



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA INTEGRADA**  
**NÍVEL: MESTRADO ACADÊMICO**

**COMPÓSITO DE HIDROXIAPATITA-PENTÓXIDO DE NIÓBIO  $\beta$ HAP-NB**  
**NA FORMA DE ARCABOUÇO INDUZ REGENERAÇÃO ÓSSEA EM**  
**DEFEITO DE TAMANHO CRÍTICO EM CALVÁRIA DE RATOS**

**HUMBERTO BORDINI DO AMARAL PASQUINELLI**

**MARINGÁ – PR**

**2015**

**COMPÓSITO DE HIDROXIAPATITA-PENTÓXIDO DE NIÓBIO  $\beta$ HAP-NB  
NA FORMA DE ARCABOUÇO INDUZ REGENERAÇÃO ÓSSEA EM  
DEFEITO DE TAMANHO CRÍTICO EM CALVÁRIA DE RATOS**

HUMBERTO BORDINI DO AMARAL PASQUINELLI

Dissertação de mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia do  
Curso de Odontologia da Universidade Estadual  
de Maringá como requisito para obtenção do  
grau de Mestre em Odontologia Integrada.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luzmarina  
Hernandes

MARINGÁ – PR

2015

**COMPÓSITO DE HIDROXIAPATITA-PENTÓXIDO DE NIÓBIO  $\beta$ HAP-NB  
NA FORMA DE ARCABOUÇO INDUZ REGENERAÇÃO ÓSSEA EM  
DEFEITO DE TAMANHO CRÍTICO EM CALVÁRIA DE RATOS**

HUMBERTO BORDINI DO AMARAL PASQUINELLI

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Odontologia do Curso de  
Odontologia da Universidade Estadual de  
Maringá como requisito para obtenção do grau  
de Mestre em Odontologia Integrada.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Cléverson de Oliveira e Silva

Faculdade Ingá – Uningá

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eneri Vieira de Souza Leite e Mello

Universidade Estadual de Maringá - UEM

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luzmarina Herandes (Orientadora)

Universidade Estadual de Maringá - UEM

## **Agradecimentos**

Agradeço a minha orientadora professora Dr<sup>a</sup>. Luzmarina Hernandes por ter me concedido a honra de ser seu orientado, por todo o tempo e dedicação entregues ao desenvolvimento deste trabalho, e por todo o conhecimento comigo partilhado.

Agradeço a professora Dr<sup>a</sup>. Eneri Vieira de Souza e Mello, pela contribuição ao longo do trabalho, por todas as sugestões e companheirismo no decorrer do mesmo.

Agradeço ao professor Dr. Cléverson de Oliveira e Silva pela disponibilidade que sempre apresentou comigo, foi um prazer tê-lo como orientador na graduação e é uma alegria poder contar com sua colaboração também durante o trabalho no mestrado, sempre será uma referência para mim.

Agradeço a todo o departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá por todo o suporte, que foi essencial, na elaboração deste trabalho. A Taiana por toda a ajuda e apoio, e por estar sempre disponível a ajudar.

Agradeço a minha noiva Jéssica por todo o apoio nesses anos de mestrado, por compreender muitas vezes minha ausência e, por tornar esse período muito mais alegre, te amo.

Agradeço a toda a minha família por todo o apoio que foram essenciais para concluir mais essa etapa.

Agradeço a todos os meus amigos que sempre estiveram me dando forças durante os períodos mais conturbados da pesquisa.

Agradeço as técnicas de laboratório Maria Eurides, Maria dos Anjos e Maria Ângela, pela ajuda incondicional durante toda a etapa laboratorial e amizade nesse período, esse trabalho é grande parte fruto da participação de vocês.

Agradeço aos amigos Rafael de Oliveira Lazarin, Marcelo Augusto Seron, Alessandro Gavazzoni pela amizade e essencial contribuição em todas as etapas desse trabalho.

A CAPES pela concessão de bolsa de estudos e suporte financeiro.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente estavam envolvidos na elaboração deste trabalho, e que de certa forma contribuiu para que o mesmo pudesse ser realizado.

## Resumo

Para o desenvolvimento de arcabouços de biomateriais com ótimo desempenho no reparo ósseo, é extremamente importante compreender a interação células osteogênicas-escafolde. A hidroxiapatita (HAp) é um dos materiais que apresenta maior biocompatibilidade e bioatividade mas tem a desvantagem de não oferecer resistência à pressão; entretanto a HAp pode ser enriquecida com outros tipos de materiais mais resistentes como o nióbio (Nb), na forma de pentóxido de nióbio, formando um compósito hidroxiapatita-pentóxido de nióbio ( $\beta$ HAp-Nb). O pentóxido de Nb é um óxido biocompatível, resistente à corrosão e capaz de nuclear-se com a apatita, tornando-se bioativo. Temos avaliado a interface biomaterial-compósito do ponto de vista morfológico e físico-químico e os resultados tem demonstrado que o compósito apresenta as mesmas características de bioatividade da hidroxiapatita com a vantagem de ter maior dureza e resistência do nióbio. Entretanto não foi possível avaliar a osseointegração com o compósito uma vez que este foi manufacturado com poros na ordem de nanômetros. Desta forma, a presente proposta teve como objetivo avaliar a interação do compósito, na forma de arcabouço, com o tecido ósseo no processo de regeneração de defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos. Na calvária de ratos Wistar foi confeccionado um defeito de 8mm de diâmetro que foi preenchido com um arcabouço na forma de pastilha de  $\beta$ HAp-Nb (grupo experimental) ou  $\beta$ HAp (grupo controle). Os animais foram mortos 15, 30, 45 e 90 dias após a colocação das pastilhas e as amostras da calvária foram coletadas. Para o estudo histológico as amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% e processadas para inclusão em parafina para realização de cortes histológicos que foram corados com H&E, pelo tricômico de Mallory e técnica de Verhoeff. Foi realizada análise da fosfatase alcalina plasmática como um marcador da formação óssea. Também foram realizadas análises físico-químicas: difratometria de raios X, para identificar a estrutura cristalina das amostras, microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliar a microestrutura do material e, teste de microdureza de Vickers a fim de avaliar a resistência superficial do material. As pastilhas de  $\beta$ HAp e do compósito apresentaram poros que variaram entre 100 e 250 $\mu$ m. A temperatura de sinterização foi de 1080°C. A composição química das pastilhas de  $\beta$ HAp foi, 87,61% de HA e 12,4% de  $\beta$ -TCP. Na pastilha do compósito houve a formação de três fases cristalinas: CaNb<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (33,36%), PNb<sub>9</sub>O<sub>25</sub> (17,21%) e  $\beta$ -TCP (47,43%). Aos 15 dias de observação muitos poros apresentaram-se preenchidos por tecido conjuntivo. Ao menos um capilar de luz ampla/poro foi observado, em ambos os grupos. No grupo  $\beta$ HAp, ao redor do capilar, o tecido conjuntivo apresentou uma matriz mais homogênea e acidófila, sendo circunscrita por um tecido conjuntivo mais frouxo e celularizado. Diversos poros apresentaram muitas hemáceas fora do limite dos vasos. Nas pastilhas de compósito, alguns poros apresentaram-se parcialmente preenchidos por matriz óssea, com osteócitos em seu interior. Os poros mais distantes da margem apresentaram-se preenchidos por uma matriz mais basofílica enquanto aqueles mais próximos à margem onde havia osso neoformado, apresentaram uma matriz mais acidófila. Após 30 e 45 dias de reparo, um número maior de poros apresentou desenvolvimento de tecido ósseo em seu interior, em ambos os grupos. Aos 90 dias de avaliação ambos os grupos apresentaram os poros preenchidos quase que em sua totalidade por uma matriz mais madura, ou por tecido ósseo. Não houve desenvolvimento de fibrose em nenhum dos períodos estudados. A observação da interface osso-biomaterial demonstrou que houve osseointegração. Concluímos que a pastilhas do compósito baseado em  $\beta$ HAp-Nb com porosidade de 100 a 250 $\mu$ m atuou como arcabouço possibilitando a penetração de vasos sanguíneos e células

osteogênicas. Houve deposição de tecido ósseo no interior dos poros, sem formação de cápsula fibrosa e portanto houve osseointegração.

**Palavras-chave:** osseointegração, compósito hidroxiapatita-pentóxido de nióbio, arcabouço.

## Abstract

For developing biomaterials with optimal performance in bone repair, it is extremely important to understand the interaction osteogenic cells-framework. The hydroxyapatite (HAP) is a material which has high biocompatibility and bioactivity but has the disadvantage of not offering resistance to pressure; However HA may be supplemented with other more resistant materials such as niobium (Nb) in the form of niobium pentoxide, forming a hydroxyapatite-niobium pentoxide composite ( $\beta$ HAp-Nb). Pentoxide Nb is a biocompatible oxide, corrosion resistant and able to be nuclear biocompatible oxide with apatite, becoming bioactive. Our group is evaluating the composite biomaterial-interface point of morphological and physico-chemically and the results have shown that the composite has the same characteristics of bioactivity of hydroxyapatite with the advantage of higher hardness and resistance of niobium. However it was not possible to evaluate the osseointegration with the composite once it has been manufactured having pores on the order of nanometers. Thus, this proposal aims to evaluate the interaction of the composite, as scaffold, with bone tissue regeneration in critical-size defects in rat calvaria process. In calvaria of Wistar rats was made a defect 8mm in diameter that was filled with a scaffold in tablet form  $\beta$ HAp-Nb (experimental group) or  $\beta$ HAp (control group). The animals were killed 15, 30, 45 and 90 days after placement of the pads and samples were collected from calvaria. For histological analysis the samples were fixed in 4% paraformaldehyde and processed for paraffin embedding for performing histological sections were stained with H & E and by Mallory trichomic and Verhoeff technique. Alkaline phosphatase analysis was performed as a marker of bone formation. Physical and chemical analyzes were also performed: X-ray diffraction to identify the crystalline structure of the samples, scanning electron microscopy (SEM) to evaluate the microstructure of the material. The tablets  $\beta$ HAp and the composite had pores ranging between 100 and 250 $\mu$ m. The sintering temperature was 1080 °C. The chemical composition of the tablets of  $\beta$ HAp was, 87.61% of HA and 12.4% of  $\beta$ -TCP. On the composite insert was the formation of three crystalline phases: CaNb<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (33.36%), PNB9O25 (17.21%) and  $\beta$ -TCP (47.43%). After 15 days of observation presented many pores filled by connective tissue. At least one capillary wide / light pore was observed in both groups. In  $\beta$ HAp group around the capillary, the connective tissue showed a more homogeneous and acidophilic matrix, being circumscribed by a looser and cellularized connective tissue. Several pores showed many red blood cells outside the boundary of the vessels. In the composite pellets, some pores were presented partially filled by bone matrix with osteocytes inside. The farthest edge of the pores presented themselves filled by a more basophilic matrix while those closest to the shore where there was newly formed bone showed a more acidophilic matrix. After 30 and 45 days of repair, a greater number of pores showed development of bone tissue inside it, in both groups. At 90 days of evaluation both groups presented almost in its entirety by a more mature matrix, more acidophilus filled pores. The morphological characteristics of connective tissue intra-pores give evidence that the stimulus for the development of the matrix by osteoblasts may have been influenced by the chemical composition of the framework. We conclude that the composite pellets based on  $\beta$ HAp-Nb with porosity of 100 to 250 $\mu$ m acted as a scaffold allowing the penetration of blood vessels and osteogenic cells. Bone tissue was deposited within the pores, without the formation of fibrous capsule and thus there osseointegration.

**Keywords:** osseointegration, hydroxyapatite composite-niobium pentoxide, scaffold.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Procedimento cirúrgico para confecção de defeito de tamanho crítico (8mm) e implante de biomaterial na calvária de ratos .....54
- Figura 2.** Padrões de difração de raios X para o compósito  $\beta$ HAp-Nb (1:1 vol%) sinterizado por duas horas em diferentes temperaturas.....55
- Figura 3.** Microdureza Vickers da  $\beta$ HAp e do compósito  $\beta$ HAp-Nb sinterizado em diferentes temperaturas.....56
- Figura 4.** Micrografia Eletrônica de Varredura (MEV) da microestrutura da superfície do arcabouço do compósito baseado em  $\beta$ HAp-Nb.....57
- Figura 5.** Fotografia da calota craniana de ratos aos 15, 30, 45 e 90 dias após a realização de um defeito de tamanho crítico de 8 mm na calvária.....58
- Figura 6.** Frequência média dos escores representativos do grau de maturação do tecido conjuntivo que se desenvolveu no interior dos poros dos arcabouços de  $\beta$ HAp e do compósito baseado em  $\beta$ HAp-Nb, 15, 45 e 90 dias após o implante do biomaterial na forma de pastilha em defeito de tamanho crítico na calvária de ratos Wistar.....59
- Figura 7.** Fotomicrografia do defeito ósseo de tamanho crítico produzido na calvária de ratos 15 dias após o implante de um arcabouço na forma de pastilha de um compósito baseado em  $\beta$ HAp-Nb.....60
- Figura 8.** Fotomicrografia do defeito ósseo de tamanho crítico produzido na calvária de ratos 15 dias após o implante de um arcabouço na forma de pastilha de hidroxiapatita ( $\beta$ HAp).....61
- Figura 9.** Fotomicrografia do defeito ósseo de tamanho crítico produzido na calvária de ratos 45 dias após o implante de um arcabouço na forma de pastilha.....63
- Figura 10.** Fotomicrografia do defeito ósseo de tamanho crítico produzido na calvária de ratos 90 dias após o implante de um arcabouço na forma de pastilha de um compósito baseado  $\beta$ HAp-Nb.....65
- Figura 11.** Fotomicrografia do defeito ósseo de tamanho crítico produzido na calvária de ratos 90 dias após o implante de um arcabouço na forma de pastilha de hidroxiapatita ( $\beta$ HAp).....67
- Figura 12.** Eletromicrografia de varredura obtida de um arcabouço baseado em  $\beta$ HAp na forma de pastilha após 45 dias de implante em defeito de tamanho crítico na calvária de ratos.....68
- Figura 13.** Eletromicrografia de varredura obtida de um arcabouço baseado em  $\beta$ HAp-Nb na forma de pastilha após 45 dias de implante em defeito de tamanho crítico na calvária de ratos.....69



# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>13</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 REGENERAÇÃO ÓSSEA.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2 DEFEITO ÓSSEO DE TAMANHO CRÍTICO.....</b>	<b>16</b>
<b>3.3 BIOMATERIAIS.....</b>	<b>18</b>
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1 OBTENÇÃO DE HIDROXIAPATITA E NIÓBIO.....</b>	<b>21</b>
<b>4.2 PREPARAÇÃO DOS ARCABOUÇOS.....</b>	<b>22</b>
<b>4.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICA.....</b>	<b>23</b>
<b>4.3.1 MEDIDAS DE MICRODUREZA VICKERS.....</b>	<b>23</b>
<b>4.3.2 ANÁLISES POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX).....</b>	<b>23</b>
<b>4.4 EXPERIMENTO EM ANIMAIS.....</b>	<b>24</b>
<b>4.4.1 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....</b>	<b>25</b>
<b>4.5 ANÁLISE DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA.....</b>	<b>26</b>
<b>4.6 ESTUDO EM MICROSCOPIA ÓPTICA.....</b>	<b>26</b>
<b>4.6.1 DETERMINAÇÃO DA MATURAÇÃO DOS POROS.....</b>	<b>26</b>
<b>4.7 ESTUDO EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....</b>	<b>27</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
<b>5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....</b>	<b>29</b>
<b>5.1.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA POR DRX.....</b>	<b>29</b>
<b>5.1.2 MICRODUREZA VICKERS.....</b>	<b>29</b>
<b>5.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS PASTILHAS (MEV).....</b>	<b>29</b>
<b>5.3 FOSFATASE ALCALINA.....</b>	<b>30</b>
<b>5.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA E MACROSCÓPICA.....</b>	<b>30</b>
<b>5.5 ESTUDO HISTOLÓGICO.....</b>	<b>30</b>
<b>5.6 ESTUDO EM MEV.....</b>	<b>32</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>41</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>43</b>
<b>9.1 PROTOCOLO PARA INCLUSÃO EM PARAFINA.....</b>	<b>49</b>
<b>9.2 PROTOCOLO COLORAÇÃO HEMOTOXILIA E EOSINA.....</b>	<b>50</b>

**9.3 PROTOCOLO IMUNO-HISTOQUÍMICA PADRÃO.....52**

## 1. Introdução

A perda de tecidos decorrente de trauma ou doença resulta em sobrecarga socioeconômica e em perda de qualidade de vida para as pessoas, sendo funcionalmente debilitante (Szapalski *et al.*, 2010; Conz *et al.*, 2011). Nas últimas décadas um grande progresso foi feito no desenvolvimento de materiais que são indispensáveis nas áreas da saúde. Esses “biomateriais” incluem próteses, lentes, enxertos, *stents*, cateteres, tubos de circulação extra-corpórea e arcabouços (*scaffolds*), empregados na engenharia de tecidos, cujo avanço é hoje fundamental para o exercício da medicina regenerativa.

O mercado potencial de produtos, como pele, osso, cartilagem, etc, desenvolvidos via engenharia de tecidos, é estimado em cerca de 100 bilhões de dólares ao ano e representa uma alternativa de tratamento para o uso clínico (Bhumiratana *et al.*, 2011). Segundo Soares *et al.*, 2005, no Brasil, os gastos do Sistema Único de Saúde com ortopedia totalizaram cerca de R\$60 milhões no ano. A regeneração completa do osso e reestabelecimento de sua função torna-se uma promessa e de grande interesse comercial mundial (Zambuzzi *et al.*, 2009).

Materiais metálicos como o aço inoxidável austenítico, cromo-cobalto, titânio e suas ligas possuem propriedades mecânicas adequadas para uso em implantes e são usados rotineiramente na restauração de estruturas anatômicas; entretanto são suscetíveis à degradação química e eletroquímica (Nascimento, 2009).

