



Alexandre Pedro de Almeida Rodrigues Nery

Otimização de um modelo *in vivo* para avaliação de um dispositivo médico implantável em regeneração óssea

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, orientada pela Professora Doutora Isabel Vitória Figueiredo e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Alexandre Pedro de Almeida Rodrigues Nery

Otimização de um modelo *in vivo* para avaliação de um dispositivo médico implantável em regeneração óssea

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, orientada pela Professora Doutora Isabel Vitória Figueiredo e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

“O verdadeiro sinal de inteligência não é conhecimento mas a imaginação”

Albert Einstein

ORIENTADORES:

Professora Doutora Isabel Vitória Figueiredo

Professor Doutor José Maria da Fonte Ferreira

Aqui deixo o mais sincero Obrigado à Professora Doutora Isabel Vitória Figueiredo, por todo o apoio, toda a ajuda e motivação que sempre me deu para conseguir realizar este trabalho, dando uma nova definição àquilo que considero orientação.

Aos meus pais e avós que sempre me deram tudo para poder ir mais além, estando sempre onde, como e quando precisei.

Aos meus amigos que sempre acreditaram em mim e nas minhas capacidades e nunca se cansaram de me motivar.

E à Carmen Pinto que sempre me motivou e ajudou em todas as fases deste trabalho, dando-me sempre a melhor perspetiva sobre o caminho que devia seguir.

Resumo

Muitos esforços têm ocorrido no campo da regeneração de tecidos ósseos especificamente em terapias de cura. Por mais de 50 anos, muitas técnicas foram escolhidas para lidar com defeitos ósseos ou lesões mais graves, que podem restringir os movimentos e atividades do dia-a-dia.

Atualmente são usadas várias técnicas para recuperar defeitos ósseos com base em implantes de biomateriais por forma a criar uma matriz que proporcione as melhores condições para ocorrer a regeneração óssea, tal como uma estrutura estável e os substratos essenciais para este processo.

No desenvolvimento de um dispositivo médico com base num biomaterial é necessário garantir a sua segurança e eficácia para que a sua aplicabilidade clínica seja justificada e favorável. Em todo o processo de avaliação do dispositivo médico é necessário cumprir as considerações legais em vigor, assim como seguir os padrões internacionais que se referem a essa investigação, garantindo a justificação da utilização de animais para esse efeito.

O principal objetivo deste estudo é delinear um modelo *in vivo* de avaliação de um biomaterial e investigar a eficácia da implantação do mesmo no crânio de ratos Wistar, a fim de determinar a extensão da regeneração óssea promovida.

Os resultados deste estudo podem fornecer novas perspetivas para os procedimentos médicos em regeneração óssea, com a demonstração de uma melhoria significativa na eficácia do biomaterial testado relativamente aos biomateriais de referência.

Palavras-Chave

Biomateriais; Biovidros; Regeneração óssea; Implantação; Dispositivos Médicos

Abstract

Many efforts have taken place in the field of tissue regeneration specifically in bone healing therapies. For more than 50 years many techniques have been chosen to deal with bone defects or more severe injuries, which may restrict movements and day-to-day activities.

Currently, there are used several techniques to recover bone defects based on the implant of biomaterials which can create a matrix that will provide the best conditions to bone to heal, such as a stable structure and the essential substrates to that process.

In the development of a medical device based in a biomaterial its necessary to assure the safety and effectiveness to justify its applicability in the clinical use. Throughout the process of evaluation of a medical device it must be guaranteed that all legal and regulatory needs are fulfilled, such as the international standards that refer to the investigation, assuring the justification of the use of animals to that matter.

The main objective of this study is to outline an *in vivo* model to evaluate a biomaterial and study the effectiveness of its implantation in Wistar rat's skull bone in order to determine the extension of the bone healing provided by it.

The results of this study may provide new insights to the medical procedures in bone healing with the demonstration of a significant improvement in the effectiveness of the biomaterial tested relatively to the reference biomaterials.

Keywords

Biomaterials; Bioglasses; Bone regeneration; Implantation; Medical Devices

Índice Geral

Resumo	ii
Palavras-Chave	ii
Abstract	iii
Keywords	iii
Capítulo 1 – Introdução	1
1. Revisão da literatura.....	3
Capítulo 2 – Regulamentação dos Dispositivos Médicos	7
1. Decreto-Lei nº145/2009, 17 de Junho	7
2. Dispositivos Médicos implantáveis biodegradáveis	9
3. Avaliação Biológica de Dispositivos Médicos - ISO 10993.....	10
3.1 Avaliação da Segurança.....	12
3.2 Implantação e Avaliação da Eficácia	12
3.3 Avaliação dos resultados.....	16
Capítulo 3 – Biomateriais e Dispositivos Médicos.....	19
1. Polímeros.....	20
2. Cerâmicas	20
3. Biovidros	21
Capítulo 4 – Definição de objetivos e fundamento experimental	23
1. Objetivos gerais	23
2. Defeito crítico	23
3. Amostra	24
Capítulo 5 – Materiais e Métodos	25
1. Modelo experimental	25
2. Material experimental.....	25
3. Receção, acolhimento e acompanhamento dos animais.....	25
4. Anestesia	26
5. Preparação e posicionamento do animal.....	27
6. Técnica cirúrgica	28
7. Medicação e recobro.....	28
Capítulo 6 – Atividade regenerativa do biomaterial experimental.....	30
Capítulo 7 – Análise crítica e Conclusão	32
1. Perspetiva de resultados	32
2. Limitações.....	33

3. Análise à regulamentação e legislação.....	33
4. Áreas de desenvolvimento futuro.....	34
Referências Bibliográficas.....	36
1. Artigos Científicos.....	36
2. Teses.....	38
3. Legislação.....	38

Lista de Figuras

Figura 1 – Comparação da regeneração óssea após 3 semanas de implantação dos biomateriais; a) Biovidro; b) vitro-cerâmica; c) Hidroxiapatite.....	5
Figura 2 – Classificação de biomateriais	20
Figura 3 – Estrutura tridimensional de scaffold de um biovidro	22
Figura 4 – Fixação do animal na base esterotáxica	27
Figura 5 – Esquematisação do local de incisão e trepanação na calvária do animal	28
Figura 6 – Principais interações entre as células e biomateriais implantados	31

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Sistema de pontuação referente à extensão da regeneração óssea	4
Tabela 2 – Consideração inicial para testes de avaliação	11
Tabela 3 – Compilação de testes para verificação da segurança no âmbito do desenvolvimento de Dispositivos Médicos	14
Tabela 4 – Seleção da duração da implantação a longo prazo	15
Tabela 5 – Sistema de avaliação histológica - resposta celular	17
Tabela 6 – Sistema de avaliação histológica - resposta observacional.....	17
Tabela 7 – Sistema de avaliação semi-quantitativa teste/controlo.....	18

Capítulo I – Introdução

Desde os primórdios da civilização humana que existe a necessidade de correção e/ou substituição de componentes do esqueleto de forma a repor a função biomecânica deste ou de melhorar a qualidade de vida do indivíduo.

Com a evolução da medicina dos últimos séculos, a reparação de defeitos ósseos ou de fraturas resultantes de traumas, tem sido possível melhorar a abordagem a esses tratamentos culminando no atual conhecimento da cirurgia ortopédica e de engenharia de tecidos (D. Williams, 1999).

No âmbito das ciências biomédicas podem-se identificar inúmeras aplicações que visam contribuir para uma melhoria da qualidade de vida, através de métodos de diagnóstico, tratamento e acompanhamento na recuperação dos mais variados tipos de doença e/ou trauma derivado de acidentes. Estas ciências multidisciplinares contam com o conhecimento de profissionais das mais diversas áreas, havendo uma necessidade constante de aglutinar esses saberes num único objetivo focado no problema do doente, para que seja resolvido da forma mais rápida e eficaz (Godbey & Atala, 2002). Esse conhecimento reparte-se pelas áreas da biologia celular, biotecnologia, ciência de biomateriais e bioengenharia em geral, entre outras que poderão dar o seu contributo para que se restaure a função normal celular e/ou a função biomecânica ou metabólica no doente alvo (Burg, Porter, & Kellam, 2000).

Idealmente, a ciência de engenharia de tecidos visa a recreação *in vitro* dos tecidos lesados no doente, com células provenientes desse mesmo indivíduo, com o objetivo de obter um tecido saudável, completo e compatível com essa pessoa, tratando assim de forma absoluta a lesão. Muitas vezes essa abordagem é praticamente impossível, uma vez que existem limitações práticas como a “volatilidade” celular, que é difícil controlar na sua totalidade, existindo sempre variáveis que desequilibram o processo e desviam o resultado do objetivo principal (Ratner, 2004).

Desta forma, as ciências biomédicas tentam encontrar soluções engenhosas para contornar as limitações dos processos de regeneração através de diversas técnicas como a produção de géis, granulados, implantes completos em materiais inertes (Titânio, alumínio, etc.) ou biodegradáveis (biovidros e outras cerâmicas) (Valiathan & Krishnan, 1999).

O que difere os biomateriais de outros materiais utilizados em regeneração óssea é a capacidade que estes têm de interagir e potenciar os processos biológicos sem desencadear efeitos de rejeição adversos que possam lesar os tecidos onde são implantados e desencadear um processo imunológico severo. A definição de biocompatibilidade assenta na

“capacidade de um biomaterial de desempenhar a função desejada no âmbito de uma terapêutica, sem desencadear nenhuma reação adversa local ou sistêmica derivada da constituição do material ou da técnica, atuando de forma a desempenhar uma ação benéfica a nível celular, com uma resposta para a situação em específico, otimizando o desempenho da técnica clínica utilizada” (D. F. Williams, 2008).

Os biovidros são um dos mais promissores substitutos sintéticos de osso devido à sua bioatividade, comparativamente aos materiais baseados em cálcio e fosfatos (Martin et al., 2012), pelas suas capacidades osteoindutiva e osteocondutiva.

A osteoindução é a capacidade de levar células pluripotentes a diferenciarem-se em condrócitos e osteoblastos, culminando na formação de tecido ósseo (Urist, Silverman, Buring, Dubuc, & Rosenberg, 1967). A presença desta capacidade num material resume-se não apenas às características químicas das moléculas que o compõe mas também à sua morfologia, uma vez que a osteoindução se torna inconsequente sem a capacidade de osteocondução.

