; VOUK, V.B. **Handbook on the toxicology of metals**. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier/North-Holland Biomedical, 1979.
- FRÖHLICH, M. et al. Tissue Engineered Bone Grafts: Biological Requirements, Tissue Culture and Clinical Relevance. **Curr. Stem Cell Res. Ther.**, v.3, n.4, p.254-264, 2008.
- FURTH, M.E.; ATALA, A.; VAN DYKE, M.E. Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. **Biomaterials**, v.28, p.5068-5073, 2007.
- GIANNOUDIS, P.V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: An update. **Injury**, v.36, supl.3, p.S20-27, 2005.
- GIL, M.H.; FERREIRA, P. Polissacarídeos como biomateriais. **Química 100**, p.72-74, 2006.
- GIORDANI, E.J.; FERREIRA, I.; BALANCIN, O. Propriedades mecânicas e de corrosão de dois aços inoxidáveis austeníticos utilizados na fabricação de implantes ortopédicos. **Rem: Rev. Esc. Minas**, v.60, n.1, p.55-62, 2007.
- HENCH, L.L. Biomaterials. **Science**, v.208, p.826-831, 1980.
- HENCH, L.; POLAK, J. Third generation biomedical materials. **Science**, v.295, p.1014-1017, 2002.
- HOLINK, A.S. et al. **Microstructural science**, v.7, 1979.
- HUISKES, R.; WEINANS, H.; RIETBERGEN, B.V. The relationship between stress shielding and bone resorption around total hip stems and the effects of flexible materials. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v.274, p.124-134, 1992.
- HUTMACHER, D.W. et al. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. **J. Tissue Eng. Regen. Med.**, v.1, p.245-260, 2007.
- KAIGLER, D.; MOONEY, D. Tissue engineering's impact on dentistry. **J. Dent. Educ.**, v.65, n.5, p.456-462, 2001.
- KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v.26, p.5474-5491, 2005.
- KESTENBACH, H.J.; BOTA FILHO, W.J. **Microscopia eletrônica transmissão e varredura**. São Paulo: ABM, 1994.
- KIM, S-S. et al. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v.27, n.8, p.1399-1409, 2006.
- KLEIN, M. et al. Pore characteristics of bone substitute materials assessed by microcomputed tomography. **Clin. Oral Impl. Res.**, v.20, p.67-74, 2009.
- LEGEROS, R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphates. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v.395, p.81-98, 2002.
- LIU, C.; HAN, Z.; CZERNUSKA, J.T. Gradient collagen/nanohydroxyapatite composite scaffold: Development and characterization. **Acta Biomater.**, v.5, n.2, p.661-669, 2009.
- LIU, X.; MA, P.X. Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **Ann. Biomed. Eng.**, v.32, n.3, p.477-486, 2004.
- LONG, M.; RACK, H.J. Titanium alloys in total joint replacement—a materials science perspective. **Biomaterials**, v.19, p.1621-1639, 1998.
- MALAFAYA, P.B.; REIS, R.L. Bilayered chitosan-based scaffolds for osteochondral tissue engineering: Influence of hydroxyapatite on in vitro cytotoxicity and dynamic bioactivity studies in a specific double-chamber bioreactor. **Acta Biomater.**, v.5, n.2, p.644-660, 2009.
- MARINS, L.V. et al. Radiographic and histological study of perennial bone defect repair in rat calvaria after treatment with blocks of porous bovine organic graft material. **J. Appl. Oral Sci.**, v.12, n.1, p.62-69, 2004.
- MASTROGIACOMO, M. et al. Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. **Biomaterials**, v.27, p.3230-3237, 2006.
- MCKEE, G.K.; WATSON-FARRA, R.J. Replacement of arthritic hips by the McKee-Farrar prosthesis. **J. Bone Joint Surg.**, v.48, p.245-259, 1966.
- MORAIS, L.S.; GUIMARÃES, G.S.; ELIAS, C.N. Liberação de íons por biomateriais metálicos. **Rev. Dent. Press Ortodon. Ortopedi. Facial**, v.12, n.6, p.48-53, 2007.
- NAGATANI, T. et al. Development of an ultra high resolution scanning electron microscope by means of a field emission source and in-lens system. **Scanning Microsc.**, v.11, p.901-909, 1987.
- NAVARRO, M. et al. A. Biomaterials in orthopaedics. **J. R. Soc. Interface**, v.5, p.1137-1158, 2008.
- NI, G.X. et al. Interfacial behavior of strontium-containing hydroxyapatite cement with cancellous and cortical bone. **Biomaterials**, v.27, p.5127-5133, 2006.