Uma liga metálica ideal para implantes deve apresentar baixo módulo de elasticidade, baixa densidade, excelente resistência mecânica, alta resistência à corrosão, conformabilidade de acordo com a função mecânica no organismo e não deve conter elementos tóxicos. Dentre os metais usados para implante, o que mais resiste a todos os tipos de corrosão é o titânio e suas ligas, seguido por nióbio e tântalo e o que menos resiste é o aço inoxidável (Nascimento, 2009).

O Brasil possui as maiores reservas de nióbio, e somado a este fato, este metal tem ainda vantagem de apresentar boas propriedades mecânicas, ser biocompatível e resistente à corrosão, de forma que pode ser utilizado como material de reforço para melhorar as propriedades biomecânicas na produção de compósitos elaborados pela combinação do nióbio com outros materiais menos resistentes, como a hidroxiapatita (HAp) (Brasil, 2008).

Trabalhos anteriores já comprovaram que é possível desenvolver um compósito nanoestruturado com o pentóxido de nióbio ( $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ) e a hidroxiapatita (HAp) pelo método de metalurgia do pó apontando para um desenvolvimento promissor de novos materiais bioativos (Nascimento, 2009; Nascimento *et al.*, 2011).

Até o presente não há estudos publicados, analisando o comportamento dos tecidos, frente ao compósito hidroxiapatita-nióbio ( $\beta$ HAp-Nb) e tampouco seu potencial no processo de reparo ósseo *in vivo*. Por este motivo, temos avaliado as propriedades físico-químicas (Bonadio, 2014) e biológicas (Kiyoshi Júnior, 2013; Candido, 2014) de um compósito baseado em hidroxiapatita-pentóxido de nióbio ( $\beta$ HAp-Nb) no reparo ósseo, em defeitos de tamanho crítico (DTC) (Cooper *et al.*, 2010; Lansdowne., 2010; Gomes e Fernandes., 2011) na calvária de ratos.

Este material, quando apresentado na forma de pastilha densa (*bulk*), com porosidade variando entre 1 a  $2,5\mu\text{m}$ , foi biocompatível, bioativo e apresentou propriedades osteocondutora (Kiyoshi Júnior, 2013) e osteoindutora (Candido, 2014), estimulando o desenvolvimento ectópico de matriz óssea. No entanto, a capacidade do compósito, com poros maiores, de atuar como um arcabouço para o reparo ósseo ainda não foi avaliada.

Os principais pré-requisitos para um bom arcabouço são: alta porosidade, superfície que permita a adesão, diferenciação e proliferação celular, integridade mecânica e ausência de toxicidade (Jones, 2009; Descamps *et al.*, 2009). A metalurgia ainda não conseguiu desenvolver uma estrutura que apresentasse todos os requisitos necessários a um bom arcabouço, de modo que o desenvolvimento de novos biomateriais e as técnicas de produção são essenciais para o sucesso da engenharia do tecido ósseo (Kokubo *et al.*, 2009). Um arcabouço ideal irá fornecer um suporte mecânico para um sítio injuriado e também estimular a diferenciação osteogênica que promoverá o crescimento ósseo (Service, 2000) portanto, é importante compreender a interação entre as células osteogênicas e o arcabouço. Esta interação somada à presença de fatores de crescimento tem se constituído no cerne das estratégias empregadas para alcançar a regeneração do tecido ósseo danificado.

## **2.Objetivo**

Considerando que nos primeiros estudos realizados com o compósito  $\beta$ HAp-Nb na forma de pastilha densa (*bulk*), com microporos, observou-se uma boa interação entre

a superfície do biomaterial e o osso neoformado, a hipótese desse trabalho é que na presença de poros maiores, entre 100 e 250 $\mu$ m, o compósito atue como um arcabouço, possibilitando a osseointegração. Portanto o objetivo deste trabalho foi avaliar a interação entre um arcabouço constituído pelo compósito  $\beta$ HAp-Nb e o tecido ósseo durante a regeneração de defeito de tamanho crítico na calvária de ratos.

Os materiais usados neste estudo, bem como as análises físico-químicas e obtenção de imagens em microscopia eletrônica de varredura (MEV), foram realizadas pela aluna de doutorado do programa de Pós-graduação em Física da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Taiana Gabriela Moretti Bonadio sob a orientação dos professores Mauro Luciano Baesso e Wilson Ricardo Weinand.

As metas foram:

- 1) Estudar a interação entre o compósito  $\beta$ HAp-Nb e o tecido ósseo durante a regeneração dos defeitos ósseos, por meio das seguintes metodologias:
  - a) Estudo histológico, em cortes de parafina, corados com hematoxilina e eosina, Verhoeff e tricrômico de Mallory;
  - b) Estudo morfológico em MEV;
  - c) Análise bioquímica para detectar a fosfatase alcalina plasmática, como marcador de formação óssea;

### **3. Revisão de Literatura**

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo dinâmico, rígido, que tem a capacidade única de cicatrizar e remodelar sem deixar cicatriz (Sommerfeldt e Rubin, 2001.,Kanczler e Oreffo, 2008; Titorencu *et al.*, 2014). O tecido ósseo, consiste em uma matriz composta de proteínas e íons e diversos tipos celulares que atuam na remodelação e síntese de novo tecido (Titorencu *et al.*, 2014). As fibras de colágeno compreendem cerca de 90% da proteína total do osso, sendo os outros 10% composto por proteoglicanas, por proteínas de ligação celular como fibronectina, trombospontina, osteopontina e sialoproteína óssea (Robey *et al.*, 1989; Somerman *et al.*, 1988), proteínas carboxiladas e proteínas relacionadas ao crescimento ósseo (Hauschka *et al.*, 1988; Canalis *et al.*, 1989).

O osso fornece suporte estrutural para os músculos esqueléticos transformando suas contrações em movimentos úteis e constitui um sistema de alavancas que amplia

as forças geradas na contração muscular. Também atua exercendo proteção física de órgãos vitais como os contidos nas caixas craniana e torácica e no canal medular (Sommerfeldt e Rubin, 2011). Esse tecido sofre remodelação ao longo da vida, através de um processo de formação-reabsorção, representados pelas células formadoras de tecido ósseo (osteoblastos, osteócitos) e pelas células de reabsorção óssea (osteoclastos).

Funcionalmente os osteoblastos são células responsáveis pela deposição de matriz extracelular, além de regular a sua mineralização, e estão localizadas na superfície do osso, junto de seus precursores. Dentre as proteínas sintetizadas pelos osteoblastos estão o colágeno tipo I e proteínas não colagênicas como a osteopontina, osteocalcina e a sialoproteína óssea, essas que possuem papel fundamental no processo de mineralização (Judas *et al.*, 2012). São células completamente diferenciadas que não apresentam capacidade de migração e proliferação, porém são muito ativas (Judas *et al.*, 2012).

Derivados dos osteoblastos, os osteócitos são menores em tamanho e mais abundantes no osso e residem nas lacunas da matriz óssea, sendo a forma madura do osteoblasto que, permanecem secretando substâncias necessárias à manutenção do osso (Junqueira e Carneiro, 2013). São responsáveis por enviar sinais tanto para a reabsorção quanto para a formação óssea, além disso, acredita-se que ele atue direcionando tanto as atividades dos osteoclastos quanto dos osteoblastos no osso (Bab e Sela, 2012).

Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas (Bab e Sela, 2012; Judas *et al.*, 2012), encontrados superfície óssea e na superfície do periósteo. Derivados de células hematopoiéticas, os osteoclastos, além de possuírem alta capacidade migratória, possuem a capacidade de reabsorver osso totalmente mineralizados, e para desempenharem tal função necessitam se tornar células altamente especializadas (Sommerfeldt e Rubin, 2011). Sua atividade é coordenada por citocinas e por hormônios como a calcitonina e o paratormônio (Hernández-Gil *et al.*, 2006).

### **3.1 Regeneração óssea**

Histologicamente o tecido ósseo pode ser dividido em dois tipos, o tecido ósseo imaturo ou primário e tecido ósseo maduro, secundário ou lamelar. Se diferenciam pela orientação das fibras colágenas, pois no tecido imaturo essas fibras se

dispõem irregularmente, enquanto que no maduro as fibras se orientam em lamelas, além de apresentar maior quantidade de minerais e menores proporções de osteócitos do que o osso lamelar.

A regeneração óssea por sua vez pode ser dividida em três eventos biológicos distintos: a fase inflamatória, a reparativa e a remodeladora. A primeira etapa é caracterizada pela formação de coágulo, que contém vários mediadores inflamatórios, fatores angiogênicos e do crescimento, que são liberados pelas plaquetas, mastócitos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos. A segunda fase consiste na construção do calo ósseo e a terceira na remodelação e formação de um novo tecido ósseo. Dentre essas etapas, a remodelação é o processo fisiológico mais lento e, que ocorre durante longo período de tempo (Cachioli *et al.*, 2006), caracterizado pela reabsorção realizada pelos osteoclastos, concomitantemente com a síntese de osso novo, pelos osteoblastos (Bab e Sela, 2012; Chim *et al.*, 2013; Jilka, 2013). Esse equilíbrio é fundamental na regulação da quantidade de reabsorção e deposição a fim de manter o tamanho, forma e integridade do osso (Chim *et al.*, 2013).

Durante o processo de diferenciação osteogênica as células mesenquimais passam por diversos estágios de desenvolvimento tais como: 1) células tronco mesenquimais; 2) células osteoprogenitoras; 3) pré-osteoblastos; 4) osteoblastos; 5) osteócitos (Heng *et al.*, 2004), tendo a angiogênese um papel fundamental pois os vasos sanguíneos atuam fornecendo oxigênio, nutrientes, hormônios, citocinas, bem como células precursoras de osteoblastos e osteoclastos (Kanczler e Oreffo, 2008; Chim *et al.*, 2013).

### **3.2 Defeito ósseo de tamanho crítico**

Os modelos experimentais podem ser classificados como ortotópicos quando o material a ser estudado é introduzido diretamente no defeito ósseo, ou heterotópicos quando o material a ser estudado é introduzido por via subcutânea, intramuscular, intraperitoneal ou no mesentério (Gomes e Fernandes, 2011).

Um dos modelos mais difundidos na literatura, é o defeito de tamanho crítico realizado em calvária de ratos, pois esse tipo de defeito é capaz de determinar a eficácia de determinado biomaterial no processo de regeneração (Taga, 2008; Cestari *et al.*, 2009).

O defeito de tamanho crítico (DTC) consiste no menor defeito realizado em uma espécie animal, que não cicatriza espontaneamente durante o tempo de vida, ou seja, este defeito deve ser grande o suficiente para que não haja cura espontânea (Cooper *et al.*, 2010; Lansdowne, 2010; Gomes e Fernandes, 2011). Mais especificamente um defeito de tamanho crítico tem sido descrito como um defeito que quando não for utilizado nenhum material como preenchimento, o resultado deve ser a formação de tecido conjuntivo fibroso, ao invés de osso (Lansdowne, 2010). O tamanho do defeito de tamanho crítico varia de espécie para espécie.

De maneira geral, o DTC em calvária é muito popular, principalmente devido ao fato da estrutura óssea da calvária permitir o estabelecimento de um defeito uniforme, reproduzível e, facilmente avaliado através de análise histológica. Sua localização facilita o acesso cirúrgico e o manuseio operatório, sendo que, a dura-máter e o perióstio localizados acima do defeito criam um suporte adequado para os materiais implantados, não havendo necessidade de fixação interna ou externa (Gomes e Fernandes, 2011). A dura-máter desempenha um papel significativo na cura dos defeitos realizados em calvária, pois parece ser a fonte primária de células osteogênicas e fatores osteoindutores durante a fase de cura das feridas (Gomes e Fernandes, 2011).

A localização anatômica de um defeito e a estabilidade são fatores importantes, pois, as tensões musculares, a carga exercida e o grau de mobilidade podem afetar diretamente o resultado final da regeneração óssea (Cacchioli *et al.*, 2006). Essa cadeia de eventos decorrente do reparo pode ocorrer através de duas modalidades diferentes, dependendo da região onde foi realizada a fratura.

A chamada ossificação endocondral é a principal responsável pela formação dos ossos curtos e longos (Dyce *et al.*, 2006), inicia-se sobre uma cartilagem hialina formada através da condensação do mesênquima, e que vai adquirindo forma semelhante ao osso que será constituído. Em seguida, essas células condensadas acabam se diferenciando em condrócitos, células responsáveis pela elaboração de uma substância que constitui o esboço do futuro osso. Essa cartilagem passa então a sofrer modificações, como a hipertrofia dos condrócitos, seguido de desmineralização e morte dos mesmos. Em seguida, essa área sofre invasão de capilares sanguíneos e células mesenquimatosas indiferenciadas oriundas do conjuntivo adjacente, células responsáveis em se diferenciar em osteoblastos, as quais passarão a depositar matriz óssea sobre os restos da cartilagem mineralizada.



A ossificação intramembranosa que é caracterizada por invasão de capilares nas zonas mesenquimais e o surgimento e diferenciação de células em osteoblastos maduros, que acabam por secretar matriz óssea continuamente.

### **3.3 Biomateriais**

O material a ser introduzido em defeitos ósseos por definição é uma substância ou associação de duas ou mais substâncias, farmacologicamente inertes, de origem natural ou sintética, utilizados para substituir, aumentar ou melhorar, parcial ou integralmente o tecido (Williams, 1987). Tais materiais devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos hospedeiros, de modo a estimular uma resposta adequada dos mesmos (Kawachi *et al.*, 2000), e são classificados como biomateriais (Williams, 1987).

Em odontologia, os biomateriais podem ser utilizados para o aumento ou reconstrução do rebordo alveolar, preenchimento de defeitos intraósseos e de alvéolos dentários, elevação do assoalho do seio maxilar e, tratamento de defeitos periimplantares (Legeros, 2002; Murugan e Ramakrishna, 2005).

Os biomateriais podem ser classificados como: osteogênicos, quando são capazes de promover a formação óssea por carregarem células ósseas; osteoindutores, quando são capazes de induzir a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos; e osteocondutores quando sua estrutura serve de arcabouço ou substrato estrutural favorável para a migração de células e deposição óssea, desta forma, um biomaterial pode ser gradativamente reabsorvido e simultaneamente substituído por novo tecido ósseo (Novaes Júnior *et al.*, 2000; Urist, 2002).

Os substitutos ósseos considerados como padrão ouro são os enxertos autógenos (Teixeira, 2009), entretanto, as restrições para a sua obtenção estimulam a pesquisa por outros materiais. Os materiais sintéticos por sua vez, diferem muito entre si, devido a sua composição e estrutura, e, um único material, jamais apresentará todas as características desejáveis como um substituto ósseo (Murugan e Ramakrishna, 2005). Também não é raro que os materiais artificiais implantados em reparos ósseos sejam encapsulados por tecido fibroso (Kokubo *et al.*, 2005; Moreschi *et al.*, 2010) que os isola, impedindo sua adesão ao osso adjacente (Kokubo *et al.*, 2005).

As cerâmicas de fosfato de cálcio, como a hidróxiapatita ou tricálcio fosfato, apresentam biocompatibilidade, osteocondutividade, ausência de toxicidade e

permitted the process of progressive substitution, in addition to being a sterilizable material, relatively non-resorbable and having a uniform composition (Ono *et al.*, 2000)

Among calcium phosphate ceramics, hydroxyapatite is the most studied and most used for clinical purposes (Oréfice, 2006). Considered an osteoinductive material, it has the capacity to form a scaffold for the migration of angiogenic and osteogenic cells (Fleckenstein *et al.*, 2006). Among its indications is the repair of bone defects in dental and orthopedic applications (Aoki, 1991).

Another calcium phosphate of great importance is tricalcium phosphate (TCP), whose structural formula is  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . It is a biologically resorbable material and can occur in two forms:  $\alpha$ -TCP and  $\beta$ -TCP, with the latter being bioactive, non-toxic, osteoconductive and biodegradable (Dorozhkin, 2009).  $\beta$ -TCP was one of the first compounds to be used as a scaffold for bone regeneration (Szpalski *et al.*, 2010).

The combination of the properties of hydroxyapatite with  $\beta$ -TCP results in a biphasic calcium phosphate ceramic (HA- $\beta$ TCP) that is resorbable, capable of developing a bioactive fixation at the tissue-implant interface (Bouler *et al.*, 2001; Dorozhkin, 2011). These biphasic ceramics are biologically more active than pure HA (Yubao *et al.*, 1997).

Acting as a scaffold, this composite is resorbed *in vivo*, releasing calcium and phosphate ions into the microenvironment, and these ions can then be used to build bone through a process of resorption and formation (Szpalski *et al.*, 2010). However, its mechanical properties are poor, presenting slight fragility that makes it incapable of resisting fatigue, becoming susceptible to collapse (Liu and Lun., 2012).

In this way, they can be enriched with other types of materials in order to overcome the disadvantages and improve their physical and biological properties. When associated with more resistant materials such as niobium (Nb), a metal that presents low toxicity (Yamamoto *et al.*, 2004), it promotes calcification by NHOst cells (NHOst- *normal humanosteoblasts*) and stimulates the activity of alkaline phosphatase, an important factor in the generation of new bone (Isama and Tsuchiya, 2003; Tamai *et al.*, 2007).

O Brasil detém a maior reserva de nióbio no cenário mundial, atingindo aproximadamente 93% da produção mundial (Silva, 1994), estando essas reservas concentradas nos estados de Minas Gerais (73,11%), Amazonas (25,42%) e Goiás (1,47%) (Silva, 2001).