As células do tecido ósseo necessitam de diversos fatores para proliferarem, assim como de estímulos mecânicos, tão simplesmente como uma superfície propícia à sua adesão. Proteínas como as BMP's (Bone morphogenetic Proteins) e peptídeos como os OGP's (osteogenic growth peptide) são exemplos de ligandos indispensáveis ao processo regenerativo do osso, que têm funções de sinalização e/ou de ativação de cascatas celulares como o no processo de diferenciação dos osteoblastos (Jensen, Gopalakrishnan, & Westendorf, 2010). Desta forma, a combinação entre as condições físicas e químicas do local onde se encontra o tecido ósseo vão condicionar a sua regeneração e metabolismo (Sela & Bab, 2012).

No que concerne à segurança relativa dos biomateriais enquanto dispositivos médicos implantáveis, a legislação em vigor e as *guidelines* de desenvolvimento dos mesmos definem os objetivos e as condições que permitem a sua utilização de forma a reduzir ao máximo os riscos associados à sua aplicação (ISO 10993 e Decreto-Lei n.º 145/2009, de 17 de Junho).

Neste trabalho é abordado e interpretado o Decreto-Lei n.º 145/2009, de 17 de Junho de forma a analisar as condições a que um dispositivo médico se terá que submeter de forma a estar em conformidade legal e obedecer às condições de segurança e estabilidade. O seu desenvolvimento está regulado e orientado sob o domínio da ISO-10993, uma guideline internacional que define todas as condições e limites ao seu desenvolvimento *in vitro* e *in vivo*, abordando igualmente a segurança, assim como a eficácia da utilização clínica do dispositivo médico desenvolvido com base num biomaterial.

Com o cumprimento das considerações legais referidas, os dispositivos médicos seguem para uma fase de escrutínio num processo de avaliação, no qual devem incluir todos os dados recolhidos nas fases de avaliação *in vitro* e *in vivo*, de forma a concluir a elegibilidade do material em estudo para a introdução no mercado com a designação de Dispositivo Médico.

I. Revisão da literatura

Foram já realizados inúmeros trabalhos no âmbito da ortopedia, utilizando biomateriais de diversas origens, com o objetivo de induzir a regeneração óssea. Esses estudos têm por base a escolha dos materiais com melhor potencial de auxiliar o organismo a recuperar de um defeito ósseo, sendo que se procura sempre a possibilidade de restaurar na totalidade as funções do tecido ósseo. (ver artigo de revisão (Burg et al., 2000)).

Nos primórdios do desenvolvimento de biomateriais com atividade para a regeneração óssea, o objetivo era de verificar se existia uma biocompatibilidade que permitisse a utilização desses mesmos materiais para uma implantação e contacto directo com o tecido ósseo de forma a induzir a sua regeneração, mais rápida e eficazmente (Park & Lakes, 2007).

A origem do material depende do conhecimento em geral dos biomateriais, o qual tem vindo a ser complementado por estudos realizados nas últimas décadas. Inicialmente, a escolha do biomaterial a utilizar dependia essencialmente da disponibilidade dos materiais conhecidos. O melhor entendimento da funcionalidade do sistema imunitário levou a que se passassem a considerar inúmeros materiais como patogénicos ou mesmo tóxicos, impossibilitando a sua utilização clínica, como inúmeros polímeros baseados em estruturas poliésteres (Hench & Polak, 2002).

O objetivo dos primeiros biomateriais utilizados em aplicações clínicas visavam uma combinação prática das características químicas dos compostos que fossem compatíveis com os tecidos que iriam substituir, tentando assegurar uma resposta tóxica mínima para o indivíduo. Assim um conceito base destes materiais era a sua característica de serem biologicamente inertes, de forma a não desencadearem uma reação de rejeição por parte do organismo (Langer & Vacanti, 1993).

O conhecimento relativo aos processos de reção óssea veio enriquecer a compreensão da genética que regula esse processo. A ação de hormonas e fatores de crescimento específicos convergem num sistema complexo de regulação por fatores de

transcrição influenciado por estímulos mecânicos e moléculas repressoras (Gordeladze et al., 2009).

Num ensaio teste realizado em 2012 utilizando o método de trepanação da calvária em ratos (Spicer et al., 2012) pode-se verificar que o procedimento utilizado visou reduzir as limitações no manuseamento do modelo experimental escolhido para que os resultados obtidos pudessem ser extrapolados para o homem. O procedimento dá especial ênfase à extensão da formação de novo tecido ósseo ao longo de um período de 12 semanas atribuindo um sistema de pontuação consoante aquilo que se verificou no local do procedimento, como demonstra a tabela 1.

Description	Score
Bony bridging entire span of defect at longest point (8 mm)	4
Bony bridging over partial length of defect	3
Bony bridging only at defect borders	2
Few bony spicules dispersed through defect	1
No bone formation within defect	0

Tabela 1 – Sistema de pontuação referente à extensão da regeneração óssea

(Spicer et al., 2012).

A definição do objetivo de trabalhos deste género varia naturalmente com a escolha do modelo animal e do tipo de biomaterial, mas a avaliação final avalia a extensão da regeneração óssea conseguida e os efeitos adversos que esses materiais desencadeiam no tecido implantado e/ou no organismo do modelo experimental.

A principal referência no qual se pode basear a nossa investigação é um outro trabalho de 2013 (Liu, Rahaman, Liu, Bal, & Bonewald, 2013) que visou demonstrar a atividade de um biovidro na regeneração óssea, igualmente através da trepanação na calvária de rato. Todo o procedimento baseia-se na trepanação bilateral da calvária do rato (diâmetro de 4,6 mm) na qual é implantado o biovidro sob a forma de *scaffold* (descrito no capítulo 3). Foram utilizados 30 ratos machos com 3 meses de idade e com pesos compreendidos entre as 350 e 400 gramas, os quais foram anestesiados com uma mistura de quetamina (72mg/kg) e xilasina (6mg/kg) e mantidos anestesiados com isoflurano

em oxigênio. Após o procedimento, os animais foram mantidos com uma terapêutica antibacteriana e anti-inflamatória com cetorprofeno e penicilina. Os implantes foram mantidos nos animais por 6 semanas, os quais foram sacrificados por inalação de CO₂ (Dióxido de Carbono). Procedeu-se de seguida à análise histológica e imagiológica das amostras recolhidas de cada animal e avaliou-se a capacidade do biomaterial de auxiliar na regeneração óssea.

Num trabalho realizado no ano 2000, foi exposto um biovidro (45S5 Bioglass[®]) a células primárias de osteoblastos com o objetivo de verificar a capacidade que esse contacto teria de ativar o metabolismo destas células e de que forma iria condicionar a atividade e expressão genética (Xynos, Hukkanen, et al., 2000). Verificou-se também que os produtos iónicos da dissolução do biovidro afetaram a regulação genética, aumentando a expressão da IGF-II (Insuline-like growth factor 2) e consequente aumento do estímulo regenerativo, em cerca de 290%, um potente fator de crescimento que levou a uma proliferação aumentada dos osteoblastos em 150% relativamente ao controlo (Xynos, Edgar, Buttery, Hench, & Polak, 2000).

Ao fazer uma avaliação em paralelo entre um biovidro de referência, um derivado de hidroxiapatite e um material vitro-cerâmico é possível verificar uma diferente estimulação do tecido ósseo por parte de cada tipo de biomaterial, sendo que a envolvência de cada tipo de material define a eficácia atividade osteoindutiva (Oonishi et al., 2000). A implantação no fémur de coelho visou comparar não apenas a eficácia na regeneração de tecido ósseo, mas também a velocidade com que esse processo é induzido por cada um dos materiais implantados.

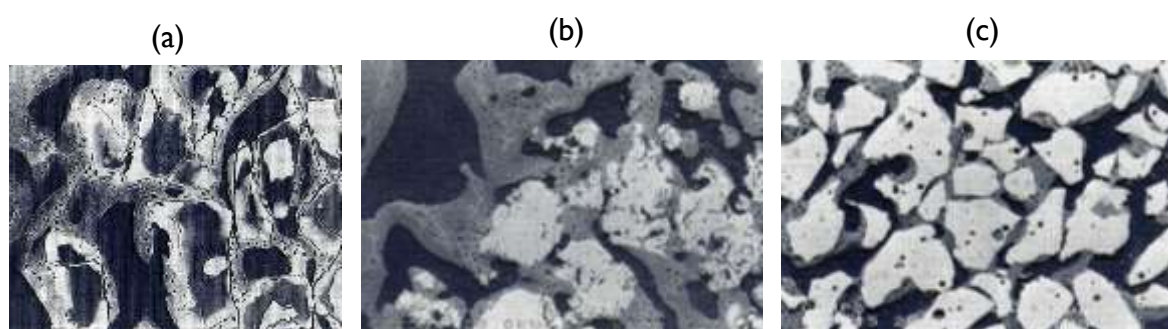


Figura 1 – Comparação da regeneração óssea após 3 semanas de implantação dos biomateriais; a) Biovidro; b) vitro-cerâmica; c) Hidroxiapatite.

(Oonishi et al., 2000)

Como verificado na figura 1, a indução da regeneração óssea, assim como a fixação celular é muito mais evidente no implante com o biovidro observando-se uma maior densidade de matriz óssea formada comparando com os outros biomateriais. Após apenas 3 semanas, o osso já apresenta uma morfologia que indica que a reparação do defeito não irá

apresentar lacunas que poderiam enfraquecer o osso formado, evitando possíveis fraturas posteriores.

Todos os trabalhos verificaram um extensão significativa de regeneração óssea auxiliada pela implantação dos biomateriais em estudo o que comprova o potencial destas técnicas para o tratamento de defeitos ósseos.

Capítulo 2 – Regulamentação dos Dispositivos Médicos

I. Decreto-Lei nº 145/2009, 17 de Junho

O Decreto-Lei nº 145/2009, de 17 de Junho transpôs para a ordem jurídica portuguesa a Diretiva nº 2007/47/CE do Parlamento. Neste documento legal são estabelecidas as regras a que devem obedecer a investigação, o fabrico, a comercialização, a entrada em serviço, a vigilância e a publicidade dos dispositivos médicos e respetivos acessórios.

Este DL transpôs ainda para o ordenamento nacional a Diretiva nº 2003/32/CE da Comissão, de 23 de Abril, incluindo deste modo as regras referentes ao fabrico de dispositivos médicos que utilizam tecido de origem animal. Assim, o DL nº 145/2009 vem estabelecer um regime jurídico para todos os dispositivos médicos exceto os dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*. Estes últimos são regulados em legislação autónoma.