- NISHIKAWA, M.; OHGUSHI, H. Calcium phosphate ceramics in Japan. In: YASZEMSKI, M.J.; TRANTOLO, D.J.; LEWANDROWSKI, K.U.; HASIRCI, V.; ALTOBELLI, D.E.; WISE, D.L.(Org.). **Biomaterials in orthopedics**. New York, NY: Marcel Dekker, 2004. p. 425-436.
- OH, S. et al. Bioceramics for Tissue Engineering Applications – A Review. **Am. J. Biochem. & Biotechnol.**, v.2, n.2, p.49-56, 2006.
- OLIVEIRA, S.M. et al. Engineering Endochondral Bone: *In Vivo* Studies. **Tissue Eng. Part A**, v.15, n.3, p.635-643, 2009.
- OSATHANON, T. et al. Microporous nanofibrous fibrin-based scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v.29, n.30, p.4091-4099, 2008.
- PEREIRA, A.P.V.; VASCONCELOS, W.L.; ORÉFICE, R.L. Novos biomateriais: Híbridos Orgânico-Inorgânicos Bioativos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p.104-109, 1999.
- PRECHEUR, H.V. Bone Graft Materials. **Dent. Clin. N. Am.**, v.51, p.729-746, 2007.
- PUNT, I.M. et al. Complications and reoperations of the SB Charité' lumbar disc prosthesis: experience in 75 patients. **Eur. Spine J.**, v.17, p.36-43, 2008.

- RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J. **Biomaterials science. An introduction to materials in medicine**. 2ed. Amsterdam, The Netherlands/New York, NY: Elsevier/Academic Press, 2004.
- SACHLOS, E.; CZERNUSZKA, J.T. Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. **Eur. Cell Mater.**, v.5, p.29-40, 2003.
- SARTORIS, D.J. et al. Coralline hydroxyapatite bone graft substitutes: preliminary report of radiographic evaluation. **Radiology**, v.159, p.133-137, 1986.
- SILVA, A.R.S. et al. Análise da densidade óssea radiográfica de ratos submetidos ao alcoolismo crônico utilizando imagem digital. **Rev. Odonto Cienc.**, v.22, n.55, p.77-81, 2007.
- STAYTON, P.S. et al. "Smart" delivery systems for biomolecular therapeutics. **Orthod. Craniofacial Res.**, v.8, p.219-225, 2005.
- STEINMANN, S.G. **Corrosion of titanium and titanium alloys for surgical implants**. Titanium '84 science and technology. Munich, Germany: Deutsche Gesellschaft für Metallkunde EV, 1985. v. 2.
- SUZUKI, A. et al. Orthodontic buccal tooth movement by nickel-free titanium-based shape memory and superelastic alloy wire. **Angle Orthod.**, v.76, p.1041-1046, 2006.
- TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. **J. R. Soc. Interface**, v.6, p.S311-324, 2009.
- TAYLOR, E.D.; KHAN, Y.; LAURENCIN, C.T. Tissue Engineering of Bone: A Primer for the Practicing Hand Surgeon. **J. Hand Surg. Am.**, v.34, n.1, p.164-166, 2009.
- THOMPSON, G.J.; PULEO, D.A. Ti-6Al-4V ion solution inhibition of osteogenic cell phenotype as a function of differentiation time course in vitro. **Biomaterials**, v.17, p.1949-1054, 1996.
- VON RECUM, A.F.; LABERGE, M. Educational goals for biomaterials science and engineering:perspective view. **J. Appl. Biomater.**, v.6, p.137-144, 1995.
- VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; KAPLAN, D.L. Tissue Engineering: The Next Generation. **Tissue Eng.**, v.12, n.12, p.3261-3263, 2006.
- WALKER, P.S.; GOLD, B.L. The tribology (friction lubrication and wear) of all-metal artificial hip joints. **Wear**, v.17, p.285-299, 1971.
- WAN, D.C.; NACAMULI, R.P.; LONGAKER, M.T. Craniofacial Bone Tissue Engineering. **Dent. Clin. N. Am.**, v.50, n.2, p.175-190, 2006.
- WILLIAMS, D.F. **Definitions in biomaterials**. Elsevier: New York, 1987.
- YOSHIKAWA, H. et al. Interconnected porous hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering. **J. R. Soc. Interface**, v.6, p.S341-348, 2009.
- YOUNG, S. et al. Oral and maxillofacial surgery. In: LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. **Principles of Tissue Engineering**. 3.ed. Elsevier, 2007. cap.71, p.1079- 1094.
- YU, D. et al. Bone regeneration of critical calvarial defect in goat model by PLGA/TCP/rhBMP-2 scaffolds prepared by low-temperature rapidprototyping technology. **Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.**, v.37, p.929-934, 2008.
- YU, H. et al. Improved tissue-engineered bone regeneration by endothelial cell mediated vascularization. **Biomaterials**, v.30, p.508-517, 2009.