Uma de suas mais promissoras aplicações, processado via metalurgia do pó, é o uso em implantes cirúrgicos. Esses materiais porosos, biocompatíveis possuem uma superfície que favorece a interação do implante com o osso (Leite *et al.*, 2011), além de apresentar uma alta afinidade por oxigênio, formando facilmente o pentóxido de nióbio ( $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ), sendo esse óxido biocompatível, resistente a corrosão e possuir o grupo funcional Nb-OH em sua superfície que induz a nucleação de apatita tornando-o bioativo. Neste sentido, os estudos com  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  podem ser uma alternativa para redução dos custos de produção devido ao fato de sua síntese ser realizada em atmosfera de ar, em temperaturas menores que a dos metais. Além disso, o pentóxido de nióbio pode ser moído junto com a hidróxiapatita (Nascimento *et al.*, 2011), possibilitando a formação de reações de estado sólido facilitando as transições de fase na formação dos compósitos (Nascimento *et al.*, 2011).

A porosidade de um material varia, de modo geral, com a temperatura e o tempo de sinterização. Desse modo, a porosidade poderia ser controlada de modo a assegurar uma superfície específica para facilitar a etapa de osseointegração (Leite *et al.*, 2011).

## **4. Metodologia**

Os itens 4.1, 4.2 e 4.3 foram executados pela doutoranda Taiana Gabriela Moretti Bonadio do departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá.

### **4.1. Obtenção de hidroxiapatita (HAp) e nióbio (Nb)**

Para a produção da hidroxiapatita (HAp) foram utilizados ossos de peixe jovem, *Pseudoplatystomacorruscans*, conhecido como “Pintado”. Os ossos foram cedidos pelo Núcleo de Pesquisas em Limnologia Ictiologia e Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá (NUPELIA-UEM). O processamento dos ossos, preparação e confecção das pastilhas foi realizado no Departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá.

Inicialmente, os ossos foram limpos em água quente e lavados para a remoção dos tecidos moles. O material restante foi seco ao ar e calcinado por 8 horas a 900 °C para que todos os resíduos orgânicos fossem eliminados, restando apenas a fase mineral dos ossos. A seguir o material foi moído por 8 horas em moinho (Retsch<sup>®</sup> PM 100, Haan, Alemanha), utilizando-se vaso de moagem e esferas de aço inox em razão de massa esfera/massa pó igual a 6/1.

O pentóxido de nióbio (Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) foi produzido a partir do nióbio cedido pela Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM, Araxá, Brasil), possuindo 03 diferentes estruturas cristalinas. O material foi então aquecido em atmosfera livre a 1100°C por uma hora, restando após o tratamento apenas uma estrutura monofásica. E então submetido ao processo de moagem de altas energias para que houvesse a redução do tamanho das partículas.

## 4.2. Obtenção do compósito ( $\beta$ HAp-Nb) e preparação dos arcabouços de $\beta$ HAp

Para a produção do compósito  $\beta$ HAp-Nb os pós precursores,  $\beta$ HA e  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  foram misturados na proporção de 1:1 em volume percentual e moídos em moinho de bolas de alta energia por 3 horas a 300rpm com razão massa esfera/massa pó igual a 6/1.

Após o processo de moagem os pós foram misturados na proporção de 1:1 em volume percentual de lactose para a produção dos poros do arcabouço. Foram utilizadas partículas esféricas de lactose SuperTab® (DFE Pharma, Goch, Alemanha) obtidas pelo procedimento de *spray dry*, para obtenção dos poros. O diâmetro das partículas foi selecionado entre 150 e 250  $\mu\text{m}$  por meio de tamisação .

A mistura foi então prensada uniaxialmente a 450 Mpa, em forma de pastilhas cilíndricas e submetida a sinterização em ar em diferentes temperaturas (entre 900 e 1150°C) por duas horas a fim de selecionar uma temperatura cujas propriedades de contração linear, densidade e microdureza Vickers fossem maximizadas.

Durante o aquecimento do compósito, toda a lactose foi eliminada, restando em seu lugar poros entre 100 e 250  $\mu\text{m}$ . Após a sinterização, os arcabouços ficaram com diâmetro de 8mm e espessura de 1 mm.

As peças sinterizadas foram lixadas até atingirem uma espessura de 0,8mm e lavadas em ultrassom em três etapas: acetona, água e álcool, esterilizadas em autoclave e armazenadas até seu uso.

Para a produção dos arcabouços de  $\beta$ HAp, usados como controle, o procedimento adotado foi semelhante, exceto pela etapa de mistura e moagem com  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ .

Para molde das pastilhas foi utilizado uma peça de calvária removida após perfuração com uma broca de 8 mm, do tipo trefina (Neodent®), montada em peça-reta (Kavo®), acoplada a um motor elétrico cirúrgico (Branemarck System®), realizada em um estudo piloto. Tais dimensões foram baseadas no tamanho do DTC que se pretendia estudar.

### **4.3. Análises físico-químicas**

#### ***4.3.1. Medidas de microdureza Vickers***

As medidas de microdureza foram realizadas em uma máquina de ensaios UMT-2 Multi-Specimen Test System, CETR, USA. Foram realizadas 10 indentações em cada amostra sinterizada a 1080°C utilizando uma carga de 3N. Os valores de microdureza Vickers foram calculados por meio das medidas das diagonais marcadas na amostra pela pirâmide.

A técnica fornece informação sobre a resistência superficial do material à deformação plástica localizada, devido à penetração de uma ponta, ou indentador. Esta técnica utiliza um penetrador de diamante piramidal que deixa uma marca na forma de um losango na amostra. A força aplicada na direção da amostra faz com que haja uma perfuração na mesma. Quanto mais resistente for o material, menor será a penetração e conseqüentemente menor a marca deixada na amostra.

#### ***4.3.2. Análise por difração de raios X (DRX)***

As fases cristalinas presentes nos pós precursores e nas pastilhas sinterizadas foram observadas por difração de raios X. As medidas foram conduzidas utilizando um difratômetro (Shimadzu® XRD – 7000, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) com radiação CuK $\alpha$ . Os difratogramas foram obtidos no intervalo ( $2\theta$ ) de 20 a 45° com velocidade de 2°/min. A identificação das fases foi realizada utilizando um banco de dados do comitê internacional *Joint Committee of Powder Diffraction Standards* (JCPDS) no qual podem ser encontrados os registros (fichas) dos padrões de difração que podem facilmente ser comparadas aos resultados experimentais por meio do programa *X'PertHighScore*.

Para a análise quantitativa das fases cristalinas foi realizado um refinamento estrutural pelo método de Rietveld que é empregado na caracterização de materiais estudados por difração de raios X. Com esse método é possível fazer um ajuste dos parâmetros da estrutura cristalina dos materiais medidos por difração de raios X. Desta forma, é possível obter informações estruturais da amostra como posições atômicas,

parâmetro de rede, proporção entre as fases cristalinas, etc. Esses parâmetros são ajustados minimizando a diferença entre as intensidades calculada e experimental dos picos obtidos no difratograma.

Matematicamente, o método dos mínimos quadrados minimiza a quantidade:

$$S = \sum_{i=1}^n w_i (I_{\text{exp}} - I_{\text{calc}})^2$$

Sendo,

$I_{\text{exp}}$  : intensidade experimental;

$I_{\text{calc}}$ : intensidade calculada;

$w_i : I/I_{\text{obs}}$ , ou seja,  $w_i$  é o “peso” para cada ponto medido, conhecido também como o inverso da variância.

Um bom refinamento deve ser feito analisando principalmente a concordância gráfica entre os valores experimentais e calculados e fatores matemáticos que avaliam a qualidade do refinamento.

#### **4.4. Procedimentos experimental com animais**

Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (parecer n° 070/2014).

Foram utilizados 56 ratos Wistar machos (*Rattusnorvegicus*, variedade *albinus*) adultos, com 90 dias de idade, com peso corporal entre 200 e 250g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá.

#### **4.4.1. Procedimento cirúrgico**

Os animais foram anestesiados por via intramuscular com uma associação 1:1 de xilazina (0,1ml/100g) (Rompun®, Bayer, São Paulo, Brasil) e ketamina (0,1ml/100g) (Agener, São Paulo, Brasil). Após epilação manual da região da cabeça e anti-sepsia com iodo tópico os animais foram devidamente imobilizados e foi então realizada uma incisão transversal da pele até o periósteo, na região da calota craniana, da base da orelha esquerda até a base da orelha direita. A seguir, todo o conjunto de tecidos foi deslocado com a ajuda de uma espátula do tipo *molt*, a fim de expor o osso e gerar uma maior visualização da área a ser removida. Na calvária de cada animal foi produzido um defeito ósseo com oito mm de diâmetro e 0,8 mm de profundidade utilizando-se uma broca de oito mm, do tipo trefina (Neodent®), montada em peça-reta (Kavo®), acoplada a um motor elétrico cirúrgico (Branemarck System®), sob rotação de 1500 r.p.m. com abundante irrigação com soro fisiológico estéril.

A seguir os defeitos de tamanho crítico (DTC) produzidos foram preenchidas com as pastilhas de  $\beta$ HAp-Nb ou  $\beta$ HAp, e o retalho suturado com pontos simples de Mononylon 4-0 (Ethicon® Johnson, USA). A região recebeu aplicação tópica da solução alcoólica de polivinilpirrolidona iodada, como medida anti-séptica local (Figura 1).

Os animais foram observados no período inicial da recuperação anestésica e em seguida mantidos em gaiolas individuais em condições apropriadas, com ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura de 20°C com ração e água *ad libitum*, no biotério setorial do Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá. Os animais foram observados durante todo o período experimental, quanto ao desenvolvimento de alterações clínicas no local da cirurgia.

Os animais foram divididos em 2 grupos de acordo com a composição química da pastilha implantada no defeito ósseo: (1) Grupo  $\beta$ HAp-Nb, experimental, e (2) Grupo  $\beta$ HAp, como controle.

Após 15, 30, 45 e 90 dias de observação, os animais (n=7/grupo/período) foram mortos por meio de injeção intraperitoneal com o triplo da dose anestésica da associação 1:1 de xilazina (0,1ml/100g) (Rompun®, Bayer, São Paulo, Brasil) e



ketamina (0,1ml/100g) (Agener, São Paulo, Brasil). As amostras da calvária foram então coletadas e encaminhadas para estudo histopatológico.

#### **4.5. Análise bioquímica da atividade da fosfatase alcalina**

A atividade da fosfatase alcalina (U/ml) foi avaliada por método colorimétrico em amostras de sangue coletadas de 14 animais dos grupos  $\beta$ HAp e  $\beta$ HAp-Nb, 45 dias após a realização dos implantes na calvária. Foi utilizando um *kit* comercial (Abcam, ab83369). A absorbância foi medida por meio de um leitor de placas (Multiskan EX® Virginia, USA) a 405nm, e a diferença entre os grupos estudados foi avaliada pelo teste de Mann-Whitney, sendo  $p < 0,05$  considerado estatisticamente significativo. O resultado foi expresso como a média  $\pm$  DP da atividade da fosfatase alcalina.

#### **4.6. Estudo em microscopia óptica**

Para estudo microscópico, as amostras de calvária contendo os DTCs com os implantes foram fixados em solução de paraformaldeído 4%, descalcificados em solução de Morse (ácido fórmico 50% e citrato de sódio 20%) por 15 dias. Após a desmineralização cada amostra foi dividida ao meio e processada para inclusão em parafina. Foram feitos cortes semi-seriados de 7 $\mu$ m, corados com (a) hematoxilina e eosina (H&E), (b) Verhoeff. Também foram feitos cortes de 10 $\mu$ m que foram corados com (c) tricrômico de Mallory.

As laminas coradas com com H&E, Verhoeff e Mallory foram usadas para o estudo histológico e para a avaliação do grau de maturação do tecido que se desenvolveu nos poros do arcabouço.

##### ***4.6.1. Determinação do grau de maturação dos tecidos dos poros***

O grau de maturação dos tecidos que preencheram os poros foi determinado em três cortes histológicos de cinco animais de cada grupo. Foram selecionados os

melhores cortes, independentemente da coloração (H&E, Mallory ou Verhoeff). A região da pastilha foi dividida em três partes iguais, margem esquerda, centro e direita, com o auxílio de um estereomicroscópio Olympus® SZ61 (Toquio, Japão), e estas áreas foram consideradas para análise. A observação dos poros foi realizada em microscópio óptico trinocular Nikon® Eclipse 80i (Toquio, Japão). Utilizou-se como escore final de cada animal a média dos graus observados em cada região da pastilha.

O grau de maturação do tecido que preenchia os poros foi estabelecido tendo como base o aspecto morfológico da matriz extracelular: (a) Grau 1: presença de tecido conjuntivo frouxo delicado; (b) Grau 2: presença de tecido conjuntivo mais denso, com maior deposição de matriz acidófila; (c) Grau 3: presença de tecido ósseo primário; (d) Grau 4: presença de osso maduro. Entretanto muitos poros apresentavam características intermediárias entre dois estágios. Desta forma, com base nas características dos graus de maturação, os seguintes escores foram estabelecidos: (a) Escore 1 a 1,49: predominância de poros grau um; (b) Escore 1,5 a 1,99: característica de grau um e dois, no mesmo poro ou em poros distintos; (c) Escore 2,0 a 2,49: predominância de poros grau dois; (d) Escore 2,5 a 2,99, no mesmo poro ou em poros distintos: característica de grau dois e três; (e) Escore 3,0 a 3,49: predominância de poros grau três; (f) Escore 3,5 a 3,99: característica de grau três e quatro, no mesmo poro ou em poros distintos; (g) Escore 4,0: predominância de poros grau quatro.

#### **4.7. Estudo em microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Foram observadas em MEV pastilhas de  $\beta$ HAp e de  $\beta$ HAp-Nb sem uso, e pastilhas retiradas de animais 45 dias após o implante.

As amostras retiradas dos animais foram fixadas em paraformaldeído 4% por 24 horas. Após a fixação, foram desidratadas e conservadas em álcool 70% até sua utilização.

Para análise ao MEV, todas as amostras, secas ou não, foram metalizadas com ouro em metalizador Shimadzu® IC-50 Ion Coater (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura Carls

Zeiss modelo EVO LS15 (Oberkochen, Alemanha) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Presidente Prudente, São Paulo.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análises físico-químicas

#### 5.1.1. Caracterização química por DRX

A Figura 2 mostra os padrões de difração do compósito  $\beta$ HAp-Nb. As reações químicas que ocorreram no processo de sinterização produziram três novas fases cristalinas sendo identificadas como (X) óxido de cálcio nióbio  $\text{CaNb}_2\text{O}_6$  (Fersmita), ( $\diamond$ ) óxido de fósforo nióbio  $\text{PNb}_9\text{O}_{25}$  e ( $\circ$ )  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ TCP)  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , que correspondem às fichas padrão 39-1392-JCPDS, 81-1304-JCPDS e 09-0169-JCPDS, respectivamente. O precursor ( $\bullet$ )  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  cuja ficha identificada foi 37-1468-JCPDS foi frequente para as temperaturas de sinterização de  $900^\circ\text{C}$  e  $950^\circ\text{C}$ . No entanto, não foram identificados picos de difração correspondente ao precursor hidróxiapatita. Os percentuais de cada fase foram:  $\text{CaNb}_2\text{O}_6$  (33,36%),  $\text{PNb}_9\text{O}_{25}$  (17,21%) e  $\beta$ -TCP (47,43%).

A composição química das pastilhas controle foi 87,61% de HAp e 12,4% de  $\beta$ -TCP.

#### 5.1.2. Microdureza Vickers

O conhecimento da contração linear de um material possibilita estimar a precisão dimensional de componentes para produção em larga escala, via metalurgia do pó. Os valores médios dos resultados dos ensaios de dureza Vickers para uma carga de 3N no compósito estão mostrados na Figura 3.

### 5.2. Caracterização estrutural das pastilhas por MEV

As pastilhas de  $\beta$ HAp e  $\beta$ HAp-Nb, formadas após o processo de sinterização, apresentaram partículas de formato arredondado e com variação dimensional. O tamanho dos poros variou de 100 a 250  $\mu\text{m}$  (Figura 04).

Em  $1080^\circ\text{C}$ , um alto grau de sinterabilidade foi observado e a morfologia das partículas era predominantemente transgranular .

Na Figura 4 observa-se uma região da microestrutura bastante densificada com total ausência de microporos (Figura 4a) . As Figuras 4 (b) e (c) correspondem às micrografias da superfície do compósito lixadas com lixa 1200 nas quais é possível observar os poros gerados pela lactose. Observam-se poros interconectados em toda a estrutura do compósito.

### **5.3. Análise bioquímica da fosfatase alcalina no sangue**

O valor médio do nível de fosfatase alcalina no plasma sanguíneo dos animais do grupo  $\beta$ HAp-Nb foi  $0,00101 \pm 0,0002319$  U/ml e no grupo  $\beta$ HAp foi  $0,000924 \pm 0,00009482$  U/ml aos 45 dias de observação, sendo  $p = 0,4584$ , não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

### **5.4. Avaliação clínica dos animais e avaliação macroscópica das amostras de DTC**

Os ratos foram clinicamente observados durante o período pós-operatório até a recuperação da anestesia e acompanhados diariamente até o dia da eutanásia. Nos primeiros dias pós-cirurgia houve formação de edema que desapareceu após cerca de 72 horas. Após este período, não houve qualquer sinal de resposta inflamatória no sítio cirúrgico.

Após a coleta das amostras de calvária, observou-se que, na maioria dos animais, as pastilhas ficaram bem adaptadas ao defeito. A regeneração óssea pode ser visualizada a partir das margens ósseas, na face das amostras voltada para a dura máter (face dural). Nos períodos de 45 e 90 dias, a regeneração da calvária também pode ser vista, de forma mais evidente, em áreas centrais do defeito. Nestes períodos pode-se notar uma área sanguinolenta na face da pastilha voltada para o periósteo (face periosteal) (Figura 5).

### **5.5. Estudo histológico**

O estudo histológico mostrou que a regeneração óssea ocorreu a partir das margens ósseas seccionadas, em direção ao centro do defeito, formando uma língua

óssea que percorreu a face dural da pastilha. Os poros foram invadidos por tecido ósseo proveniente da língua de regeneração, mas principalmente por tecido conjuntivo proveniente da dura máter e do periósteo.