Iremos, de seguida referir apenas algumas das alterações que ocorreram com a publicação do DL nº 145/2009:

- O Sistema Nacional de Vigilância de Dispositivos Médicos deixa de se encontrar regulado em legislação autónoma, passando a estar previsto e disciplinado neste diploma legal;
- Obrigatoriedade de notificação à Autoridade Competente Nacional do fabrico e/ou distribuição por grosso de um dispositivo médico;
- Obrigação da existência de um responsável técnico;
- Clarificação da questão dos *softwares* serem considerados como dispositivos médicos;
- Ajuste ao aumento do período de tempo de arquivo dos documentos no caso de dispositivos médicos implantáveis (até 15 anos);
- Obrigação de designação de uma pessoa responsável nos casos em que o fabricante de um dispositivo médico não possua sede na UE;
- Proibição do uso de substâncias que possam colocar em risco a saúde dos consumidores/doentes, por parte dos fabricantes;
- Clarificação das competências da Autoridade Competente e do Organismo Notificado;
- Ajuste nas regras de classificação de um dispositivo médico.

Vistas as principais notas que este diploma legal tentou introduzir importa agora analisar o que se entende por Dispositivo Médico.

O decreto-lei nº 145/2009 no seu artigo terceiro, alínea f) define dispositivo médico como:

“...qualquer instrumento, aparelho, equipamento, software, material ou artigo utilizado isoladamente ou em combinação, incluindo o software destinado pelo seu fabricante a ser utilizado especificamente para fins de diagnóstico ou terapêuticos e que seja necessário para o bom funcionamento do dispositivo médico, cujo principal efeito pretendido no corpo humano não seja alcançada por meios farmacológicos, imunológicos ou metabólicos, embora a sua função possa ser apoiada por esses meios, destinado pelo fabricante a ser utilizado em seres humanos para fins de:

- i. Diagnóstico, prevenção, controlo, tratamento ou atenuação de uma doença;*
- ii. Diagnóstico, controlo, tratamento, atenuação ou compensação de uma lesão ou de uma deficiência;*
- iii. Estudo, substituição ou alteração da anatomia ou de um processo fisiológico;*
- iv. Controlo d conceção; “*

De uma primeira leitura da noção referida verifica-se desde já que esta abarca um elevado e variado número de artigos, desde os mais simples aos mais complexos, sentindo-se, deste modo, uma necessidade de recorrer a critérios de classificação. Os dispositivos médicos são classificados atendendo ao fim a que cada um se destina e ao risco potencial inerente a cada dispositivo médico.

Deste modo, os dispositivos médicos são catalogados por uma de quatro classes:

- Classe I – dispositivo médico de baixo risco
- Classe IIa – dispositivo médico de médio baixo risco
- Classe IIb – dispositivo médico de médio alto risco
- Classe III – dispositivo médico de alto risco

O anexo IX do DL nº 145/2009 define as regras de classificação aplicáveis aos dispositivos médicos, enunciando alguns critérios a que se deve atender aquando a realização dessa classificação, nomeadamente:

1. Aplicabilidade;
2. Tempo que o dispositivo se encontra em contato com o corpo humano:
 - Temporários (contato por um período inferior a 60 minutos)
 - Curto prazo (contato por um período não superior a 30 dias)

- Longo prazo (contato por um período superior a 30 dias)
3. Invasibilidade (invasivo ou não invasivo);
 4. Parte do corpo afetada;
 5. Dependência de uma fonte de energia para o seu funcionamento;
 6. Inclusão de tecidos animais;
 7. Esterilidade;
 8. Função de mediação;
 9. Contato com o sangue e com outras partes do corpo, especialmente vulneráveis, como o sistema nervoso central e o sistema circulatório central;
 10. Incorporação de substâncias que isoladamente podem ser consideradas medicamentos;
 11. Determinadas aplicações concretas como a prevenção de gravidez ou de doenças sexualmente transmissíveis;
 12. Implantabilidade.

2. Dispositivos Médicos implantáveis biodegradáveis

A enorme variedade de dispositivos médicos difere entre si pelo risco de utilização, duração da implantação e a aplicabilidade como descrito no Decreto-Lei N° 145/2009, de 17 de Junho.

Como referido e já enunciados os critérios de classificação, aos dispositivos médicos em implantáveis aplicar-se-á a regra número 8 do Anexo IX do DL n° 145/2009, que nos diz que:

“Regra n° 8

4.4 – Todos os dispositivos implantáveis e os dispositivos invasivos de carácter cirúrgico utilizados a longo prazo pertencem à classe IIb, exceto no caso de se destinarem:

4.4.1 – A ser colocados nos dentes, caso em que pertencem à classe IIa;

4.4.2 – A ser utilizado em contato direto com o coração, o sistema circulatório central ou o sistema nervoso central, casos em que pertencem à classe III;

4.4.3 – A produzir um efeito biológico ou a ser absorvidos, totalmente ou em grande parte, casos em que pertencem à classe III;

4.4.4 – A sofrer uma transformação química do corpo, exceto se se destinarem a se colocados nos dentes ou a administrar medicamentos, pertencem à classe III”.

Aplicar-se-á esta regra de classificação uma vez que o dispositivo médico em causa tem como fim ser introduzido no corpo do animal através de uma cirurgia, de forma invasiva, com o intuito de o biomaterial se manter no corpo do animal por um período superior a 30 dias.

A utilização deste tipo de dispositivo médico depende das características e morfologia do biomaterial utilizado para que o procedimento seja de intervenção única, ou seja, não haja a necessidade de uma segunda cirurgia para a remoção do implante.

3. Avaliação Biológica de Dispositivos Médicos - ISO 10993

A ISO 10993 (International Organization for Standardization) é a norma responsável pela avaliação e teste de dispositivos médicos no âmbito do processo de gestão de risco de forma a avaliar a biocompatibilidade desses mesmos Dispositivos Médicos e os seus materiais constituintes. A definição dos testes específicos de avaliação dependem do tipo de dispositivo médico e da sua aplicabilidade e duração do contacto com o organismo.

Na aplicação do dispositivo médico prevê-se uma determinada reação orgânica diretamente proporcional às características do mesmo, sem que se obtenham reações adversas significativas no indivíduo. O principal objetivo desta gestão e avaliação do risco é de proteger o doente de potenciais riscos ou danos biológicos causados pelo contacto com o dispositivo.

Assim a ISO 10993 regulariza e harmoniza os procedimentos e testes necessários para que se possa comprovar a segurança e eficácia de um determinado dispositivo médico segundo uma série de teste *in vitro* e *in vivo*. Esses testes são definidos ao longo do documento e determinados consoante as especificações do dispositivo médico como compilado na seguinte tabela retirada do Anexo A da ISO 10993.

Device categorization by nature of body contact (see 5.2)			Biologic effect							
Category	Contact	Contact duration (see 5.3) A – limited (≤ 24 h) B- prolonged (>24 h to 30 d) C – permanent (> 30 d)	Cytotoxicity	Sensitization	Irritation or Intracutaneous reactivity	Systemic toxicity (acute)	Subchronic toxicity (subacute toxicity)	Genotoxicity	Implantation	Haemocompatibility
Surface device	Intact skin	A	X	X	X					
		B	X	X	X					
		C	X	X	X					
	Mucosal membrane	A	X	X	X					
		B	X	X	X	O	O			O
		C	X	X	X	O	X	X		O
	Breached or compromised surface	A	X	X	X	O				
		B	X	X	X	O	O			O
		C	X	X	X	O	X	X		O
External communicating device	Blood path, indirect	A	X	X	X	X				X
		B	X	X	X	X	O			X
		C	X	X	O	X	X	X	O	X
	Tissue/bone/dentin*	A	X	X	X	O				
		B	X	X	X	X	X	X	X	
		C	X	X	X	X	X	X	X	
	Circulating blood	A	X	X	X	X		O ^a		X
		B	X	X	X	X	X	X	X	X
		C	X	X	X	X	X	X	X	X
Implant device	Tissue/bone	A	X	X	X	O				
		B	X	X	X	X	X	X	X	
		C	X	X	X	X	X	X	X	
	Blood	A	X	X	X	X	X	X	X	X
		B	X	X	X	X	X	X	X	X
		C	X	X	X	X	X	X	X	X

Tabela 2 – Consideração inicial para testes de avaliação.

(ISO-10993-1:2013)

Interpretando a tabela 2 pode-se verificar que o dispositivo médico em questão se enquadra nos dispositivos implantáveis em contacto com o osso por um período designado como permanente (superior a 30 dias). Assim os testes a executar terão que avaliar uma série de critérios:

- Citotoxicidade;
- Sensibilidade;
- Irritação;
- Toxicidade sistémica e subcrónica;
- Genotoxicidade;
- Implantabilidade.

Cada avaliação deverá ser feita de acordo com o estipulado no documento, tendo em consideração as condições definidas e/ou os próprios testes referenciados.

Para o objetivo deste trabalho, serão focadas as condições e especificações referentes aos testes de Implantabilidade (ISO-10993-6:2007 – Tests for local effects after implantation).

3.1 Avaliação da Segurança

A avaliação biológica de dispositivos médicos pretende, no âmbito da segurança, avaliar o potencial de toxicidade com o contacto com o organismo. Para a viabilização de um dispositivo médico é essencial garantir que os seus constituintes não produzem:

- 1) Efeitos adversos a nível local e sistémico, como irritações cutâneas que possam culminar em necrose e reações imunológicas sistémicas severas;
- 2) Efeitos carcinogénicos de qualquer tipo;
- 3) Efeitos adversos a nível reprodutivo e no desenvolvimento.

A obtenção e interpretação das informações referentes ao dispositivo médico em estudo são essenciais para tirar elações quanto às vantagens na utilização da tecnologia, de forma a concluir que os benefícios proporcionados pela utilização do dispositivo médico irão ser superiores aos riscos potenciais produzidos pela sua aplicação clínica.

Cada teste específico para a avaliação dos diversos tipos de toxicidade possível de se verificar para a implantação de um biomaterial são sugeridos nas diversas partes correspondentes da presente ISO. Na tabela 3 encontram-se compilados os testes de avaliação dos diferentes tipos de toxicidade a verificar de acordo com a ISO-10993.