Uma vez em contato com o arcabouço, o processo de diferenciação no sentido do desenvolvimento de tecido ósseo tornou-se evidente. Houve migração de tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, células osteogênicas e desenvolvimento de tecido ósseo no interior dos poros, em ambos os grupos estudados. Os poros do arcabouço apresentaram interconectividade. Não houve desenvolvimento de fibrose. O reparo evoluiu ao longo dos 90 dias de observação em ambos os grupos.

A Figura 6 apresenta o resultado da análise do grau de maturação do tecido que predominantemente ocuparam o interior dos poros em cada período de tempo observado.

No 15º dia, o escore médio para o grau de maturação do tecido dos poros foi  $1,67 \pm 0,19$  para o grupo  $\beta$ HAp e  $1,41 \pm 0,23$  para o grupo  $\beta$ HAp-Nb, o que equivale a um predomínio de poros com grau de maturação 1 e 2 nas pastilhas controle e grau 1 nas pastilhas do compósito.

A maioria dos poros dos defeitos preenchidos com o compósito apresentou, predominantemente, um tecido conjuntivo frouxo, constituído por células discretamente basofílicas, com formato estrelado, mergulhadas em uma matriz com finas e delicadas fibras colágenas. Em outros poros, próximos ao periósteo ou à dura-máter, o tecido imaturo apresentava-se mais celularizado do que em outras regiões. Cada poro continha, frequentemente, um único vaso, em posição mais ou menos central (Figura 7). Neste período, ocorreram, com menor frequência, próximos às margens ósseas regeneradas poros preenchidos por um tecido conjuntivo mais denso, característico de tecido ósseo primário, e poros parcialmente preenchidos com tecido ósseo lamelar, e até mesmo poros onde houve o desenvolvimento de matriz cartilaginosa (Figura 7b).

Nos poros das pastilhas de  $\beta$ HAp o tecido apresentou basicamente as mesmas características observadas nas amostras do compósito, exceto pela maior frequência de tecido ósseo primário, em relação ao grupo  $\beta$ HAp-Nb (Figura 8). Neste grupo não houve desenvolvimento de matriz cartilaginosa. O tecido conjuntivo ao redor do

capilar apresentou uma matriz mais homogênea e acidófila, sendo circunscrita por um tecido conjuntivo mais frouxo e celularizado. Diversos poros apresentaram muitas hemácias fora do limite dos vasos. Em ambos os grupos, houve desenvolvimento de tecido ósseo maduro a partir da margem óssea regenerada.

No 30º dia, a pastilha do compósito fragmentou-se de tal proporção que não foi possível fazer a análise do grau de maturação do tecido dos poros. Para este grupo, foi feita apenas uma análise descritiva a partir dos poros remanescentes.

Os poros da pastilha controle apresentaram tecido ósseo primário e princípio de formação de tecido ósseo lamelar. A partir deste período tornou-se evidente a presença de osteoclastos localizados entre o tecido e a superfície do arcabouço.

Aos 45 dias, o escore médio do grau de maturação do tecido dos poros foi  $2,88 \pm 0,38$  para o grupo  $\beta$ HAp e  $2,61 \pm 0,2$  para o grupo  $\beta$ HAp-Nb, o que equivale a um predomínio de poros com grau de maturação 2 e 3, caracterizados predominantemente pela presença de matriz óssea (Figura 9).

Aos 90 dias o escore médio do grau de maturação do tecido dos poros foi  $3,11 \pm 0,26$  para o grupo  $\beta$ HAp e  $2,75 \pm 0,26$  para o grupo  $\beta$ HAp-Nb, o que equivale a um predomínio de poros com grau de maturação 3 no grupo controle e graus 2 e 3 no grupo do compósito. As pastilhas apresentaram poros em diversos estágios de ossificação (Figuras 10 e 11), e diversos poros já se apresentaram parcial ou completamente preenchidos por tecido ósseo maduro, osseointegrado ao arcabouço.

Também foram identificados centros de ossificação intramembranosa na dura-máter e no periósteo localizados imediatamente abaixo e acima da pastilha, respectivamente, e que evoluíram formando pequenas peças ósseas, além de centros de ossificação no tecido conjuntivo localizado ao lado da pastilha que não evoluíram a peças ósseas.

#### **5.6. Estudo em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em amostras obtidos 45 dias pós-implante do arcabouço**

As análises em MEV, aos 45 dias mostram, em detalhes, a morfologia do tecido que se desenvolveu nos arcabouços.

Os poros selecionados para as análises eram aqueles que estavam preenchidos. As pastilhas do compósito e aquelas controle apresentaram algumas características em comum, como o desenvolvimento de uma rede vascular, a deposição de matriz óssea amorfa, com ou sem deposição de fibras colágenas e ocorrência de osteoblastos diretamente sobre os biomateriais (Figura 12).

O compósito se diferenciou por apresentar um maior número de células nos poros e hemácias livres. Os osteoblastos localizados em superfícies mais lisas, como a superfície das pastilhas, tinham um formato mais achatado e prolongamentos mais curtos e produziam matriz de modo aposicional. Os osteoblastos localizados nos poros cuja superfície era irregular assumiram um formato ovóide, desenvolveram prolongamentos mais longos que se estendiam para as paredes dos poros, mantendo as células suspensas no espaço do poro (Figura 13). O desenvolvimento do tecido ósseo aconteceu por meio da secreção centrífuga de matriz, por estas células, obstruindo os espaços dos poros.



## 6. Discussão

A metalurgia ainda não conseguiu desenvolver uma estrutura que apresentasse todos os requisitos necessários a um bom arcabouço, de modo que o desenvolvimento de novos biomateriais e as técnicas de produção de arcabouços são essenciais para o sucesso da engenharia de tecido ósseo (Kokubo *et al.*, 2009). Neste estudo o potencial do compósito trifásico baseado em hidroxiapatita –  $\beta$ TCP - pentóxido de nióbio, em atuar como um arcabouço para a regeneração óssea, foi avaliado em modelo de defeito ósseo de tamanho crítico de 8mm. O biomaterial, na forma de pastilha, foi inserido diretamente no defeito (cicatrização ortotópica) (Gomes e Fernandes, 2011) e a regeneração óssea foi avaliada por meio de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura.

Estudos empregando defeitos de tamanho crítico (DTC) são empregados para avaliar se determinado biomaterial é capaz de modular o processo de regeneração óssea (Cestari *et al.*, 2009; Taga *et al.*, 2008) ao mesmo tempo que promove suporte mecânico. Um DTC é definido como “o menor defeito intra-ósseo que não se regenera completamente e espontaneamente durante o ciclo de vida do animal” (Schmitz e Hollinger, 1986), pois o reparo, neste modelo, somente pode ser alcançado com auxílio terapêutico ou de materiais que estimulem a regeneração óssea (Cameron *et al.*, 2013). O tamanho dos DTCs varia de acordo com a espécie, localização e idade do animal. Em calvaria, os defeitos de 5mm (Bosch *et al.*, 1998) e 8mm (Dahlin *et al.*, 1991) são os mais empregados.

Neste estudo, as pastilhas foram encaixadas num DTC sem utilização de qualquer artefato para sua estabilização, como membranas, placas ou grampos, garantindo que a regeneração óssea tenha sido influenciada exclusivamente pelo arcabouço. O encaixe pastilhas foi mantido pelo reposicionamento do perióstio e da pele, garantindo certa estabilidade ao material e diminuindo o grau de mobilidade, não necessitando, desta forma, de retenção adicional (Gomes e Fernandes, 2011). A dura-máter que forra o assoalho do defeito, foi um importante fornecedor de células para o processo regenerativo (Gomes e Fernandes, 2011) e foi a partir desta membrana que se observou a maior migração de tecidos para o interior dos poros do arcabouço. No interior dos poros, a regeneração ocorreu de forma seqüencial e com alguma sobreposição de fases de maturação nos períodos analisados.

Na observação macroscópica das amostras coletadas após a eutanásia dos animais, notou-se o crescimento de osso na superfície do implante voltada para a duramáter. Os defeitos apresentaram graus variados de regeneração entre os diferentes períodos de tempo e dentro de cada período de tempo avaliado. O crescimento a partir das margens aconteceu em todos os animais, mas o crescimento de osso na região central do defeito variou, provavelmente dependendo da influência do material que estimulou a regeneração óssea (Cameron *et al.*, 2013).

O arcabouço, foi desenvolvido na forma de pastilha, com 8mm de diâmetro e 0,8mm de espessura, com base nas dimensões da calota que foi removida durante a criação do defeito. Para a obtenção das pastilhas a mistura (1:1) dos pós precursores foi prensada e submetida à sinterização em diferentes temperaturas, com a finalidade de se obter a temperatura que resultasse nas melhores propriedades mecânicas. A partir de 900°C obteve-se a maior variação dimensional do compósito, que retraiu com a temperatura, até atingir um valor máximo em 1080°C. Após essa temperatura o material voltou a se expandir e as propriedades mecânicas pioraram. Em 1080°C a dureza do material apresentou seu grau máximo (Bonadio, 2014).

A adição de Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, gerou uma melhoria na microdureza do material. que parece estar relacionado com a proporção de Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> adicionado à mistura. Foi necessário ajustar a proporção dos pós, a fim de se obter a melhor associação das propriedades mecânicas do nióbio com as propriedades biológicas da hidroxiapatita, sendo a proporção de 1:1 aquela que resultou nas melhores propriedades mecânicas (Bonadio, 2014). Demirkol *et al.*, (2013) mostrou que a adição de 5 e 10% Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> à HAp gerou uma melhoria na resistência do material, e que o mesmo material, sinterizado em diferentes temperaturas, apresentou a resistência potencializada nas temperaturas mais elevadas, sendo que a 1300°C obteve as melhores propriedades mecânicas. Neste estudo, o material apresentou um comportamento semelhante ao das ligas eutéticas, ou seja, utilizando uma maior proporção do metal (50%), o ponto de fusão dos pós diminuiu, obtendo-se a maior resistência do material em uma temperatura menor (1080°C), do que aquela empregada por Demirkol *et al.* (2013).

Quando as pastilhas do compósito foram construídas na forma de *bulk* (com poros na ordem de nm), apresentaram microdureza 0,6 vezes superior à βHAp (Kiyochi Júnior, 2013). No arcabouço do compósito, sinterizado a 1080°C, o valor máximo de microdureza foi quase três vezes maior do que aquela de βHAp. Quando

comparados os valores de microdureza do compósito na forma de *bulk* sinterizado a 1000°C (Kiyochi Júnior, 2013) com o compósito na forma de arcabouço que foi sinterizado a 1080°C, o valor de microdureza obtido neste segundo é quase seis vezes maior, mostrando que a temperatura de sinterização parece ser mais decisiva no aumento da microdureza.

Após o processo de sinterização a composição das pastilhas, tanto na forma de arcabouço, como de *bulk*, se modificou. A pastilha controle passou a ser constituída de 87,61% de HAp e 12,4% de  $\beta$ -tricálcio fósforo ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), o  $\beta$ TCP. No grupo do compósito, três novas fases foram identificadas: óxido de cálcio nióbio  $\text{CaNb}_2\text{O}_6$  (fersmita), óxido de fósforo nióbio  $\text{PNb}_9\text{O}_{25}$  e  $\beta$ TCP, nas proporções de 33,36%, 17,21% e 47,43% respectivamente.

A maior proporção de  $\beta$ TCP quando associado à hidroxiapatita está diretamente associado a uma maior formação óssea (Fariña *et al.*, 2008) em função de ter uma taxa de reabsorção mais rápida, além de liberar grandes quantidades de íons cálcio e sulfato (Liu e Lun, 2012). Entretanto, suas propriedades mecânicas são pobres, e seu potencial osteogênico e osteoindutor é baixo (Bansal *et al.*, 2009 ; Linovitz e Peppers, 2002 ) o que o torna incapaz de resistir contra fadiga, tornando os arcabouços passíveis de colapso ou de fratura interna (Orii *et al.*, 2005). A hidróxiapatita pura, por sua vez, é reabsorvida muito lentamente, mas da mesma forma que o  $\beta$ TCP apresenta pobres propriedades mecânicas. Ambos,  $\beta$ TCP e HAp são osteocondutores, mas diferem em suas bioatividades (Wongwitwichot *et al.*, 2010). Por sua vez, o compósito bifásico  $\beta$ TCP/HA, também chamado fosfato de cálcio bifásico (*bifasic calcium phosphate* - BCP) podem aumentar a força mecânica dos materiais cerâmicos e melhorar a degradação de  $\beta$ TCP, o que assegura a estabilidade do arcabouço até que o novo osso esteja formado (Garrido *et al.*, 2011).

A adição do  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  à  $\beta$ HAp gerou, no arcabouço, um material com melhores propriedades biomecânicas. Estudos anteriores (Matsuno *et al.*, 2001) demonstraram que após 14 e 28 dias de implantação de um implante de nióbio na forma de pastilha no fêmur de ratos nenhum sinal de dissolução do material foi detectada, característico de um material com boa biocompatibilidade. Neste estudo, após 90 dias de observação, o material não sofreu reabsorção que pudesse ser detectada microscopicamente.

A quantidade de poros e sua distribuição podem influenciar a resistência e módulo de elasticidade do arcabouço (Gomide, 2005) e seu tamanho e geometria são

fundamentais para o sucesso da osteogênese (Kuboki *et al.*, 2001). Não há um consenso a respeito do tamanho ideal de poros. Este parâmetro parece variar de acordo com a condição experimental e o biomaterial empregado (Zaner e Yukna, 1984; Fleckenstein *et al.*, 1996; Tsuruga *et al.*, 1997; Kuboki *et al.*, 1998; Kuboki *et al.*, 2001., Teixeira, 2009).

Os poros do arcabouço, neste estudo, variaram de 100 a 250 $\mu$ m e apresentaram interconectividade que permitiu a migração e o crescimento de capilares no seu interior e a migração de células mesenquimais que alcançaram as áreas mais centrais do compósito. As partículas de lactose empregadas para a geração dos poros tinham morfologia predominantemente esférica e foram peneiradas para que fossem selecionadas aquelas com diâmetro entre 150 e 250 $\mu$ m (Bonadio, 2014). Os canais interconectando os poros apresentavam geometria predominantemente côncava. Esse tipo de geometria das interconexões dos poros promove, mais do que a superfície convexa ou achatada, um ambiente físico adequado para gerar alta densidade celular (Tsuruga *et al.*, 1997)

Os poros devem ser maiores do que o diâmetro dos capilares ativos, que por sua vez devem fornecer suprimento sanguíneo suficiente para a formação óssea (Tsuruga *et al.*, 1997). Poros maiores parecem favorecer a angiogênese (Klenke *et al.*, 2008), sendo a variação de 100 $\mu$ m a 300 $\mu$ m o tamanho mais favorável para o desenvolvimento de um sistema de capilares, essencial para a neoformação óssea (Zaner e Yukna, 1984; Fleckenstein *et al.*, 1996; Teixeira, 2009). A geometria do poro e a quantidade de interconexões devem ser levados em consideração pois está relacionado a uma diminuição na resistência e um aumento de flexibilidade e ductibilidade (Chang *et al.*, 2000).

Estudos avaliando a osteogênese ectópica induzida por proteína morfogenética óssea (BMP - *bone morphogenetic protein*) em arcabouços de hidroxiapatita, mostraram que a estrutura de poros de 300 a 400 $\mu$ m de diâmetro são as mais favoráveis para a formação de ósteons. O desenvolvimento de um único capilar por poro parece ser uma condição necessária para a formação de uma estrutura semelhante ao ósteon [sistemas cilíndricos - Haversianos - com um canal central que consiste de um vaso sanguíneo circundado por anéis concêntricos de matriz óssea (Fernandez-Yague *et al.*, 2014)] visto que em poros de 500 a 600 $\mu$ m podem se desenvolver múltiplos e amplos capilares, o que não favorece a formação óssea Haversiana (Tsuruga *et al.*, 1997).

Neste estudo a produção de matriz óssea, no compósito, ocorreu exclusivamente em direção centrípeta, ou seja, a partir da superfície dos poros, que foram, paulatinamente, sendo obstruídos por tecido ósseo depositado em camadas. No grupo  $\beta$ HAp além do osso neoformado forrar a parede dos poros, houve formação Haversiana de osso, com deposição de matriz ao redor do vaso central. Uma vez que os poros dos dois arcabouços tinham dimensões semelhantes, podemos supor que a diferença no processo de formação óssea possa ter sido influenciada também pela composição do arcabouço.

No compósito foi detectada a formação de cartilagem hialina. A condrogênese durante a cicatrização é favorecida pela hipóxia (Fernandes-Yague *et al.*, 2014). Estudos empregando arcabouços carreadores de BMP, demonstraram o desenvolvimento ósseo, neste modelo, ocorreu por meio de ossificação endocondral, ou diretamente por ossificação intramembranosa. O fator determinante do processo foi relacionado às propriedades geométricas do material carreador, que permitiu ou não a penetração de vasos em seu interior. Em estruturas cuja geometria permitiu a rápida vascularização, os biomateriais induziram formação óssea direta, por meio da diferenciação de células imaturas em osteoblastos, sem formação cartilaginosa (Kuboki *et al.*, 2001). Neste estudo, apesar de constatada a vascularização dos poros, não foi possível estimar se a oxigenação foi suficiente. Um ambiente com baixa tensão de oxigênio poderia favorecer a ossificação endocondral.

Para o bom desempenho de um arcabouço, é necessário que além propriedades mecânicas e porosidade adequadas, o material apresente potencial para estimular o desenvolvimento de osso em seus poros (Kuboki *et al.*, 1998; Kuboki *et al.*, 2001) e para isso, sua superfície deve permitir a adesão celular, diferenciação, proliferação e ser livre de toxicidade (Jones, 2009; Descamps *et al.*, 2009).

O compósito na forma de arcabouço definitivamente induziu a formação óssea, como ficou evidente pela observação microscópica. O tecido conjuntivo frouxo que preencheu os poros do compósito levava consigo capilares sanguíneos e células mesenquimais indiferenciadas, de forma semelhante àquela observada na pastilha de  $\beta$ HAp. O emprego de colorações histológicas diferentes favoreceu a observação das mudanças ocorridas no tecido, e permitiu, sua classificação em graus de maturação, nos diferentes períodos de tempo. Desta forma, por meio do estabelecimento de escores, foi avaliado o grau de maturação dos tecidos que ocuparam os poros do

arcabouço, durante a regeneração. A principal característica morfológica, que permitiu estabelecer os critérios para definir os graus de maturação, foi a evolução temporal da matriz extracelular. À medida em que o processo avançou, a matriz inicial, de tecido conjuntivo frouxo, foi sendo substituída por matriz de osso primário e subsequentemente de osso lamelar. A diferenciação celular também foi evidente. As células mesenquimais, de aspecto estrelado, com finos prolongamentos se diferenciaram em osteoblastos secretando matriz, em direção centrípeta ou centrífuga em relação à parede do poro. Naqueles poros mais maduros os osteoblastos encontravam-se alinhados, formando uma camada contínua na superfície do osso neoformado.

Embora no arcabouço de  $\beta$ HAp o amadurecimento tenha sido mais rápido, visto que os escores estabelecidos foram maiores do que aqueles das pastilhas do compósito, em todos os tempos avaliados, ainda assim, o compósito demonstrou, do ponto de vista morfológico, excelente potencial osteoindutor. O potencial osteoindutor do compósito  $\beta$ HAp-Nb na forma de *bulk*, já havia sido constatados na regeneração de DTCs. Candido, 2014 detectou grupos celulares imunopositivos para osteocalcina, às margens do defeito, fora da área de regeneração, sugerindo que o compósito foi capaz de induzir o processo de diferenciação de células mesenquimais.

Apesar das limitações associadas com preparação dos materiais para MEV, que exige a secagem do espécimen induzindo modificações na morfologia e estrutura espacial dos tecidos (Tran Van *et al.*, 1982), esta técnica forneceu detalhes estruturais importantes da interface biomaterial-osso, nos poros, como a integração estrutural entre o material do arcabouço e a matriz óssea neo-formada.

A MEV também revelou variações da morfologia dos osteoblastos, ora planos ora elípticos e na forma de deposição de extracelular. Tais variações podem estar relacionadas com as características topográficas do arcabouço, ou ao estímulo químico local (Fernandez-Yague *et al.*, 2014).

Com este trabalho foi demonstrado que o compósito baseado em  $\beta$ HAp-Nb na forma de pastilha, em DTC, apresentou características que o aproximam de um arcabouço ideal: foi capaz de suportar a área defeituosa, permitiu a penetração de células e vasos sanguíneos e apresentou potencial osteoindutor.

## **7. Conclusão**

Concluimos que o compósito com poros entre 100 e 250um atuou como um arcabouço, favoreceu a osteogênese e a osseointegração em defeitos de tamanho crítico.

## 8. Referências bibliográficas

- AOKI, H. Science and medical applications of hydroxyapatite. *Japanese Association of Apatite Science*, 1991.
- BAB, I.A., SELA, J.J. Cellular and molecular aspects of bone repair. In: Principles of Bone Regeneration, capítulo 2, p. 11-41, 2012.
- BANSAL, S., CHAUHAN, V., SHARMA, S. Evaluation of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate mixed with bone marrow aspirate as a bone graft substitute for posteriolateral spinal fusion. *Indian J. Orthop.*, 43, 234-239, 2009.
- BHUMIRATANA, S., GRAYSON, W.L., CASTANEDA, A., ROCKWOOD, D.D., GIL, E. S., KAPLAN, D.L., VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Nucleation and Growth of mineralized bone matrix on silk-hydroxyapatite composite scaffolds. *Biomaterials*, v.32, p. 2812-2820, 2011.
- BONADIO, T.G.M. Biocompósitos de pentóxido de nióbio, hidróxiapatita, B- fosfato tricálcico: produção, caracterização e estudos *in vivo* como suportes ósseos denso e poroso. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, 2014.
- BOULER, J.M., DACULSI, G. In-vitro carbonated apatite precipitation on biphasic calcium phosphate pellets presenting various HA/-TCP ratios. *Key engineering Materials*, p. 192-195, 119-122, 2001.
- BOSCH, C., MELSEN, B., VARGERVIK, K. Importance of the critical size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J.Craniofacial Surgery* . 9, 310-316, 1998.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC n. 305, de 14 de novembro de 2012.
- BRASIL, Departamento Nacional de Produção Mineral, 2008.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Banco de dados do Sistema Único de Saúde, DATASUS, 2003.
- CACCHIOLI, A., SPAGGIARI, B., RAVANETTI, F., MARTINI, F. M., BORGHETTI, P., GABBI, C. The critical size bone defect: morphological study of bone healing. *Ann. Faculdade Medicina. Veterinária. Di Parma*, v.26, p. 97-100, 2006.
- CAMERON, J.A., MILNER, D.J., LEE, J.S., CHENG, J., FANG, N.X., JASIUK, I.M. Employing the biology of successful fracture repair to heal critical size bone defects. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, n.367, p. 113-32, 2013.
- CANALIS, E., MCCARTHY, T.L., CENTRELLA, M. Growth factors and the skeletal system. *Journal of Endocrinology Investigation*, 12, p.577-584, 1989.



- CANDIDO, A.G. Compósito baseado em HA-βTCP- Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> estimula a osteoindução durante o reparo de defeitos de tamanho critic em calvária de ratos. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá, PR, 2014.
- CESTARI, T.M., GRANJERO, J.M., DE ASSIS, G.F., GARLET, G.P., TAGA, R. Bone repair and augmentation using block of sintered bovine-derived anorganic bone graft in cranial bone deffect model. *Clinic. Oral Implants Research*20, 340-350, 2009.
- CHIM, S.K., TICKNER, J., CHOW, S.T., KUEK, V., GUO, B., ZHANG, G., ROSEN, V., ERBER, W. Angiogenic factors in bone local environment. *Cytokine and Growth Factors Reviews*, v. 24, n.3, p. 297-310, 2013.
- COELHO, T.M., NOGUEIRA, E.S., STEIMACHER, A., MEDINA, A.N., WEINAND, W.R., LIMA, W.M., BAESSO, M.L., BENTOA.C. Characterization of natural nanostructured hydroxyapatite obtained from the bones of Brazilian river fish . *Journal of Applied Physics*, v.101, p.084701, 2006.
- CONZ, M.B., GRANJEIRO,J.M., SOARES, G.A. Hydroxyapatite crystallinity does not effect the repair of critical size bone defects. *Journal of Applied Oral Science: revista FOB*, v19, n.4, p337-342, 2011.
- COOPER, G.M., MOONEY, M.P., GOSAIN, A.K., CAMPBELL, P.G., LOSEE, J.E., HUARD, J. Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of critical size defect (CSD). *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 125, n.6, p. 1685-1692, 2010.
- DAHLIN, C., ALBERIUS, P., LINDE, A. Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. *J.Neurosurg.* 74, 487-491, 1991.
- DEMIRKOL, N., OKTAR, F.N., KAYALI, E.S. Influence of niobium oxide on the mechanical properties of hydroxyapatite. *Key engineering Materials*, v. 529-30, p. 29-33, 2013.
- DESCAMPS, M., HORNEZ, J.C., LERICHE, A. Manufacture of hydroxyapatite beads for medical applications. *Journal of the European Ceramic Society*, v. 29, p. 369-75, 2009.
- DOROZHKIN, S.V. Calcium orthophosphate-based biocomposites and hybrid biomaterials. *Journal of Materials Science*, v.44, n.9, p. 2343-2387, 2009.
- DYCE, P.W., WEN, L. LI,J. In vitro germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. *Nat. Cell. Bio.* v.8, p 384-390, 2006.

- FARIÑA, N.M., GUZÓN, F.M., PEÑA, M.L. In vivo behavior of two different biphasic ceramic implanted in mandibular bone of dogs. *J Mater Sci Mater Med*, 19, 1565-1573, 2008.
- FERANDEZ-YAGUE, M.A., ABBAH, S.A., McNAMARA, L., ZEUGOLIS, D.I., PANDIT, A., BIGGS, M.J. Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integration biological and biomechanical strategies. *Adv Drug Deliv Rev*, 84, 1-29, 2014.
- FLECKENSTEIN, K.B., CUENUM, M.F., PEACOCK, M.E., BILLMAN, M.A., SWIEC, G.D., BUXTON, T.B. Effect of hydroxyapatite tricalcium phosphate alloplast on osseous repair in the rat calvarium. *Journal of Periodontology*, v.7, n.1p. 39-45, 2006.
- FROST, H.M.J. Why should many skeletal scientists and clinicians learn the Utah paradigm of skeletal physiology. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, v.2, n.2,p. 121-130, 2011.
- GARRIDO, C.A., LOBO, S.E., TURÍBIO, F.M. Biphasic calcium phosphate bioceramics for orthopaedic reconstructions: clinical outcomes. *Int. J Biomater*, 2011, 129727, 2011.
- GOMES, P.S., FERNANDES, M.H. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Laboratory Animals*, v.45, p. 14-24, 2011.
- GOMIDE, V.S Caracterização mecânica dos compósitos hidroxiapatita-zirconia, hidroxiapatita-alumina e hidroxiapatita-titânio para fins biomedicos. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2005.
- HAUSCHKA, P.V., CHEN, T.L., MAVRAKOS, A.E. Polypeptide growth factors in bone matrix. *Ciba Foundation Symposium*, 136, p. 207-225, 1988.
- HENG, B.C., CAO, T., LEE, E.H. Directing stem cells differentiation into the chondrogenic lineage in vitro. *Stem Cells*. v.22, p.1152-1167, 2004.
- HERNÁNDEZ-GIL, F.T., ALOBERA-GARCIA, M.A., PINGARRÓN, M., BLANCO-JEREZ, L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Medicina Oral Patologia Oral Cirurgia Bucal*, 11º edição, p. 4751, 2006.
- ISAMA, K., TSUCHIYA, T. Enhancing effect of poly (L-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Biomaterials*, v.24, n.19, p.3303-3309, 2003.
- JILKA, R. L. Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *Medical and Pediatric Oncology*, v. 41, n.3, p. 182-185, 2013.

- JONES, J.R. New trends in bioactive scaffolds: The importance of nanostructure. *Journal of the European Ceramic Society*, v. 29, p. 1275-81, 2009.
- JUDAS, F., PALMA, P., FALACHO, R.I., FIGUEIREDO, H. Estrutura da dinâmica do tecido ósseo. Texto de apoio para alunos do mestrado integrado em medicina. Disciplina de Ortopedia, 2012.
- JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, R.O.C. Histologia Básica. Guanabara Koogan, 12<sup>o</sup> Edição, 2013.
- KANCZLER, J.M., OREFFO, R.O.C. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *European Cells and Materials*, v.15, p.10-114, 2008.
- KAWACHI, E.Y., BERTRAN, C.A., REIS, R.R., ALVES, O.L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma area interdisciplinary. *Química Nova*, 23:4. P. 518-522, 2000
- KIYOSHI JÚNIOR, H.J. Estudo ex-vivo da ceramic bifásica composta de hidróxiapatita-beta fosfato tricálcio (HA- $\beta$ -TCP) e pentóxido de nióbio (Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) como biomaterial empregado para o reparo ósseo em defeitos de calvária. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, 2013.
- KLENKE, F.M., LIU, Y., YUAN, H., HUNZIKER, E.B., SIEBENROCK, K.A., HOFSTETTER, W. Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes *in vivo*. *J.Biomed Mater res A*, v. 85, n.3, p.87-108, 2008.
- KUBOKI, Y., TAKITA, H., KOBAYASHI, D., TSUROGA, E., INOUE, M., MURATA, M., NAGAI, N., DOHI, Y., OHGUSHI, H. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. *J Biomed Mater Res*, 39, 190-199, 1998.
- KUBOKI, Y., JIN, Q., TAKITA, H. Geometry of carriers controlling phenotypic expression. In BMP-Induced osteogenesis and chondrogenesis, *J Bone Joint Surg Am*, Suppl1, p.S105-S115, 2001.
- KOKUBO, T., MATSUSHITA, T., TAKADAMA, H., KIZUKI, T. Development of bioactive materials based on surface chemistry. *Journal of the European Ceramic Society*, v. 29, p. 1267-74, 2009.
- LANSDOWNE, J.L. Preclinical model of bone defects. *OTA 2010 Basic Science Focus Forum*.
- LEGEROS, R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 395: 81-98, 2002.

- LEITE, G.S., SANDIM, H.R.Z., CINTHO, O.M. Sinterização do nióbio: Efeito da Granulometria dos pós. *Tecnologia Metal Materais Mineração*. São Paulo, v.8, n.2, p.132-137, 2011.
- LINOVITZ, R.J., PEPPERS, T.A. Use of an advanced formulation of beta-tricalcium phosphate as a boné extender in interbody lumbar fusion. *Orthopedics*, 25, S585-S589, 2002.
- LIU, B., LUN, D.X. Current applications of  $\beta$ -tricalcium phosphate composites in orthopaedics. *Orthopaedic Surgery*, v.4, p. 139-144, 2012.
- LYNCH, S.E., GENKO, R., MARX,R. Grafting materials in repair and restauations tissue engineering applications in maxillofacial surgery and periodontics. *Quintessence*, 5: 93-112, 1999.
- MATSUNO, H., YOKOYAMA, A., WATARI, F., UO, M., KAWASAKI, T. Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium. *Biomaterials*, v. 22, p. 1253-1262, 2001.
- MORESCHI, E., HERNANDES, L., DANTAS, J.A., SILVA, M.A.R.C.P., CASAROTO, A.R., BERSANI-AMADO, C.A. Effect of dolomite on the repair of bone defects in rats: histological study. *Histology and histopathology*, v.25, p. 1547-56, 2010.
- MURUGAN, R., RAMAKRISHNA, S. Development of nanocomposites for bone grafting. *Composite Science and Technolgy*, 65: 2385-2406, 2005.
- NASCIMENTO, W.J., BONADIO, T.G.M., FREITAS V.F., WEINAND, W. R., BAESSO, M.L., LIMA, W.M. Nanostructured Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>- natural hydroxyapatite formed by the mechanical alloying method: a bulk composite. *Materials Chemistry and Physics*, v.130, p. 84-89, 2011
- NASCIMENTO, WJ. Preparação e caracterização físico-mecânica, microestrutural e térmica de compósitos à base de nióbio e hidroxiapatita. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, 2009.
- NOVAES JÚNIOR, et al. Recursos e soluções em implantes. In *Periodontia/Cirurgia/Cirurgia para implantes*. Artes médicas, 447-66, 2000.
- ONO, I., TATESHITA, T., NAKAJIMA, T. Evaluation of a high density polyethylene fixing system for hydroxyapatite ceramic implants. *Biomaterials*, v.21, p. 143-151, 2000.
- ORÉFICE, R.L., PEREIRA, M.M., MANSUR, H.S. Biomateriais fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.

- ORII, H., SOTOME, S., CHEN, J. Beta-tricalcium phosphate graft combined with bone marrow stromal cells for posterolateral spine fusion. *J. Med. Dent. Sci.*, 52, 51-57, 2005.
- PRETTO, J.L.B., PAGNONCELLI, R.M. Avaliação por meio de MEV da Região Perrimplantar após irradiação com laser diodo, infravermelho, em implantes de titânio situados em tibia de rato. *Revista de Odontologia da ATO*, v. 5, n.1, p.130-180, 2005.
- QAISAR, S.A., BILTON, M., WALLACE, R., BRYDSON, R., BROWN, A.P., WARD, M., MILNE, S.J. Sol-gel synthesis and TEM-EDX characterization of hydroxyapatite nanoscale powders modified by Mg, Sr or Ti. *Journal of Physics: Conference Series* 241, p. 1-4, 2010
- ROBEY, P.G., YOUNG, M.F., FISHER, L.W., MCCLAIN, T.D. Thrombospondin is an osteoblast derived component of mineralized extracellular matrix. *The Journal of Cell Biology*, v108, n2, p.719-727, 1989.
- SCMITZ, J., HOLLINGER, J.O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical orthopaedics and related research*, 205: 299-08, 1986.
- SERVICE, F.R. Tissue engineers build new bone. *Science*, v.289, p. 1498-1500, 2000.
- SILVA, c.s. Nióbio. *Balanço Mineral Brasileiro*, 2001.
- SILVA, L.G.O. Nióbio: Mercado Nacional e Internacional. (Dissertação de Mestrado). Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 1994.
- SOMMERFELDT, D.W., RUBIN, C. T. Biology of bone and how it orchestrates the formand function of the skeleton. *Europe spine journal: official publication of the European spine society, the European spinal deformity society, and the European section of the cervical research society*, v. 10, p.86-95, 2001.
- SOMERMAN, M.J., ARCHER, S.Y., IMM, G.R., FOSTER, R. A. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *Journal of Dental Research*. v.67, n.1, p.66-70, 1988
- SZPALSKI, C., BARR, J., WETTERAU, M., SAADEH.P.B., WARREN, S.M. Cranial bone defects: Current and futures Strategies. *Neurosurgical Focus*, v.29, n.6, p.1-11, 2010.
- TAGA, R. Reparo de defeito ósseo perene em crânio de cobaia pela aplicação de osseobond. *Rev. Bras. Implan.*, v.3, n.1, p.13-20, 1997.