3.2 Implantação e Avaliação da Eficácia

3.2.1 Preparação das amostras

A escolha das amostras do biomaterial de referência deverá ser feita de acordo com o seu potencial comprovado em testes anteriores realizados *in vitro*, ou com base em dados obtidos em testes semelhantes, com condições semelhantes e/ou em materiais semelhantes.

O manuseamento e aplicação do material em teste deverá ser realizado em condições de assepsia com esterilização prévia das amostras, a qual deverá ser realizada através dos procedimentos mais adequados para o tipo de material em estudo. Estas considerações são essenciais para que sejam reduzidos efeitos alheios à implantação como possíveis infeções bacterianas ou o efeito de impurezas nos tecidos implantados.

3.2.2 Local e tecido de implantação

As amostras deverão ser implantadas nos tecidos relevantes para a aplicabilidade clínica do material em estudo. No nosso trabalho, a escolha da implantação no tecido ósseo deve-se à função regenerativa desse material no osso, sendo que a sua capacidade osteoindutiva deverá ser comprovada pela implantação num local onde não seria esperada a criação de tecido ósseo.

No caso de materiais biodegradáveis, o local de implantação deve ser identificado de forma a poder-se distinguir o local da implantação após a duração do implante de forma a verificar o efeito do material no tecido implantado.

A implantação deverá ter especial cuidado na imobilização do implante de forma a assegurar que o material fica fixado no local desejado.

A informação referente ao local de implantação é definida pela ISO-10993, sendo um aspeto essencial para a comprovação da capacidade regenerativa do osso.

Avaliação	Standard	Foco	Teste	Endpoint	Referência(s)
Citotoxicidade <i>in vitro</i>	EN ISO 10993-5:2009	Viabilidade celular	Neutral Red Uptake (NRU)	Inibição da capacidade de incorporação do corante após exposição a luz UV.	Test Guideline OECD 432, 2004 (Borenfreund & Puermer, 1985) ; (Edwards et al., 1994)
			Colony formation V79 Cells	Toxicidade direta dos materiais por redução da proliferação celular.	(Kotoura et al., 1985)
			MTT Assay	Redução da produção de enzimas desidrogenases devido a morte celular.	Test Guideline OECD 431, 2012 (Scudiero et al., 1988)
Sensibilização	EN ISO 10993-10:2010	Reação imunológica	Local Lymph Node ASSAY (LLNA)	Quantificação da proliferação dos linfócitos	Test Guideline OECD 429, 2010
Irritação ou Atividade intracutânea		Alteração morfológica	Draize Skin Irritation Test	Observação da corrosão/destruição do tecido da pele observável por 14 dias.	Test Guideline OECD 404, 2002 Diretiva 67/548/EEC (Kandarova et al., 2005)
Toxicidade sistémica	EN ISO 10993-11:2006	Toxicidade aguda	Material-Mediated Pyrogen Test (MMPT)	Controlo e verificação da temperatura para averiguar reações febris.	Incluído na ISO-10993-11:2006
Toxicidade subcrónica		Toxicidade contínua; Repetição da exposição	Subchronic Dermal Toxicity 90-day Study	Contacto repetido com o material e avaliação de alterações clínicas e funcionais	Test Guideline OECD 411, 1981
			Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents		Test Guideline OECD 407, 2008
Genotoxicidade	EN ISO 10993-3:2009	Alteração genéticas	Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (MEMENT)	Deteção de danos cromossómicos causados a eritrócitos	Test Guideline OECD 474, 1997 (Heddle, 1973)

Tabela 1 – Compilação de testes para verificação da segurança no âmbito do desenvolvimento de Dispositivos Médicos.

ISO-10993

3.2.3 Duração da implantação

A avaliação de materiais biodegradáveis deve sempre ter em conta as características físico-químicas dos mesmos, de forma a prever o tempo que estes materiais estarão implantados.

Nos teste em que se avalia a biodegradação de um material são normalmente considerados períodos de implantação muito superiores a outros tipos de testes como a citotoxicidade e testes de toxicidade sistémica uma vez que as reações acontecem de forma mais rápida, sendo que é fácil identificar essas reações no momento da sua ocorrência.

Species	Implantation period in weeks				
	12	26	52	78	(104) ^a
Rats	X	X	X		
Guinea pigs	X	X	X		
Rabbits	X	X	X	X	X
Dogs	X	X	X	X	X
Sheep	X	X	X	X	X
Goats	X	X	X	X	X
Pigs	X	X	X	X	X

^a Depending on the intended use of the test material, not all implantation periods may be necessary (see ISO 10993-12). An observation period of 104 weeks may be of interest in selected instances.

Tabela 4 – Seleção da duração da implantação a longo prazo.

(ISO-10993-6:2007)

A duração depende também do tipo de modelo experimental escolhido, tendo em conta as capacidades regenerativas e metabólicas de cada animal. Esses períodos são definidos e estão compilados na tabela 3.

O período assim definido para a implantação de um material em ratos pode então ser determinado entre 12 a 52 semanas, depende então do período de biodegradação do material em estudo.

3.2.4 Condições dos testes e cirurgia

Todo e qualquer procedimento cirúrgico deverá ser realizado sob condições de anestesia completa. O método de implantação é definido pelo tecido em que este é

realizado, estando a informação referente a cada tipo de tecido compilado nos anexos B, C e D do documento da ISO 10993-6:2007.

O estudo pode ser orientado de acordo com o efeito de diferentes texturas e/ou apresentações do material em estudo, de forma a verificar a eficácia de vários tratamentos ou modificações ao material.

A observação e controlo pós-cirúrgico deverá ser feito em intervalos regulares durante o período de implantação, sendo que quaisquer sinais deverão ser registados, incluindo o local, anormalidades de comportamento e possível influência que essas informações possam ter na avaliação final dos testes executados.

3.3 Avaliação dos resultados

A avaliação dos resultados obtidos deve conter a documentação das respostas macroscópicas e histopatológicas comparando o grupo experimental com os grupos de controlo.

Na avaliação macroscópica deve-se verificar o material remanescente, ou seja a quantidade de material que não sofreu de biodegradação e deve-se acompanhar com um registo fotográfico dessa informação.

A recolha do tecido para avaliação histológica deve incluir uma porção do tecido adjacente ao implante, uma vez que pode não ser evidente a presença do implante por este ter sido reabsorvido pelo organismo e ter dado lugar a novo tecido ósseo, como é idealmente pretendido.

A avaliação da resposta biológica deve conter uma série de parâmetros de forma a considerar a atividade como eficiente no processo de regeneração como são:

- A extensão de fibrose, caso ocorra;
- Degeneração da morfologia do tecido;
- Presença de células do sistema imunitário;
- Presença e extensão de necrose;
- Outras alterações como a vascularização, infiltração de gorduras, formação de granulomas, e formação irregular de tecido ósseo;
- Identificação de possível fragmentação ou depósitos do material no local do implante e sua quantificação;
- Quantificação do crescimento do tecido ósseo e identificação do mesmo.

A avaliação dos efeitos biológicos poderão ser determinados por diversos procedimentos aceites correntemente, no qual o anexo E da ISO 10993-6:2007 descreve num sistema de pontuação que leva a uma classificação final de sucesso da implantação.

Os sistemas de pontuação abordados por esta *guideline* focam-se na resposta celular imunitária, assim como na resposta histológica observada, fazendo uma avaliação semi-quantitativa dos resultados obtidos, comparando os grupos experimentais e os controlos e concluindo o potencial de risco do material implantado.

Nas seguintes tabelas 4 e 5 estão definidos esses mesmos sistemas de pontuação, sendo no final compilados e comparados na tabela 6, sendo no final tiradas as conclusões referentes a todo o estudo. Na avaliação, se as pontuações dos grupos de teste forem inferiores às dos grupos de controlo, pode-se concluir que existe uma segurança biológica relativa do material utilizado, podendo fazer-se algumas considerações à técnica utilizada.

Cell type/response	Score				
	0	1	2	3	4
Polymorphonuclear cells	0	Rare, 1-5/phf ^a	5-10/hpf	Heavy Infiltrate	Packed
Lymphocytes	0	Rare, 1-5/phf	5-10/hpf	Heavy Infiltrate	Packed
Plasma cells	0	Rare, 1-5/phf	5-10/hpf	Heavy Infiltrate	Packed
Macrophages	0	Rare, 1-5/phf	5-10/hpf	Heavy Infiltrate	Packed
Giant cells	0	Rare, 1-5/phf	3-5/hpf	Heavy Infiltrate	Sheets
Necrosis	0	Minimal	Mild	Moderate	Severe

^a phf = high powered (400 x) field.

Tabela 5 – Sistema de avaliação histológica - resposta celular.

(ISO-10993-6:2007)

Response	Score				
	0	1	2	3	4
Neovascularisation	0	Minimal capillary proliferation, focal, 1-3 buds	Groups of 4-7 capillaries with supporting fibroblastic structures	Broad band of capillaries with supporting structures	Extensive band of capillaries with fibroblastic structures
Fibrosis	0	Narrow band	Moderately thick band	Thick band	Extensive band
Fatty infiltrate	0	Minimal amount of fat associated with fibrosis	Several layers of fat and fibrosis	Elongated and broad accumulation of fat cells about the implant site	Extensive fat completely surrounding the implant

Tabela 6 – Sistema de avaliação histológica - resposta observacional.

(ISO-10993-6:2007)

	Test sample			Control sample		
Animal number:						
Inflammation						
Polymorphonuclear						
Lymphocytes						
Plasma cells						
Macrophages						
Giant cells						
Necrosis						
SUB-TOTAL (x 2)						
Neovascularisation						
Fibrosis						
Fatty infiltrate						
SUB-TOTAL						
TOTAL						
GROUP TOTAL						

Tabela 7 – Sistema de avaliação semi-quantitativa teste/controlo.

(ISO-10993-6:2007)

Capítulo 3 – Biomateriais e Dispositivos Médicos

Os biomateriais são definidos pela American National Institute of Health como qualquer substância ou combinação de substâncias, que não fármacos, sintéticos ou de origem natural, que podem ser usados por qualquer período de tempo, melhorando ou substituindo parcial ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função do organismo, de forma a manter ou melhorar a qualidade de vida de um indivíduo.