- TAMAI, M., NAKAOKA, K.I.R., TSUCHIYIA, T. Synthesis of a novel  $\beta$ -tricalcium phosphate/hydroxyapatite biphasic calcium phosphate containing niobium ions and evaluation of its osteogenic properties. *J. Artif. Organs*, n.10, p.22-28, 2007.
- TEIXEIRA, L.J.C. Potencial osteocondutor de grânulos de hidroxiapatita em defeitos críticos de calvária de ratos. (Tese de Doutorado). Duque de Caxias: Universidade do Grande Rio. 2009.
- TITORENCU, I., PRUNA, V., JINGA, V.V., SIMIONESCU, M. Osteoblast Ontogeny and implications for bone pathology: an overview. *Cell Tissue Research*, v.355, n.1, p. 23-33, 2014.
- TSUROGA, E., TAKITA, H., ITOH, H., WAKISAKA, Y., KUBOKI, Y. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J. Biochem*, 121, 317-324, 1997.
- TRAN VAN, P., VIGNERY, A., BARON, R. An electron-microscopy study of the bone-remodeling sequence in the rat. *Cell Rissue Res*, 225, 283-91, 1982.
- URIST, M.R. Bone formation by autoinduction. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 395: 4-10, 2002.
- WILLIAMS, D.F. Definitions in biomaterials. Amsterdam: Elsevier, 1987.
- WONGWITWICHOT, P., KAEWSRICHAN, J., CHUA, K.H. Comparision of TCP, and TCP/HA hybrids scaffolds for osteoconductive activity. *Open Biomed Eng J*, 4, 279-285, 2010.
- YAMAMOTO, A., HONMA, R., SUMITA, M., HANAWA, T. Cytotoxicity evaluation of ceramic particles of different sizes and shapes. *Journal Biomedical Materials Research*. V.1, p. 68, n.2, 244-56, 2004.
- YUBAO, L., XINGDONG, Z., DE GROOT, K. Hydrolysis and phase transition of alpha-tricalcium phosphate cement. *Biomaterials*, v.18, p.737-741, 1997.
- ZAMBUZZI, W.F., PAIVA, K.B.S., MENEZES, R., OLIVEIRA, R.C., TAGA, R., GRANJEIRO, J.M. MMP-9 and CD68 Cells are required for tissue remodeling in response to natural hydroxyapatite. *Journal of Molecular Histology*, v.40, n.4, p 301-309, 2009.
- ZANER, D.J., YUKNA, R.A. Particle size of periodontal bone grafting materials. *J. Periodont*, v. 55, p. 406-409, 1984.
- ZHANG, Y., VENUGOPAL, J.R., EL-TURKI, A., RAMAKRISHNA, S., SU, B., LIM, C.T. Electrospun biomimetic nanocomposite nanofibers of hydroxyapatite/chitosan for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 29, 431-22, 2008.

ZHANG, Y., REDDY, V.J., WONG, S.Y., LI, X., SU, B., RAMAKRISHNA, S. Enhanced biomineralization in osteoblasts on a novel electrospun biocomposite nano-fibrous substrate of hydroxyapatite/collagen/chitosan. *Tissue Eng.* 16, p. 1949-1960, 2010.

## ***PROTOCOLO PARA INCLUSÃO EM PARAFINA***

### DESIDRATAÇÃO

ÁLCOOL 80% -----	1 HORA
ÁLCOOL 90% -----	1 HORA
ÁLCOOL 100% I -----	1 ½ HORA
ÁLCOOL 100% II -----	1 HORA
ÁLCOOL 100% III -----	1 HORA
XILOL -----	2 ½ HORAS
PARAFINA I -----	1 HORA
PARAFINA II -----	DIA SEGUINTE



## ***PROTOCOLO COLORAÇÃO HEMATOXILINA E EOSINA***

ESTUFA -----	15'
XILOL I -----	10'
XILOL II -----	15'
ÁLCOOL 100% I -----	1'
ÁLCOOL 100% II -----	1'
ÁLCOOL 90% -----	1'
ÁLCOOL 80% -----	1'
SUPERCOLA -----	1'

ESTUFA 30''

ÁLCOOL 70% -----	1'
H2O DESTILADA -----	1'
HEMATOXILINA -----	40''

LAVAR

REPOUSAR 5 A 10'

EOSINA -----	10''
--------------	------

LAVAR

ÁLCOOL 80% -----	PASSAR
ÁLCOOL 90% -----	PASSAR
ÁLCOOL 100% I -----	5'
ÁLCOOL 100% II -----	5'

CAPELA

XILOL ALCOOL -----	PASSAR
--------------------	--------

XILOL I ----- 5'

XILOL II ----- 5'

MONTAR

## ***PROTOCOLO PADRÃO IMUNO HISTO-QUÍMICA***

### **DESPARAFINIZAR E HIDRATAR**

ESTUFA-----15'

XILOL 1----- 15'

XILOL 2-----15'

ESTUFA 36 °C POR 24 HORAS

ÁLCOOL 100% 1----- 5'

ÁLCOOL 100% 2-----5'

ÁLCOOL 90%-----5'

ÁLCOOL 80%----- 5'

ÁLCOOL 70%-----5'

ÁGUA DESTILADA-----5'

ESTUFA 36 °C POR 72 HORAS

BLOQUEIO PEROXIDASE ENDÓGENA-----10'

\*LAVAR EM ÁGUA DESTILADA

\*LAVAR EM TRIS – DUAS LAVAGENS DE 7'

\*DEMARCAR OS CORTES COM CANETA HIDROFÓBICA

\*BLOQUEIO COM BSA (10 MINUTOS) – HISTOSTAIN – 2 GOTAS DE SOLUÇÃO  
BLOQUEADORA REATIVO A EM CADA CORTE

\*ENCUBAR EM ANTICORPO PRIMÁRIO (OVERNIGHT)

\*LAVAR EM TRIS DUAS LAVAGENS DE 7'

\*INCUBAR EM AC SECUNDÁRIO – HISTOSTAIN – 2 GOTAS DE REATIVO B EM  
CADA CORTE POR 10'

\*LAVAR EM TRIS DUAS LAVAGENS DE 7'

\*INCUBAR EM AB – HISTOSTAIN – ADICIONAR 2 GOTAS DE REATIVO C EM  
CADA CORTE E INCUBAR POR 10’

\*LAVAR EM TRIS, DUAS LAVAGENS DE 7’

\*REVELAR COM DAB (LUZ APAGADA)

\*CONTRACOLORAÇÃO COM HEMATOXILINA DE MAYER? (NÃO  
NECESSARIAMENTE)

ÁLCOOL 95%----- 1’

ÁLCOOL 100%-----5’

XILOL ÁLCOOL-----PASSAR

XILOL 1----- 5’

MONTAR

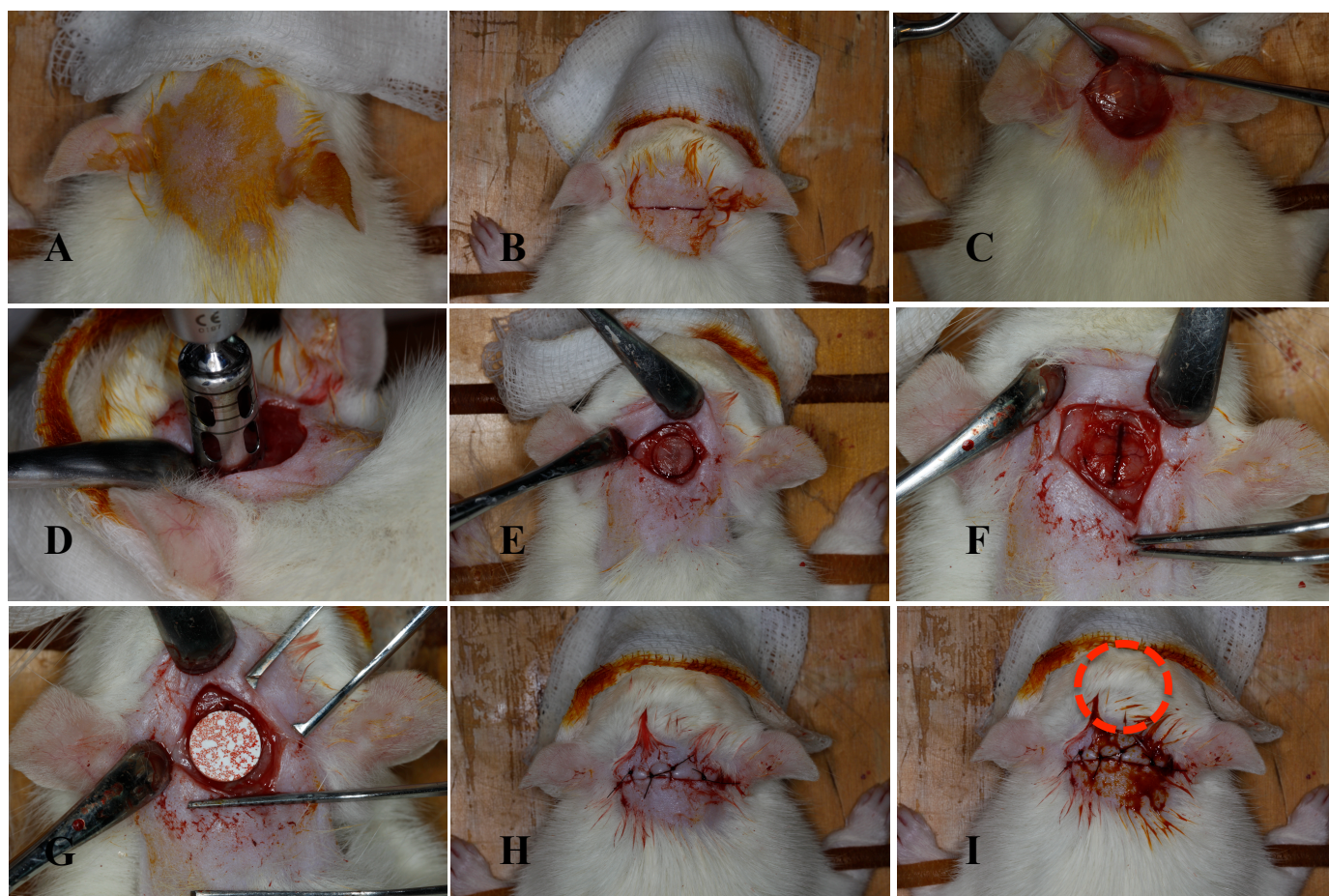


Figura 1. Procedimento cirúrgico para confecção de defeito de tamanho crítico (8mm) e implante de biomaterial na calvária de ratos (a, b, c, d, e, f, g, h, i). (a) Anti-sepsia da área cirúrgica, com iodo tópico; (b) Incisão transversal da pele até o periósteo; (c) Deslocamento do conjunto pele-periosteio para visualização do osso da calvária; (d) Confecção do defeito com broca trefina; (e) Visualização da margem do defeito após trefinação; (f) Exposição do encéfalo após a remoção de parte da calota craniana; (g) Posicionamento da pastilha no defeito ósseo. Observar a permeação do sangue nos poros mais superficiais da pastilha; (h) Reposição e sutura dos tecidos com fio de *nylon*. (i) Aplicação de iodo tópico na região, após sutura, o pontilhado ilustra o posicionamento mais cefálico da pastilha em relação à incisão.

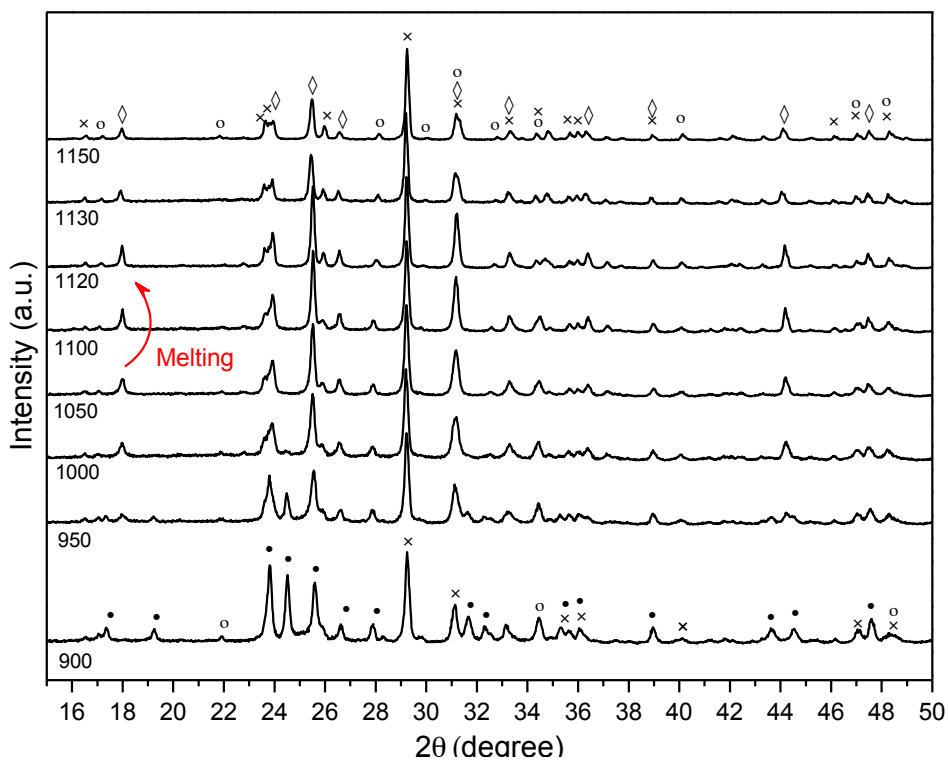


Figura 2. Padrões de difração de raios X para o compósito  $\beta$ HAp-Nb (1:1 vol%) sinterizado por duas horas em diferentes temperaturas: (•)  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ , (X)  $\text{CaNb}_2\text{O}_6$ , (◊)  $\text{PNb}_9\text{O}_{25}$  e (○)  $\beta$ -TCP (Bonadio, 2014).

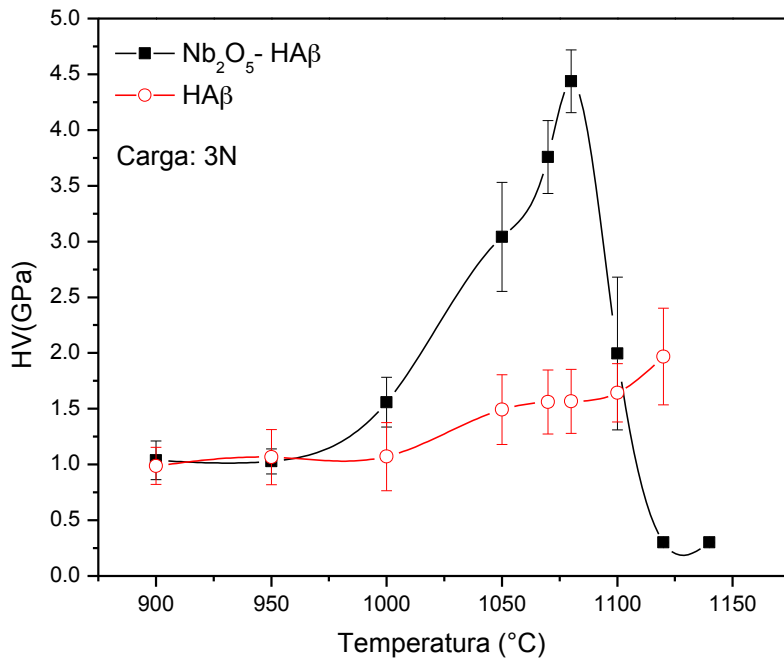


Figura 3. Microdureza Vickers da  $\beta$ HAp e do composto  $\beta$ HAp-Nb sinterizado em diferentes temperaturas. O valor máximo de dureza Vickers é observado para a temperatura de sinterização de 1080 °C. (Bonadio, 2014).

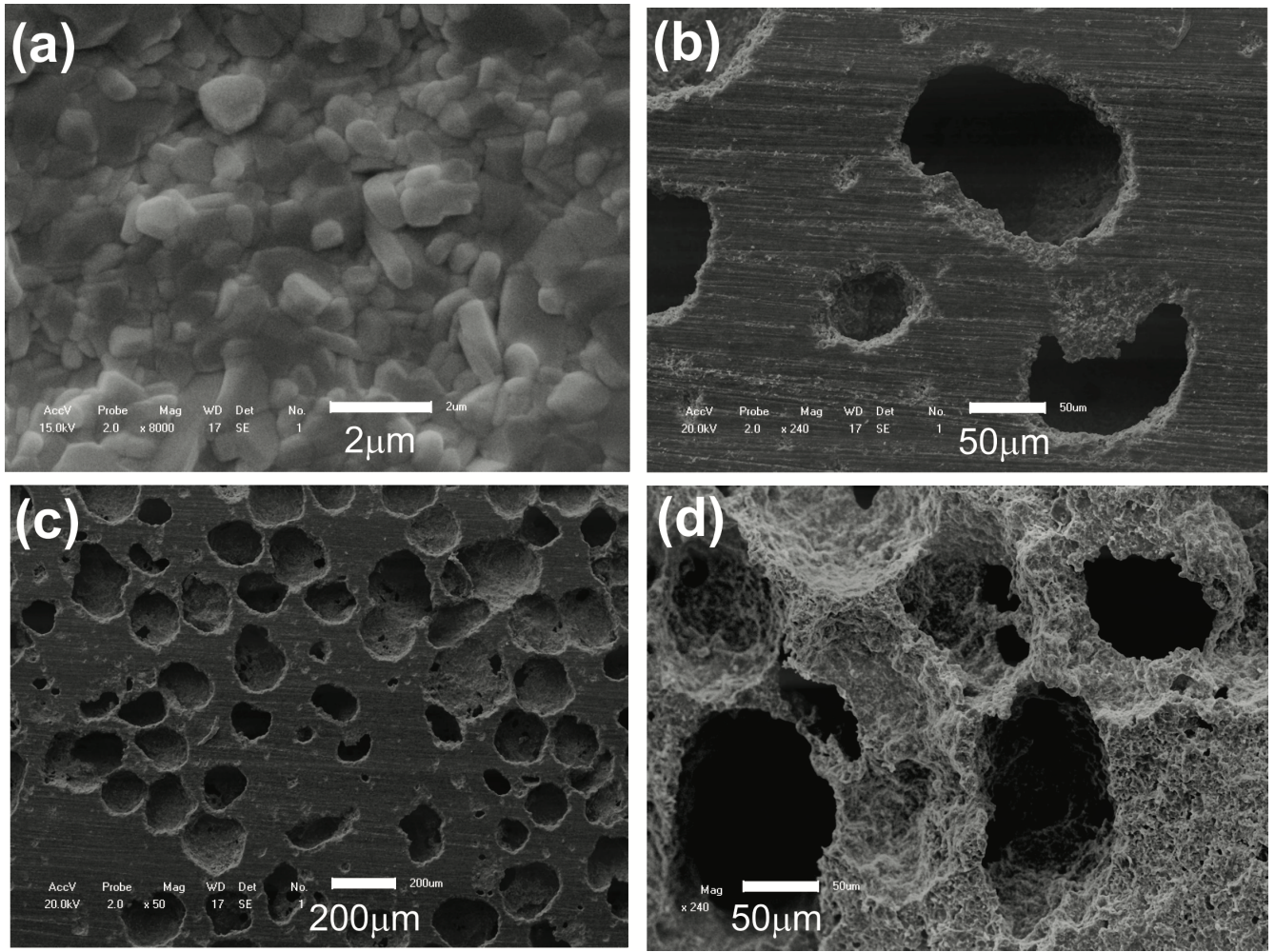


Figura 4. Micrografia Eletrônica de Varredura (MEV) da microestrutura da superfície do arcabouço do compósito baseado em  $\beta$ HAp-Nb. (a) Imagem da superfície, numa área densa, entre poros. (b,c) Superfície após lixamento. (d) Superfície após fratura (Bonadio, 2014).



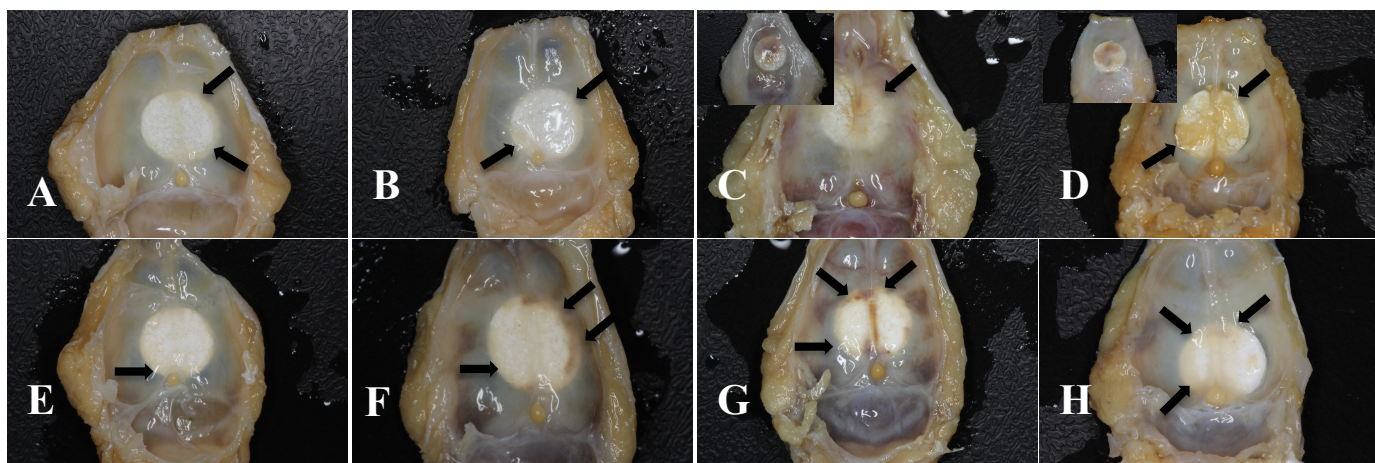
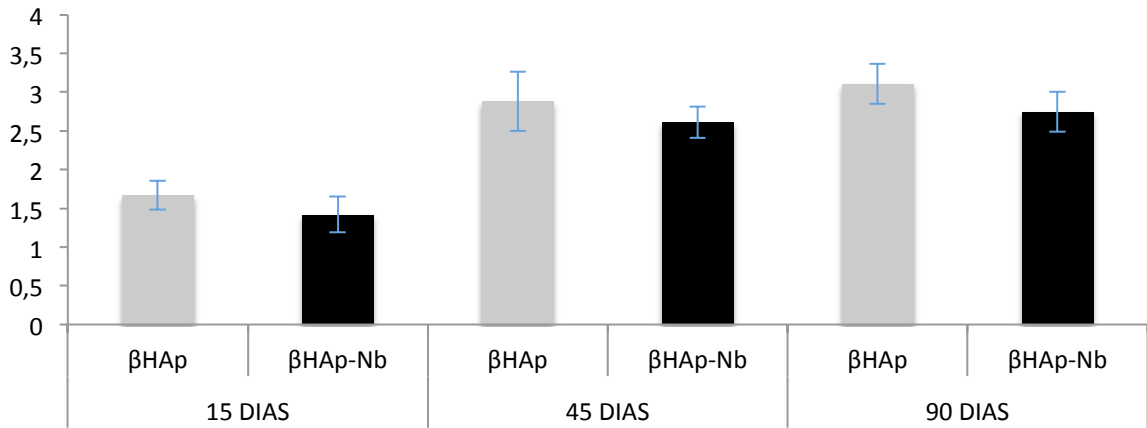
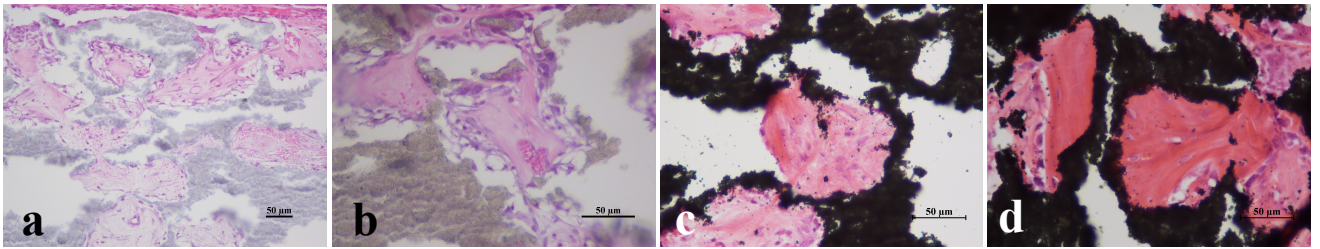


Figura 5. Fotografia da calota craniana de ratos aos (a, e)15, (b, f) 30, (c, g) 45 e (d, h) 90 dias após a realização de um defeito de tamanho crítico de 8 mm na calvária. Nas imagens (a, b, c, d) superfície interna do defeito, voltada para a dura-máter , preenchido com biomaterial bifásico composto por  $\beta$ HAp ( $\beta$  tricálcio fósforo e hidroxiapatita) . Notar a a ocorrência de área hiperêmica sobre as pastilhas aos 45 e 90 dias (insets) . As imagens (e, f, g, h) indicam a superfície interna do defeito, voltada para a dura-máter , preenchido com biomaterial trifásico composto por  $\beta$ HAp-Nb. As setas indicam áreas de crescimento ósseo



**(A)**



**(B)**

Figura 6. (A) Frequência média dos escores representativos do grau de maturação do tecido conjuntivo que se desenvolveu no interior dos poros dos arcabouços de  $\beta$ HAp e do compósito baseado em  $\beta$ HAp-Nb, 15, 45 e 90 dias após o implante do biomaterial na forma de pastilha em defeito de tamanho crítico na calvária de ratos Wistar. Escore variando de 1 a 1,49: predomínio de poros grau um; de 1,5 a 1,99: grau um e dois, no mesmo poro ou em poros distintos; de 2,0 a 2,49: predomínio de poros grau dois; de 2,5 a 2,99, no mesmo poro ou em poros distintos: grau dois e tres; de 3,0 a 3,49: predomínio de poros grau tres; de 3,5 a 3,99: grau três e quarto, no mesmo poro ou em poros distintos; escore 4,0: predomínio de poros grau quatro. Em (B) fotomicrografias representativas do aspecto morfológico dos graus de maturação atribuídos ao tecido que preencheu os poros: (a) Grau 1, predomínio de tecido conjuntivo frouxo delicado; (b) Grau 2, tecido conjuntivo mais denso; (c) Grau 3, presença de tecido ósseo primário e (d) Grau 4, presença de tecido ósseo maduro. Coloração: HE.

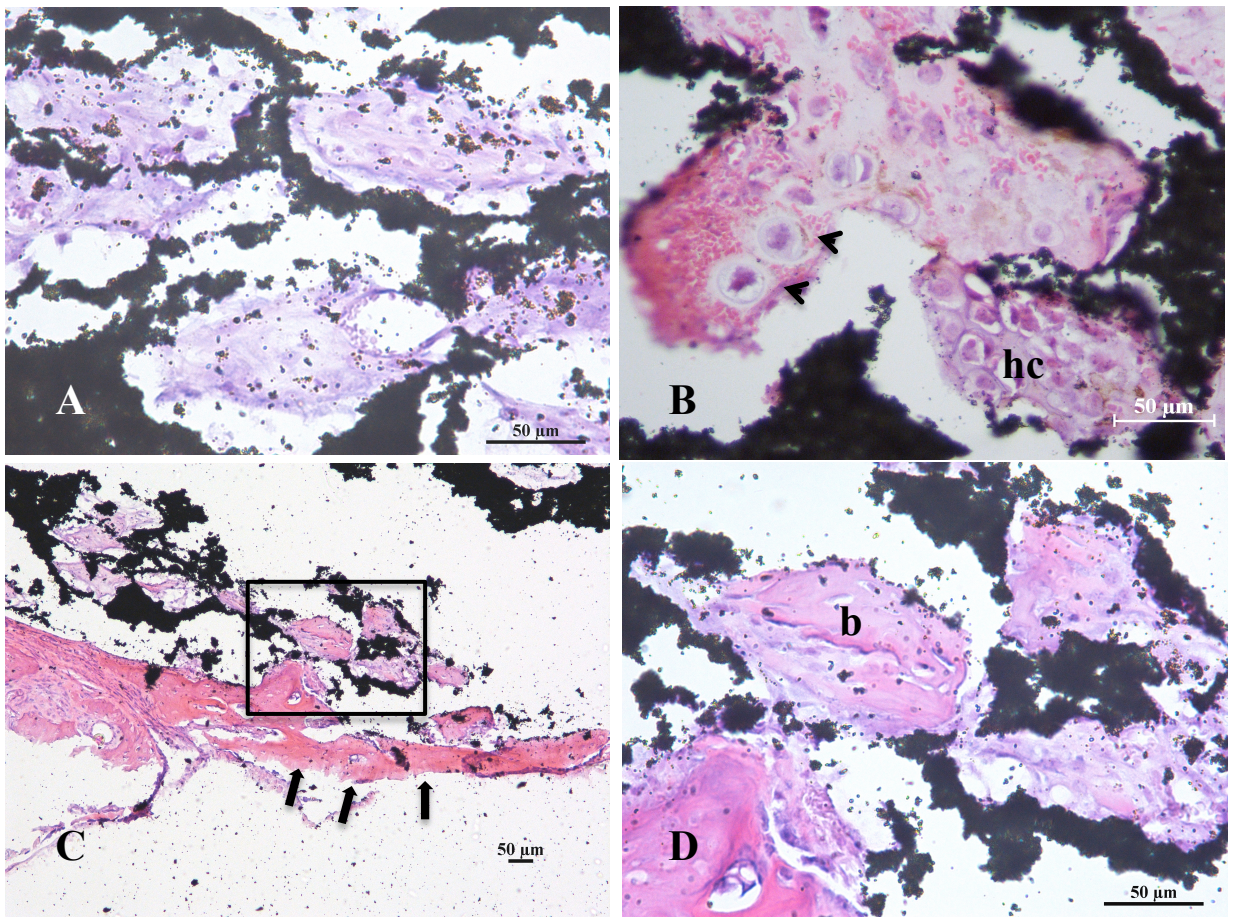


Figura 07. Fotomicrografia do defeito ósseo de tamanho crítico produzido na calvária de ratos 15 dias após o implante de um arcabouço na forma de pastilha de um compósito baseado em  $\beta$ HAp-Nb. (a) Vista panorâmica do defeito mostrando poros preenchidos com tecido conjuntivo onde os poros contém apenas tecido conjuntivo frouxo. (b) Formação de matriz de cartilagem hialina (hc), com condrócitos hipertróficos (cabeça de seta), no interior dos poros. (c) Crescimento ósseo a partir da margem do defeito (setas); observar detalhe dos poros em (d). (d) Poros apresentando diferentes graus de maturação. Observar o tecido ósseo, com osteócitos no meio da matriz, preenchendo parcialmente um dos poros (b) . Coloração: HE.

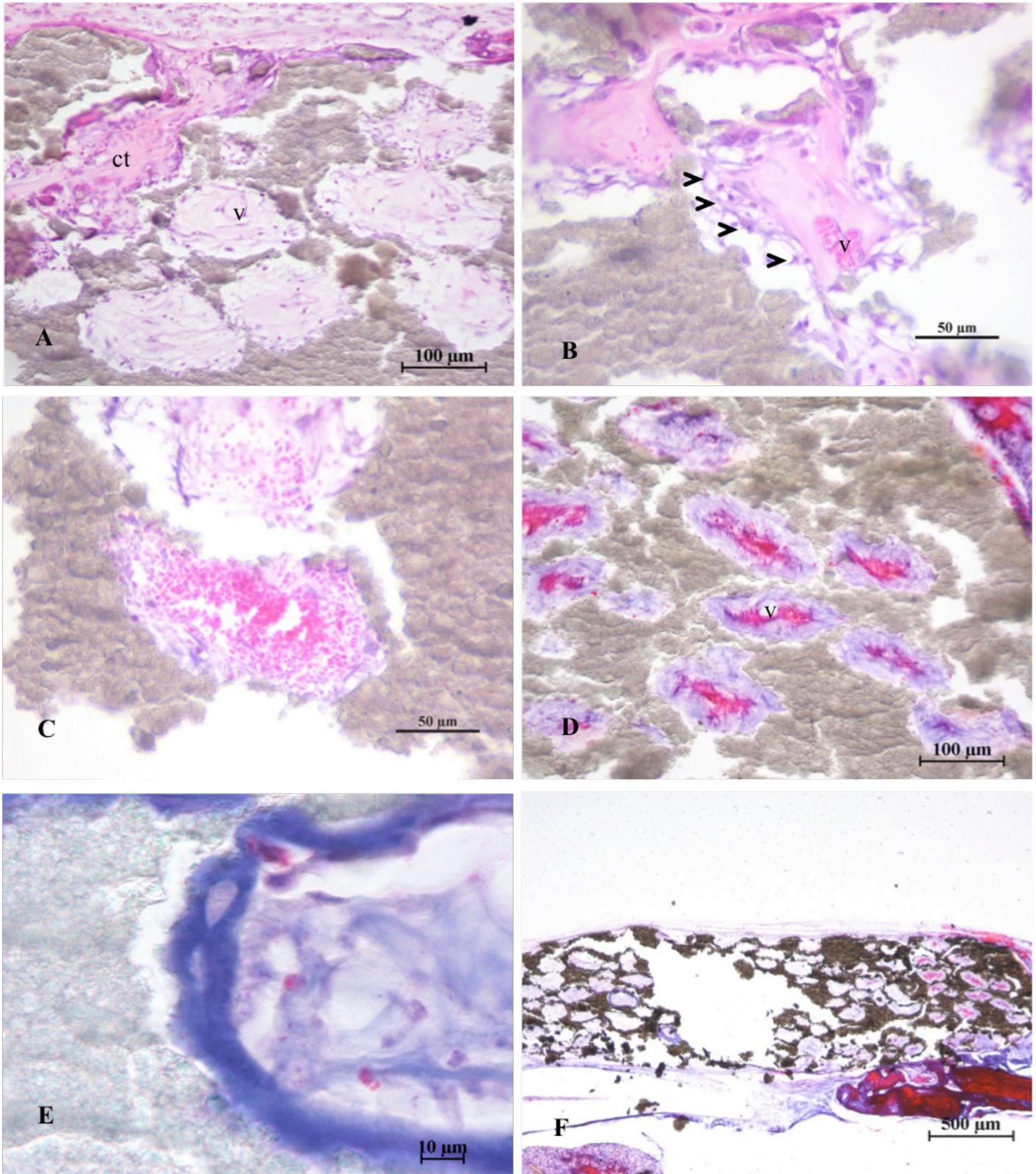


Figura 8. Fotomicrografia do defeito ósseo de tamanho crítico produzido na calvária de ratos 15 dias após o implante de um arcabouço na forma de pastilha de hidroxiapatita ( $\beta$ HAp). (a) Região da margem do defeito, rica em vasos (v) e células multinucleadas. Observar o crescimento de tecido conjuntivo para o interior dos poros (ct) (b) Destaque para a penetração de capilares (v) nos poros, além da presença de células osteogênicas. Em (c), observar o poro preenchido por tecido conjuntivo, com grande quantidade de

hemáceas livres e células osteogênicas . (d) Região da margem do defeito, onde os poros foram preenchidos por matriz óssea (em vermelho) depositada ao redor de vasos. (e) Visão aproximada de um poro, onde observa-se deposição de matriz óssea (em azul) diretamente na parede interna do poro (f) Visão panorâmica, onde se observa diferentes graus de maturação dos tecidos no interior dos poros. Coloração: (a-c) Hematoxilina e Eosina. (d-f) tricrômico de Mallory.