Na medicina contemporânea com o aumento do sucesso dos procedimentos cirúrgicos, criou-se a oportunidade de apostar em técnicas que envolvem materiais sintéticos e orgânicos para solucionar defeitos estruturais no corpo humano e no seu esqueleto (Stroganova, Mikhailenk, & Moroz, 2003). Muitos dos avanços que se têm alcançado resultaram em grande parte da evolução no conhecimento e na capacidade de manipulação de diversos tipos de materiais aplicáveis a essas mesmas terapêuticas devido às suas capacidades de biocompatibilidade.

A utilização de biomateriais na substituição ou regeneração do tecido ósseo tem vindo a ser uma aposta com grande potencial que tem evoluído em paralelo com o conhecimento do processo regenerativo do osso e da produção e manipulação dos biomateriais.

Existem abordagens distintas na utilização de biomateriais relacionados com o local da lesão, o tipo de biomaterial e a duração do tratamento. Ao contrário dos biomateriais de origem biológica (autólogos, alógenos, xenógenos), os biomateriais sintéticos (aloplásticos) têm a sua origem na síntese artificial tendo em conta a sua constituição físico-química e morfologia ou estrutura final.

Dentro da designação de biomateriais aloplásticos podem-se considerar os polímeros, as cerâmicas e os biovidros que diferem na sua síntese e na sua natureza molecular, criando compostos que podem interagir biologicamente ou simplesmente serem inertes.

De acordo com a classificação de L. L. Hench os biomateriais podem-se dividir em dois grandes grupos, e toda a classificação baseia-se na aplicabilidade e características dos materiais em estudo como está explícito na figura 2 (Hench, 1998).

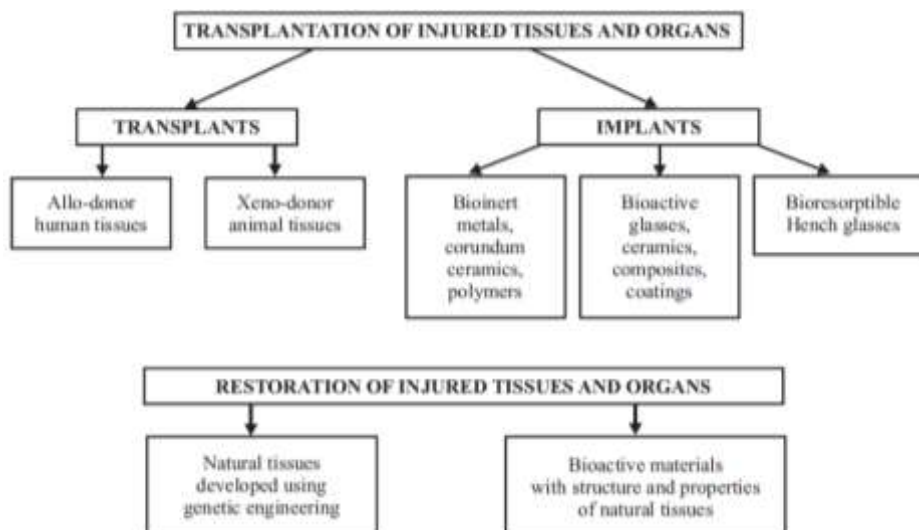


Figura 2 – Classificação de biomateriais.

(Hench, 1998)

1. Polímeros

Os polímeros são macromoléculas formadas pela polimerização de monómeros, os quais podem ser uma repetição das mesmas unidades moleculares ou uma mistura de diversos monómeros (co-polímeros).

As propriedades físico-químicas destes polímeros dos referidos polímeros é que vão determinar o comportamento aquando da sua implantação e vão influenciar diretamente a velocidade e o grau de biodegradação destes materiais, assim como as interações biológicas que estes vão estabelecer com o tecido onde são implantados (Hollinger & Battistone, 1986).

2. Cerâmicas

As cerâmicas utilizadas em tratamento de defeitos ósseos são biomateriais compostos ou derivados de fosfato de cálcio. A sua composição química é muito semelhante à estrutura da matriz óssea e esse facto leva a uma indução natural da formação de osso no local da implantação destes materiais. A sua biodegradação gera iões de cálcio e fosfato que são reabsorvidos no local nos processos metabólicos de produção de nova matriz óssea, sem que esses iões interfiram nas suas concentrações no sangue ou na urina.

A formação, dissolução e transformação do fosfato de cálcio dependem das características do material utilizado (tamanho das partículas, densidade) e das condições da solução (temperatura e pH) (Barrere, van Blitterswijk, & de Groot, 2006). A solubilidade

destes materiais vão, inevitavelmente, influenciar a sua capacidade de interação *in vivo* com os tecidos onde são implantados devido à enorme complexidade de reações que ocorrem constantemente nos tecidos orgânicos, e serão essas interações que vão demonstrar o potencial terapêutico do material considerado, potenciando e condicionando o processo regenerativo do osso (Dhert et al., 1998).

3. Biovidros

Os biovidros são materiais inorgânicos policristalinos compostos por óxidos de Cálcio, Magnésio, Alumínio, Titânio, Sódio e Fluoretos de Cálcio. A sua composição química permite que a sua biodegradação forneça ao meio onde é implantado, os iões que o processo de regeneração óssea requer para que se proceda de forma rápida e eficaz. Para além da sua ação química no processo, os biovidros proporcionam uma estrutura tridimensional que serve de molde para que o osso possa crescer e fixar-se.

Este tipo de biomateriais pode aplicar-se em várias apresentações dependendo do efeito pretendido, do local ou da aplicação.

A forma de pós nos biovidros tem tido uma aplicabilidade comprovada na cosmética pela sua capacidade de libertar iões quando dissolvido em soluções aquosas. Esta libertação de iões pode ter efeitos regenerativos e/ou de proteção da pele, pela sua capacidade antioxidante.

Os biovidros podem também apresentar-se na forma de *scaffolds*, um material poroso que é integrado num defeito ósseo de forma a proporcionar a sua regeneração. O biomaterial é moldado às dimensões do defeito, proporcionando uma estrutura de suporte que se liga ao tecido ósseo adjacente (Chen, Thompson, & Boccaccini, 2006).

Outra apresentação utilizada dos biovidros são os grânulos, os quais têm uma aplicabilidade mais direcionada para a engenharia de tecidos pela capacidade deste material tem no preenchimento de defeitos, nomeadamente ósseos. Os grânulos quando aplicados tomam uma conformação tridimensional de estrutura em rede através da qual o osso pode regenerar-se e preencher o defeito. Com a capacidade biodegradável do material, este é substituído por novo osso no local da implantação (Turunen, Peltola, Yli-Urpo, & Happonen, 2004).

A capacidade de ligação a tecidos orgânicos é umas das principais propriedades dos biovidros o que permite um elevado grau de biocompatibilidade através da troca iónica com a superfície do vidro que cria uma superfície hidratada de SI-OH. Este fenómeno leva a um

grande aumento da área de superfície de contacto com o tecido ósseo, permitindo uma integração e levando à potenciação da regeneração óssea (Sepulveda et al., 2002).

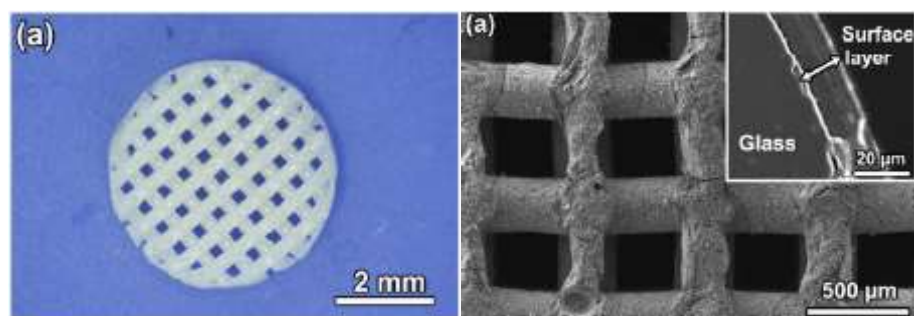


Figura 3 – Estrutura tridimensional de scaffold de um biovidro.

(Sepulveda, Jones, & Hench, 2002)

Capítulo 4 – Definição de objetivos e fundamento experimental

1. Objetivos gerais

O protocolo experimental referente a este trabalho foi aprovado pela Direção Geral de Veterinária (DGV) a 4 de março de 2015 para o projeto experimental designado como “Estudo de biocompatibilidade dos biomateriais em modelos *in vivo*” segundo o Artigo 44º do Decreto-Lei n.º 113/2013 de 7 de Agosto, relativo à “proteção dos animais utilizados para fins científicos”, com a referência 0421/000/000/2015.

O principal objetivo deste projeto é de avaliar a eficácia e conformidade legal de um biomaterial que atuará como dispositivo médico implantável e biodegradável para a regeneração óssea. As suas propriedades físico-químicas e biomecânicas seguem um padrão conhecido dos biovidros como referido no Capítulo 2, divergindo nas quantidades definidas de cada componente.

De acordo com o desafio proposto, pretende-se verificar a capacidade de osteoindução do biomaterial em estudo, ou seja, a capacidade de induzir o crescimento de tecido ósseo saudável e integrado nos tecidos adjacentes, no local da sua implantação.

A otimização da técnica cirúrgica e o acompanhamento pós-cirúrgico são igualmente objetivos fulcrais para que o processo experimental tenha sucesso na avaliação a que se propõe, reduzindo quaisquer efeitos negativos influenciados pelo procedimento escolhido.

O principal benefício deste projeto é a obtenção de uma terapêutica efetiva para o tratamento de defeitos ósseos com base num novo biomaterial de origem sintética com aplicação clínica.

2. Defeito crítico

A utilização de um defeito de tamanho crítico visa comprovar a eficácia da implantação do biomaterial de forma a mostrar que a regeneração se deve às propriedades do biomaterial e não à capacidade endógena de regeneração do modelo animal. Este defeito realizado por trepanação na calvária do animal, não se regenera independentemente do fator tempo imposto. Após uma revisão à literatura verificou-se que o tamanho do defeito crítico para o rato Wistar é de 8 mm (Cooper et al., 2010).

A localização da implantação é definida pela disponibilidade de uma superfície óssea suficientemente grande e rígida para realizar o procedimento. No modelo animal em

questão, o osso da calvária é o único que tem a área suficientemente grande para desencadear um defeito crítico

3. Amostra

A escolha da amostra teve em conta a utilização do mínimo possível de animais de forma que se obtenha uma significância estatística aceitável. Na definição e elaboração do desenho experimental teve em conta uma análise estatística para a definição dessas mesmas condições

Serão utilizados três grupos de 8 animais (n=8) para a avaliação do biomaterial:

- Grupo de controlo positivo – avaliação comparativa com a utilização de um biomaterial concorrente já no mercado (45S5 Bioglass®);
- Grupo de controlo negativo – O defeito realizado não será preenchido por nenhum biomaterial de forma a verificar a não regeneração do tecido ósseo;
- Grupo do material experimental – Substituição do tecido ósseo retirado pelo biovidro em estudo.

Os animais serão ratos Wistar machos com idades de 12 semanas, baseada numa pesquisa extensa da bibliografia e baseando-se em resultados de testes similares descritos na revisão bibliográfica (Capítulo 1), para permitir que seja assegurada uma capacidade regenerativa óssea viável, uma vez que esta está dependente da idade.

A utilização de animais neste estudo e da espécie em particular prende-se com a necessidade de testar o procedimento e o material num sistema animal com resultados extrapoláveis para o Homem de forma a comprovar os resultados obtidos *in vitro*, viabilizando o avanço para ensaios clínicos no futuro.

Capítulo 5 – Materiais e Métodos

1. Modelo experimental

O animal escolhido para o procedimento foi o rato Wistar por ser um modelo experimental de fácil acesso e tendo já demonstrado uma boa capacidade de aceitação a outros tipos de biomateriais para a regeneração óssea (Liu et al., 2013). Apesar do modelo experimental mais utilizado para estudos de regeneração óssea ser o coelho, não existem condições de manutenção desse modelo no biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

As vantagens na escolha deste modelo são principalmente a acessibilidade e facilidade de manuseamento com a reprodutibilidade dos defeitos induzidos, bem como a rapidez do processo. Por outro lado com esta técnica não é possível avaliar a flexibilidade e/ou a resistência à carga como em defeitos femorais (Spicer et al., 2012).

2. Material experimental

O biomaterial em estudo é um biovidro formado por diversos compostos óxidos de cálcio, magnésio, entre outros. Este terá uma apresentação em forma de disco com um tamanho igual à peça de tecido ósseo retirado da calvária do animal (8mm de diâmetro e cerca de 0,1 mm de espessura). A esterilização do material será tida em conta e realizada por autoclavagem pelo Departamento de Materiais da Universidade de Aveiro que desenvolveu o material.

3. Receção, acolhimento e acompanhamento dos animais

Os animais serão recebidos nas instalações do biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, procedendo-se à observação e avaliação cuidada de cada animal de acordo com as orientações previstas na legislação em vigor (Diretiva 2010/63/UE de 22 de Setembro). O alojamento será feito de forma adequada em condições ambientais controladas, salvaguardando a liberdade de movimentos e garantindo a manutenção frequente do material de cama adequado para a espécie escolhida. Será garantido o acesso dos animais à alimentação e água, recebendo os cuidados necessários à sua saúde e bem-estar, os quais serão controlados por uma pessoa competente.

Os registros de todos os procedimentos serão mantidos durante um período mínimo de 3 anos, onde deverão constar a espécie e o número de animais utilizados, a origem dos animais a data de chegada ao estabelecimento de utilização e início do processo experimental.

Durante todos os procedimentos experimentais, serão monitorizados diariamente a condição dos animais, a ingestão dos alimentos e atividade e sinais clínicos de infecção. Adicionalmente serão monitorizados diversos parâmetros clínicos de forma a estabelecer os limites críticos, nomeadamente:

- Peso corporal;
- Aparência da pelo, olhos, nariz, boca e cabeça;
- Modo de respiração;
- Características da urina e fezes;
- Estado de locomoção.

Os animais serão alojados individualmente em gaiolas previamente preparadas, limpas e identificadas, para melhor monitorização dos parâmetros em estudo e do bem-estar dos animais.

Devido às características físico-químicas do biomaterial a ser implantado e a presença de diversos iões na sua composição (Magnésio, Sódio, Cálcio, Fósforo), será também necessária a colheita de sangue dos animais em estudo, a qual se deverá realizar de forma quinzenal.

4. Anestesia

No processo de anestesia será utilizado uma combinação de quetamina (50ml/ml) e cloropromazina (50mg/2ml), que proporcionará um período de anestesia de cerca de 1 hora. A mistura dos fármacos será feita com a adição de 3 ml de cloropromazina ao frasco de 10 ml de quetamina, administrando uma dose de 2,67ml/Kg a cada animal por via intramuscular (Ver tese João Ferreira, 2011).

Durante o procedimento devem-se verificar se o animal dá sinais de recuperar da anestesia, de forma a poder determinar se é necessária a administração de nova dose de anestésico.

O bem-estar dos animais deve ser assegurado, certificando que o processo de anestesia garante que os animais não sofrem dor, sofrimento ou angústia (severos e prolongados) e sem possibilidade de serem aliviados.

5. Preparação e posicionamento do animal

A preparação do animal é dividida em duas fases: a tricotomia do local da cirurgia e o seu posicionamento.

A tricotomia pode ser feita de duas formas, quer por raspagem do pelo com uma lâmina quer com a utilização de creme depilatório. De forma a reduzir o efeito inflamatório do processo é preferível a utilização do creme depilatório, o qual não demonstra efeitos adversos significativos.

De seguida procede-se à fixação do animal na base esterotáxica regulável às dimensões do animal, de forma a criar a estabilidade ideal para a intervenção como demonstrado na figura 4 (Ceberg et al., 2012).

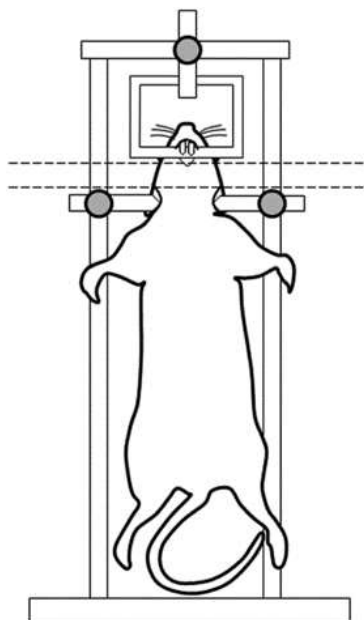


Figura 4 – Fixação do animal na base esterotáxica.

(Ceberg et al., 2012)

6. Técnica cirúrgica

A técnica utilizada é a trepanação na calvária do animal, com a utilização de um trepano com diâmetro de 8mm.

Inicialmente é feita uma incisão mediana no crânio com deslocação do perióstio de forma a expor o osso. Este processo requer uma extrema precisão para evitar lesionar a dura mater e consequentes lesões neurológicas no animal. O defeito será criado com irrigação constante do local com soro fisiológico de forma a manter limpo e estéril o local da cirurgia. A espessura do osso da calvária é bastante baixa (aproximadamente 0.1mm), pelo que não se deve proceder à trepanação na totalidade dessa espessura, sendo retirado o material ósseo com uma pinça. O processo está esquematizado na figura 2.

Após o procedimento e posterior recolha da placa óssea, o espaço é substituído pelo biomaterial que deverá ter o diâmetro e espessura exatas do defeito que fora criado.

Em seguida procede-se à sutura contínua da incisão realizada e desinfeta-se o local com iodopovidona de forma a prevenir infeção no local.

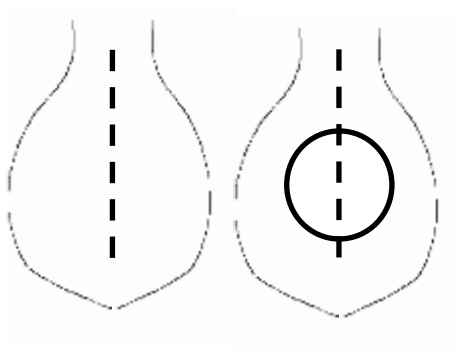


Figura 5 – Esquematização do local de incisão e trepanação na calvária do animal.

(imagem própria)

7. Medicação e recobro

Após a cirurgia procede-se a uma medicação com um antibiótico (tetraciclina – 80µg/Kg) e um anti-inflamatório (diclofenac – 10mg/Kg) durante os primeiros 5 dias de 12 em 12 horas, alternadamente (Santos et al., 2004).

O recobro dos animais deverá incluir a alimentação por sonda de uma solução glicosada durante as primeiras 48 horas após a realização da cirurgia, até a recuperação total da mobilidade do animal, de forma a garantir a sobrevivência e o bem-estar.

O acompanhamento dos animais deverá ser diário de forma a diagnosticar quaisquer reações adversas relativas à intervenção cirúrgica ou a efeitos negativos do implante colocado e será feito tendo em conta inúmeras considerações com base em efeitos visíveis no local da implantação e/ou efeitos visíveis noutros locais.

O período de implantação é definido pelo anexo A da ISO 10993 parte 6, no que se refere à implantação, estando definido entre as semanas 1-12 após a implantação. No final das 12 semanas de implantação proceder-se-á ao sacrifício dos animais de forma a poder verificar a taxa de regeneração óssea obtida e discutir os resultados.

Capítulo 6 – Atividade regenerativa do biomaterial experimental

Como descrito na revisão bibliográfica, este estudo tem o objetivo de comprovar a atividade do biomaterial experimental para a regeneração óssea. A implantação de um biovidro terá teoricamente a capacidade de induzir o tecido ósseo a regenerar-se, proporcionando as condições biomecânicas e químicas para que as células do tecido possam realizar todos os processos biológicos de uma forma mais eficaz e assim mais célere.

Para uma melhor compreensão da atividade osteoindutiva, o processo pode ser dividido em 3 partes: fixação, ativação celular e mineralização (Gordeladze et al., 2009). Todo este processo é contínuo e realiza-se em simultâneo entre as fases, sendo que o biomaterial terá um efeito de estabilização do local do defeito ósseo de forma a vetorizar a ação celular.

Após a implantação do biomaterial ocorrerá um processo de fixação ou de integração com o tecido ósseo adjacente o que irá criar uma estrutura tridimensional através da qual o osso pode regenerar-se e preencher o defeito ósseo. A capacidade de indução da regeneração óssea por parte do biomaterial dependerá sempre da sua composição físico-química, sendo importante a porosidade e as percentagens da mistura molecular que o compõe.

A porosidade é uma característica muito importante a considerar, pois é um fator que vai determinar se as células do tecido ósseo serão capazes de interagir entre si de forma a criar pontes de matriz óssea de forma a preencher esses espaços de forma gradual (Negishi-Koga & Takayanagi, 2012). As taxas de biodegradação e de bio-absorção relativas ao biomaterial em questão também são fatores determinantes na sua ação. Uma taxa de biodegradação muito elevada significaria que o biomaterial não serviria de suporte, durante o tempo suficiente, para que se dê uma regeneração óssea eficaz. A permanência de uma estrutura sólida é indispensável para que se dê a ativação celular, ou seja, para que as células do tecido ósseo possam ser induzidas à criação de nova matriz celular, utilizando a superfície criada, bem como as matérias-primas disponibilizadas pela composição do biomaterial, como por exemplo, os iões de Cálcio, Magnésio e Sódio (Kalfas, 2001).

Os conceitos de material bioativo e bioabsorvível convergiram pela sua aplicabilidade prática e pela necessidade de criar um mecanismo inteligente e complexo de integração do biomaterial no tecido ósseo. Assim a capacidade de adesão das células ao biomaterial é um ponto crítico essencial para que o implante do mesmo seja eficaz no auxílio ao processo de regeneração óssea. Na figura 6 (Joddar & Ito, 2011) estão ilustradas as interações que

decorrem aquando da implantação de um biomaterial no tecido ósseo, estando presentes os principais intervenientes no processo de regeneração.

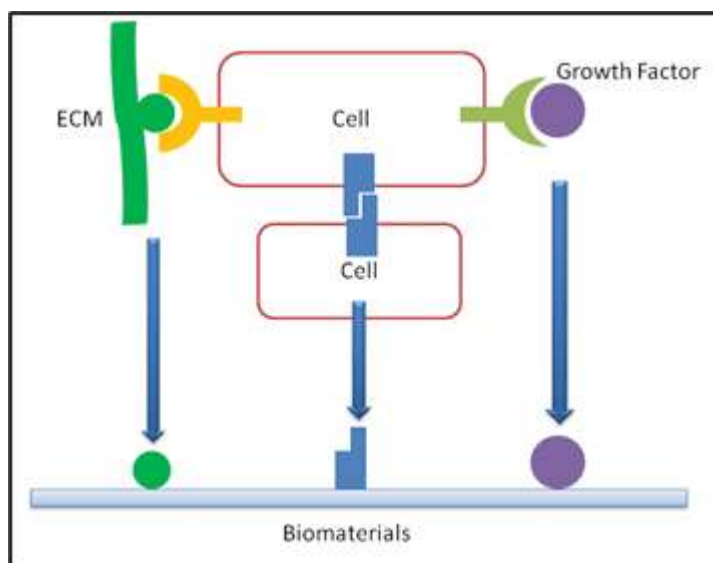


Figura 6 – Principais interações entre as células e biomateriais implantados.

(Joddar & Ito, 2011)

O biomaterial, para além da sua função estrutural, liberta de forma gradual iões, resultantes da sua composição original, que vão produzir um estímulo químico de ativação das células recrutando células progenitoras do tecido ósseo que por sua vez irão produzir uma série de fatores de crescimento que vão ativar as cascatas de sinalização celular para o crescimento de novo osso.

O preenchimento do defeito ósseo com o biomaterial leva assim a uma rápida resposta celular no sentido da regeneração óssea correspondendo à arquitetura e propriedades mecânicas do tecido ósseo no local da implantação, não comprometendo as características finais do osso formado, o qual irá adequar-se ao tecido no qual foi formado, não devendo haver disparidade histológica, funcional ou metabólica (Hench & Polak, 2002).

No final do período previsto de implantação, o local do defeito ósseo que fora tratado através do procedimento de implantação deverá apresentar uma uniformidade entre o osso recém-formado e o osso adjacente sem vestígios do biomaterial utilizado.

Capítulo 7 – Análise crítica e Conclusão

I. Perspetiva de resultados

Como verificado em experiências anteriormente publicadas, o resultado que se pretende obter é uma regeneração total do tecido ósseo no local do implante com uma reabsorção total do biomaterial por parte do organismo dos animais. Após a realização do processo cirúrgico é de esperar um período de 24 a 48 horas de recuperação lenta da anestesia com pouca reatividade por parte dos animais, a qual deverá ser compensada com uma manutenção cuidada dos mesmos. Apesar da administração de uma terapêutica antibiótica e anti-inflamatória, existe a possibilidade de serem desenvolvidos processos inflamatórios pontuais, os quais requererão um cuidado de limpeza e desinfeção do local cirúrgico até à resolução dessas mesmas complicações.

É de esperar que o biomaterial implantado seja totalmente absorvido no final das 12 semanas de implantação, o qual deve ser devidamente verificado no processo de avaliação histológica final para a determinação dessa mesma taxa de biodegradação.

Com a integração do biomaterial, as células do tecido ósseo, nomeadamente os osteoblastos, serão capazes de se fixar à estrutura tridimensional proporcionada pelo material e desencadear os processos de formação de novo osso, auxiliados pela estabilidade proporcionada e as matérias-primas que o biomaterial irá libertar ao longo de todo o processo.

A formação de novo tecido ósseo pode ser em grande parte limitada por processos de oxidação, os quais podem ser contrariados pela capacidade antioxidante teórica do material implantado. O princípio da ação do biomaterial é de potenciar todo este processo biológico de formação de novo tecido, acelerando o processo através de uma maior eficácia.

Com todos estes parâmetros verificados, no final das 12 semanas de implantação, prevê-se que o local implantado tenha regenerado totalmente do defeito induzido, o qual não teria acontecido por se tratar de um defeito de tamanho crítico.

Assim é de considerar que a utilização de um biomaterial biodegradável terá grande potencial para assistir à regeneração óssea, não só pelos resultados obtidos em estudos realizados anteriormente, mas também pelas suas características físicas e químicas, que com base no conhecimento da fisiologia do tecido ósseo, possam promover esse mesmo efeito.

2. Limitações

O processo de avaliação de biocompatibilidade, segurança e eficácia de um biomaterial implantado é complexo e necessita de um controlo de inúmeras variáveis antes, durante e após o procedimento, o qual torna o processo bastante demorado e difícil de executar.

Apesar das dificuldades encontradas, foi sempre possível arranjar as melhores soluções para viabilizar o estudo ao qual nos comprometemos, avançando nos passos iniciais e obtendo as informações que nos irão orientar até ao final do estudo.

Os resultados obtidos até à presente data não são conclusivos a nível estatístico para serem incluídos neste documento, apesar de demonstrarem a eficácia da técnica de avaliação biológica utilizada.

3. Análise à regulamentação e legislação

Na interpretação da legislação em vigor referente ao desenvolvimento de um dispositivo médico implantável e biodegradável, surgem uma série de dúvidas e questões derivadas de lacunas na própria legislação. Uma das questões que é levantada refere-se ao facto de não ser claro ou bem definido o conceito de biodegradação e/ou bioreabsorção de materiais passíveis de serem implantados. Esse facto leva a que não haja o conhecimento ou o controlo prévio do desenvolvimento deste tipo de dispositivo médico avançado, culminando numa situação de potencial risco para os indivíduos.

A obrigatoriedade de realização de ensaios clínicos após a comprovação de todas as questões de segurança e eficácia em animais experimentais, não se verifica atualmente, permitindo que os materiais desenvolvidos possam ser imediatamente colocados no mercado, tendo apenas que seguir as normas europeias, como a ISO 10993, para o desenvolvimento deste tipo de dispositivo médico.

Por fim, a legislação não é suficientemente clara no que toca à classificação de dispositivos médicos, levando a uma dificuldade na sua interpretação, sendo incluídos nas mesmas subclasses, dispositivos médicos que pouco têm em comum, quer na sua origem, quer na sua aplicabilidade.

Assim seria, a meu ver uma mais-valia para a regulamentação nacional e comunitária, a inclusão de novas *guidelines*, que possam clarificar e estender a compreensão das regras de classificação dos dispositivos médicos e os processos que levam ao seu desenvolvimento.

4. Áreas de desenvolvimento futuro

A investigação na área da regeneração óssea parece direcionar-se para técnicas com a utilização de biomateriais avançados, sobre os quais o seu comportamento pode ser moldado e adaptado individualmente, assim como poderão ser moldadas todas as suas características intrínsecas como a flexibilidade, durabilidade, biodegradação, pH e ainda a integração de entidades biológicas como hormonas, fatores de crescimento e enzimas. Por outro lado, a abordagem à capacidade destes materiais poderá ainda unir-se a técnicas de manipulação e terapias genéticas, como forma de potenciar todo o processo já descrito.

Clinicamente é importante evoluir no sentido do aumento da eficácia destas técnicas, mas também a redução dos custos destes procedimentos. Os principais custos associados têm origem no processo de produção dos biomateriais, mas também nos custos da cirurgia associada, os quais poderão ser ultrapassados por técnicas de produção que envolvam menores quantidades de energia, matérias-primas mais baratas e apresentações de biomateriais que proporcionem técnicas de implantação mais simples e rápidas.

A associação de biomateriais a outros compostos, pode tornar-se num caminho de grande interesse para as terapias de regeneração de osso.

Como o processo de formação óssea envolve uma série de fatores de crescimento e proteínas específicas (BMP-2), a incorporação deste tipo de entidades químicas pode ser uma solução para uma ativação direta dos processos de regeneração. Com a presença dos fatores de indução direta no biomaterial implantado, o tecido ósseo poderá ter um estímulo acelerado para que seja induzida a regeneração, atingindo melhores resultados finais (Hotz & Herr, 1994).

Estudos demonstraram que é possível combinar proteínas osteoindutivas com materiais a implantar como por exemplo a hidroxiapatite (Kawamura, Iwata, Sato, & Miura, 1987) e cerâmicas (Yamazaki, Oida, Akimoto, & Shioda, 1988) ou mesmo a combinação desses materiais com outros compostos como a combinação hidroxiapatite/colagénio (Takaoka et al., 1988).

Verificando-se estas possibilidades, as combinações de biomateriais, em particular os biovidros, com outras entidades químicas e orgânicas (fatores de crescimento, proteínas ou mesmo fármacos) poderão dar uma nova perspetiva a toda a abordagem de terapias regenerativas com base numa ciência de engenharia de tecidos avançada, que possa cruzar as suas técnicas e conhecimentos no âmbito dos biomateriais com outras áreas de forma translacional, aumentando ao máximo o rendimento das técnicas utilizadas sem que se

verifiquem quaisquer limitações na sua produção, na utilização e aplicação e nos efeitos adversos referentes à sua implantação nos tecidos lesados.

Referências Bibliográficas

I. Artigos Científicos

- Barrere, F., van Blitterswijk, C. A., & de Groot, K. (2006). Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *Int J Nanomedicine*, 1(3), 317-332.
- Borenfreund, E., & Puerner, J. A. (1985). Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett*, 24(2-3), 119-124.
- Burg, K. J., Porter, S., & Kellam, J. F. (2000). Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 21(23), 2347-2359.
- Ceberg, C., Jonsson, B. A., Prezado, Y., Pommer, T., Nittby, H., Englund, E., . . . Strand, S. E. (2012). Photon activation therapy of RG2 glioma carrying Fischer rats using stable thallium and monochromatic synchrotron radiation. *Phys Med Biol*, 57(24), 8377-8391. doi: 10.1088/0031-9155/57/24/8377
- Chen, Q. Z., Thompson, I. D., & Boccaccini, A. R. (2006). 45S5 Bioglass-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27(11), 2414-2425. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.11.025
- Cooper, G. M., Mooney, M. P., Gosain, A. K., Campbell, P. G., Losee, J. E., & Huard, J. (2010). Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. *Plast Reconstr Surg*, 125(6), 1685-1692. doi: 10.1097/PRS.0b013e3181cb63a3
- Dhert, W. J., Thomsen, P., Blomgren, A. K., Esposito, M., Ericson, L. E., & Verbout, A. J. (1998). Integration of press-fit implants in cortical bone: a study on interface kinetics. *J Biomed Mater Res*, 41(4), 574-583.
- Edwards, S. M., Donnelly, T. A., Sayre, R. M., Rheins, L. A., Spielmann, H., & Liebsch, M. (1994). Quantitative in vitro assessment of phototoxicity using a human skin model, Skin2. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 10(3), 111-117.
- Godbey, W. T., & Atala, A. (2002). In vitro systems for tissue engineering. *Ann N Y Acad Sci*, 961, 10-26.
- Gordeladze, J. O., Djouad, F., Brondello, J. M., Noel, D., Duroux-Richard, I., Apparailly, F., & Jorgensen, C. (2009). Concerted stimuli regulating osteo-chondral differentiation from stem cells: phenotype acquisition regulated by microRNAs. *Acta Pharmacol Sin*, 30(10), 1369-1384. doi: 10.1038/aps.2009.143
- Heddle, J. A. (1973). A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutat Res*, 18(2), 187-190.
- Hench, L. L. (1998). Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials*, 19(16), 1419-1423.
- Hench, L. L., & Polak, J. M. (2002). Third-generation biomedical materials. *Science*, 295(5557), 1014-1017. doi: 10.1126/science.1067404
- Hollinger, J. O., & Battistone, G. C. (1986). Biodegradable bone repair materials. Synthetic polymers and ceramics. *Clin Orthop Relat Res*(207), 290-305.
- Hotz, G., & Herr, G. (1994). Bone substitute with osteoinductive biomaterials--current and future clinical applications. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 23(6 Pt 2), 413-417.
- Jensen, E. D., Gopalakrishnan, R., & Westendorf, J. J. (2010). Regulation of gene expression in osteoblasts. *Biofactors*, 36(1), 25-32. doi: 10.1002/biof.72
- Joddar, B., & Ito, Y. (2011). Biological modifications of materials surfaces with proteins for regenerative medicine. *Journal of Materials Chemistry*, 21(36), 13737-13755. doi: 10.1039/c1jm10984g
- Kalfas, I. H. (2001). Principles of bone healing. *Neurosurg Focus*, 10(4), E1.
- Kandarova, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D., & Spielmann, H. (2005). The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on in vitro skin irritation tests--an assessment of the performance of the optimised test. *Altern Lab Anim*, 33(4), 351-367.
- Kawamura, M., Iwata, H., Sato, K., & Miura, T. (1987). Chondroosteogenetic response to crude bone matrix proteins bound to hydroxyapatite. *Clin Orthop Relat Res*(217), 281-292.

- Kotoura, Y., Yamamuro, T., Shikata, J., Kakutani, Y., Kitsugi, T., & Tanaka, H. (1985). A method for toxicological evaluation of biomaterials based on colony formation of V79 cells. *Arch Orthop Trauma Surg*, 104(1), 15-19.
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260(5110), 920-926.
- Liu, X., Rahaman, M. N., Liu, Y., Bal, B. S., & Bonewald, L. F. (2013). Enhanced bone regeneration in rat calvarial defects implanted with surface-modified and BMP-loaded bioactive glass (13-93) scaffolds. *Acta Biomater*, 9(7), 7506-7517. doi: 10.1016/j.actbio.2013.03.039
- Martin, R. A., Yue, S., Hanna, J. V., Lee, P. D., Newport, R. J., Smith, M. E., & Jones, J. R. (2012). Characterizing the hierarchical structures of bioactive sol-gel silicate glass and hybrid scaffolds for bone regeneration. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*, 370(1963), 1422-1443. doi: 10.1098/rsta.2011.0308
- Negishi-Koga, T., & Takayanagi, H. (2012). Bone cell communication factors and Semaphorins. *Bonekey Rep*, 1, 183. doi: 10.1038/bonekey.2012.183
- Oonishi, H., Hench, L. L., Wilson, J., Sugihara, F., Tsuji, E., Matsuura, M., . . . Mizokawa, S. (2000). Quantitative comparison of bone growth behavior in granules of Bioglass, A-W glass-ceramic, and hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res*, 51(1), 37-46.
- Park, J. B., & Lakes, R. S. (2007). *Biomaterials : an introduction* (3rd ed.). New York: Springer.
- Ratner, B. D. (2004). *Biomaterials science : an introduction to materials in medicine* (2nd ed.). Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press.
- Santos, L. H., Feres, C. A., Melo, F. H., Coelho, M. M., Nothenberg, M. S., Oga, S., & Tagliati, C. A. (2004). Anti-inflammatory, antinociceptive and ulcerogenic activity of a zinc-diclofenac complex in rats. *Braz J Med Biol Res*, 37(8), 1205-1213. doi: /S0100-879X2004000800011
- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., . . . Boyd, M. R. (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res*, 48(17), 4827-4833.
- Sela, J., & Bab, I. (2012). *Principles of bone regeneration*. New York: Springer.
- Sepulveda, P., Jones, J. R., & Hench, L. L. (2002). Bioactive sol-gel foams for tissue repair. *J Biomed Mater Res*, 59(2), 340-348.
- Spicer, P. P., Kretlow, J. D., Young, S., Jansen, J. A., Kasper, F. K., & Mikos, A. G. (2012). Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc*, 7(10), 1918-1929. doi: 10.1038/nprot.2012.113
- Stroganova, E. E., Mikhailenk, N. Y., & Moroz, A. (2003). Glass-based Biomaterials: Present and Future. *Glass and Ceramics*, 60, 5.
- Takaoka, K., Nakahara, H., Yoshikawa, H., Masuhara, K., Tsuda, T., & Ono, K. (1988). Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res*(234), 250-254.
- Turunen, T., Peltola, J., Yli-Urpo, A., & Happonen, R. P. (2004). Bioactive glass granules as a bone adjunctive material in maxillary sinus floor augmentation. *Clin Oral Implants Res*, 15(2), 135-141.
- Urist, M. R., Silverman, B. F., Buring, K., Dubuc, F. L., & Rosenberg, J. M. (1967). The bone induction principle. *Clin Orthop Relat Res*, 53, 243-283.
- Valiathan, M. S., & Krishnan, V. K. (1999). Biomaterials: an overview. *Natl Med J India*, 12(6), 270-274.
- Williams, D. (1999). The parting of the ways? How biomaterials may differ from advanced materials in the next century. *Med Device Technol*, 10(4), 8-11.
- Williams, D. F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29(20), 2941-2953. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.023
- Xynos, I. D., Edgar, A. J., Buttery, L. D., Hench, L. L., & Polak, J. M. (2000). Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 276(2), 461-465. doi: 10.1006/bbrc.2000.3503
- Xynos, I. D., Hukkanen, M. V., Batten, J. J., Buttery, L. D., Hench, L. L., & Polak, J. M. (2000). Bioglass 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation In vitro: implications and applications for bone tissue engineering. *Calcif Tissue Int*, 67(4), 321-329.
- Yamazaki, Y., Oida, S., Akimoto, Y., & Shioda, S. (1988). Response of the mouse femoral muscle to an implant of a composite of bone morphogenetic protein and plaster of Paris. *Clin Orthop Relat Res*(234), 240-249.

2. Teses

- Andreia Sofia de Paiva Figueiredo (2013). Estudo *in vivo* de Caracterização da Reação Inflamatória pós implantação de biomateriais à base de hidroxiapatite para aplicação em medicina dentária. Tese de Doutoramento, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. 186 pp.
- Cláudia Sofia Machado dos Santos (2012). *Avaliação de Dispositivos Médicos. A Aplicação do HTA Core Model da EUnetHTA*. Tese de Mestrado em Gestão e Economia da Saúde, Faculdade de Economia da Universidade de Coimbra. 157 pp.
- Fernando Alberto Deométrio Rodrigues Alves Guerra (1997). *Em Modelo Experimental para Estudos de Regeneração Óssea*. Tese de Mestrado em Experimentação Animal, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. 67 pp.
- Fernando João Monteiro Judas (2002). *Contribuição para o Estudo de enxertos ósseos granulados alógenos e de biomateriais*. Tese de Doutoramento, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. 317 pp.
- João Manuel do Couto Pinto Ferreira (2011). *Avaliação *in vivo* das actividades anti-inflamatória e analgésica de uma fracção enriquecida em proantocianidinas de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC*. Tese de Mestrado em Bioquímica, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.
- Rita Francisca de Vasconcelos Rodrigues Pereira (2013). *Avaliação da actividade anti-inflamatória de *Cymbopogon citratos* (DC) Stapf. em modelos *in vivo* de inflamação crónica*. Tese de Mestrado em Bioquímica, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. 83 pp.

3. Legislação

Decreto-Lei n.º 145/2009 de 17 de Junho

Diretiva 2007/47/CE de 5 de Setembro. Parlamento Europeu e do Conselho

Diretiva 2010/63/UE de 22 de Setembro. Parlamento Europeu e do Conselho

Relativa à proteção dos animais para fins científicos

International Standard ISO-10993, 23 de Abril de 2013. *Biological Evaluation of Medical Devices*