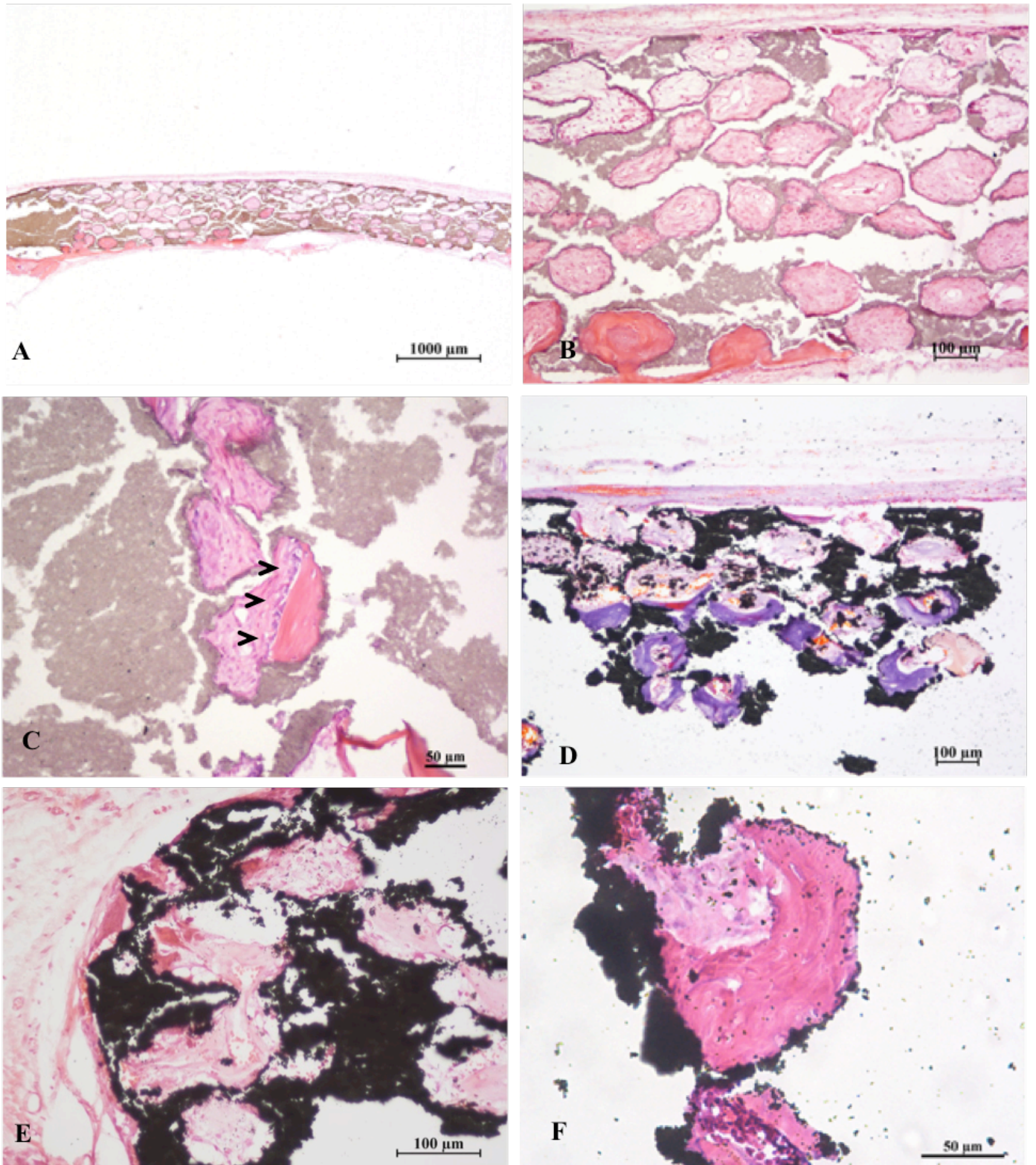


Figura 9. Fotomicrografia do defeito ósseo de tamanho crítico produzido na calvária de ratos 45 dias após o implante de um arcabouço na forma de pastilha de (a-c) hidroxiapatita ( $\text{HA}\beta$ ) e de (d-f) um compósito baseado em hidroxiapatita-pentóxido de nióbio ( $\beta\text{HAp-Nb.}$ ). (a) Vista panorâmica do defeito cujo arcabouço implantado possui todos os poros preenchidos por tecido. (b) Notar os diferentes graus de maturação do tecido, em função das diferenças na morfologia. Em (c) um detalhe do poros cuja matriz óssea está recoberta por osteoblastos (seta) e com osteócitos aprisionados. Em (d) a coloração com tricrômico de Mallory destaca os poros parcialmente preenchidos com osso corado em azul. Em (e)

observar a interconectividade dos poros ainda preenchidos por tecido imaturo e a presença de osteoclastos. Em (f), um poro parcialmente preenchido por tecido ósseo. Coloração: (a-c, e,f), Hematoxilina e Eosina; (d) tricrômico de Mallory.

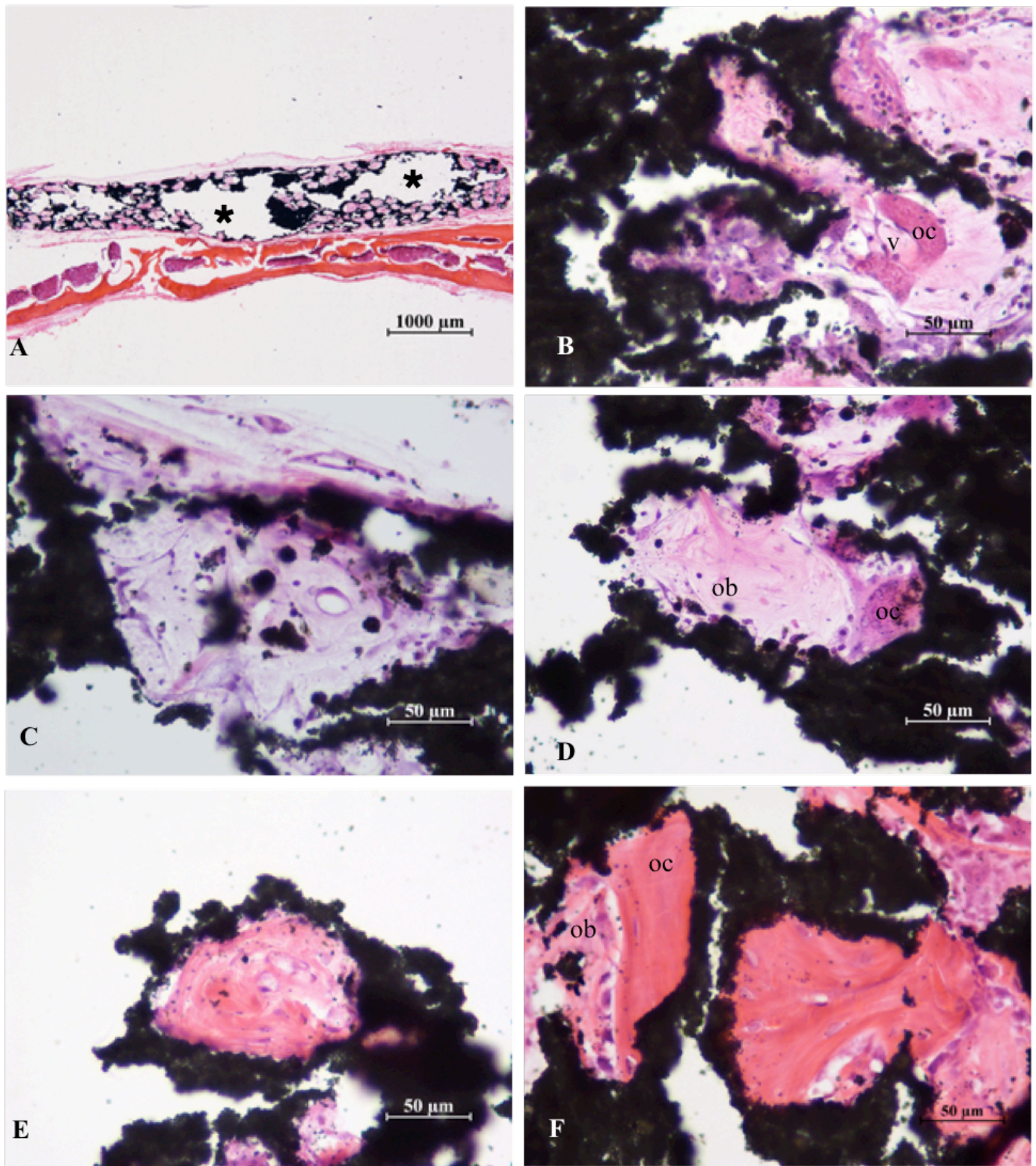


Figura 10. Fotomicrografia do defeito ósseo de tamanho crítico produzido na calvária de ratos 90 dias após o implante de um arcabouço na forma de pastilha de um compósito baseado em hidroxiapatita-pentóxido de nióbio ( $\beta$ HAp-Nb.). Em (a), vista panorâmica do defeito. As regiões indicadas com (\*) foram perdidas durante o processamento histológico. Em (b), notar a presença de um vaso na região de comunicação entre poros diferentes. As figuras (c-f) representam os vários estágios de formação de osso nos poros. Em (c) o poro é ocupado por tecido conjuntivo frouxo, vascularizado. A matriz é levemente basofílica, com presença de delicadas fibras colágenas e células indiferenciadas, de formato estrelado. Em (d), o poro está preenchido por tecido cuja matriz apresenta-se levemente acidófila, com maior deposição de fibra colágenas. Presença de



células osteogênicas (og) e osteoclastos (oc). Em (e) o poro está parcialmente preenchido por tecido ósseo primário, vascularizado. Presença de osteócitos e osteoblastos. Em (f) poro preenchido por tecido ósseo maduro, com osteócitos (oc) mergulhados na matriz óssea e osteoblastos (ob) recobrimo a superfície óssea. Coloração: Hematoxilina e Eosina.

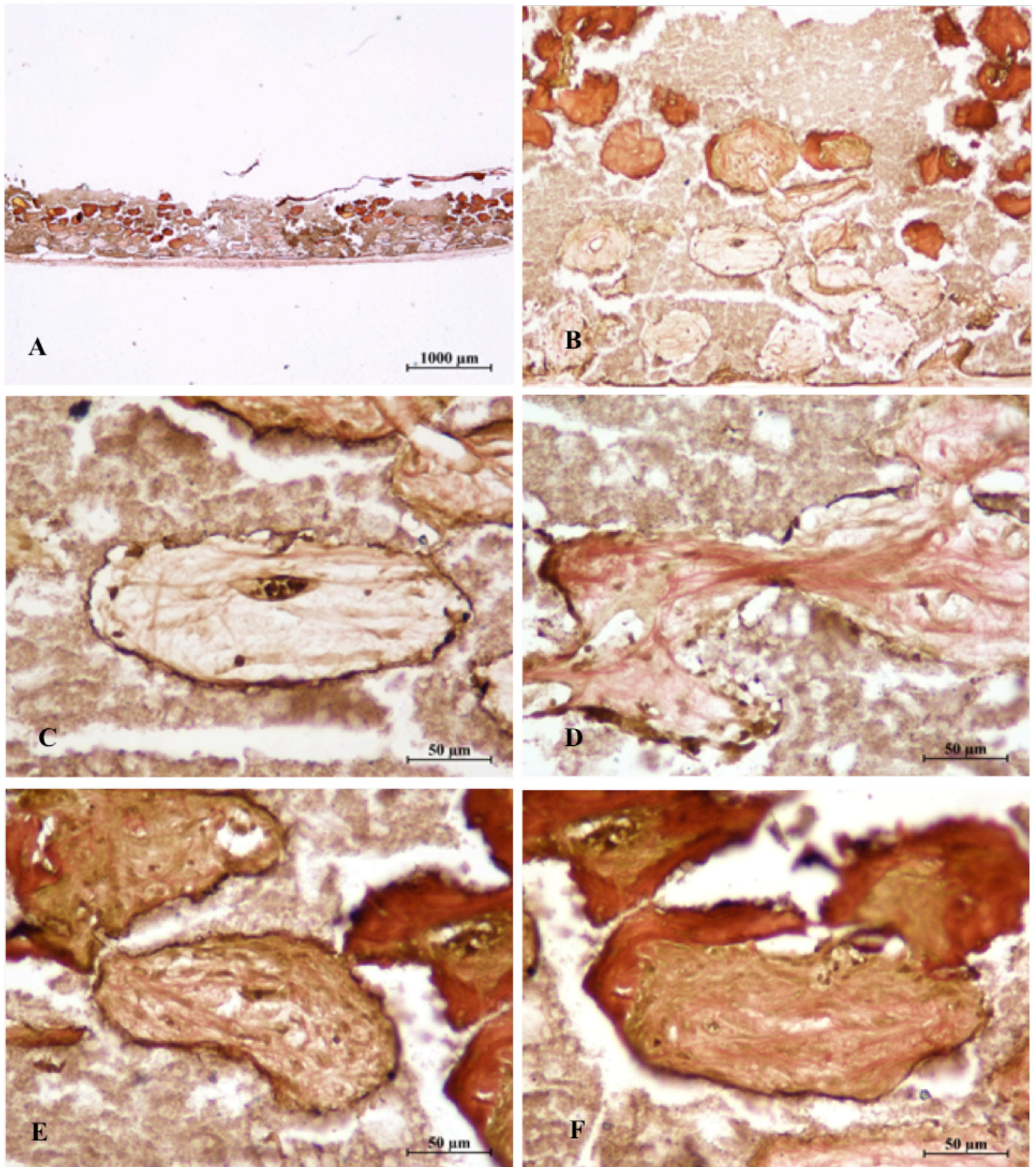


Figura 11. Fotomicrografia do defeito ósseo de tamanho crítico produzido na calvária de ratos 90 dias após o implante de um arcabouço na forma de pastilha de hidroxiapatita ( $\beta$ HAp). Em (a) uma vista panorâmica da pastilha. Em (b), observar a interconectividade entre os poros, com destaque para os vasos. As figuras (c-f) representam os vários estágios de maturação da matriz, durante a formação do osso, evidenciando, com a coloração de Verhoeff, a deposição gradual de colágeno nos poros. Coloração: Verhoeff..

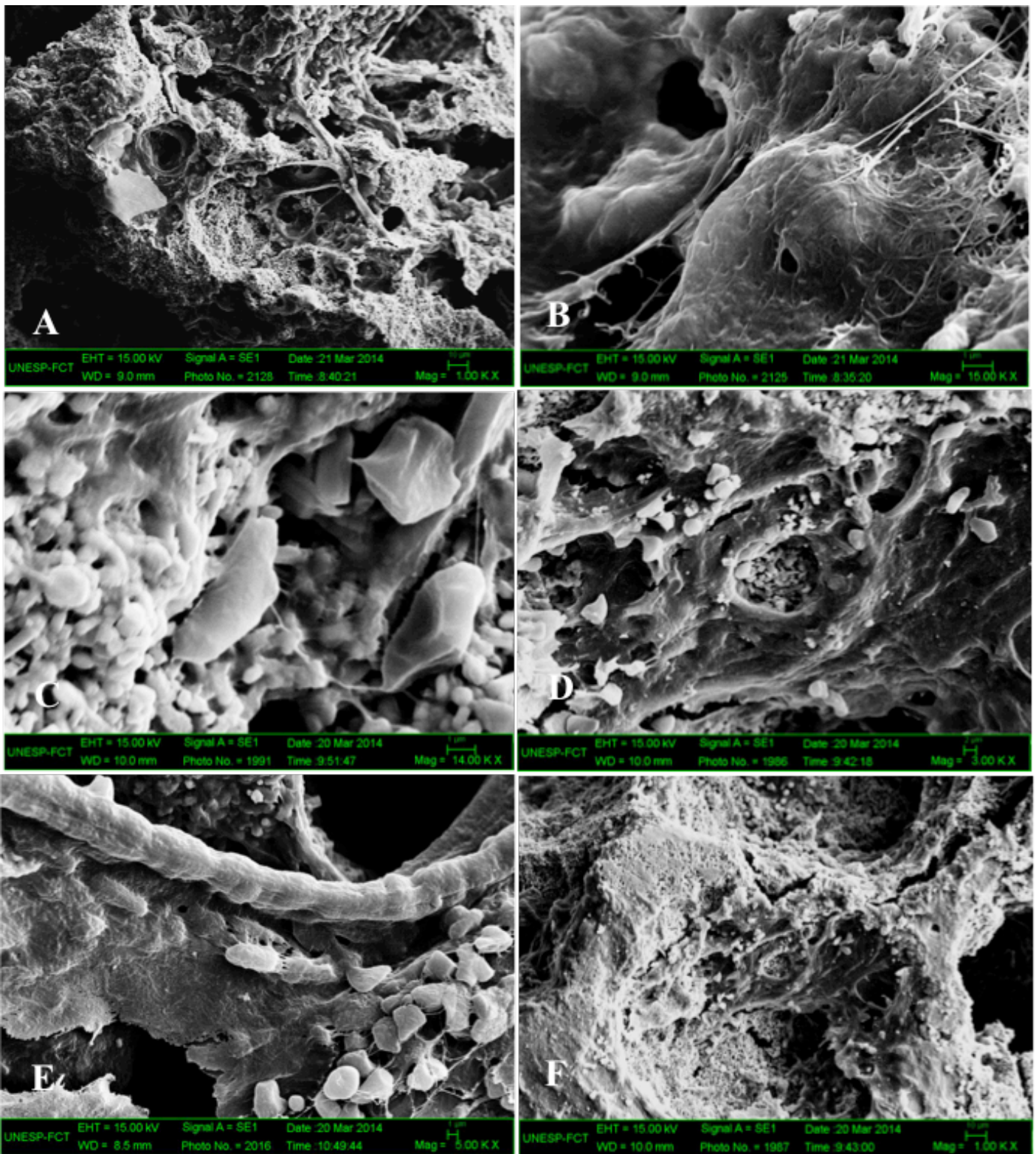


Figura 12. Eletromicrografia de varredura obtida de um arcabouço baseado em  $\beta$ HAp na forma de pastilha após 45 dias de implante em defeito de tamanho crítico na calvária de ratos. Em (a), uma amostra da pastilha fraturada onde se nota os poros preenchidos por tecido. Em (b) um poro em destaque, observar a presença de um osteoblasto totalmente recoberto com matriz. Em (c) e (d) notar a presença de células aderidas diretamente sobre o biomaterial. (e) observar a presença de um vaso e células no interior do poro. (f) Superfície de um poro totalmente preenchida por tecido.

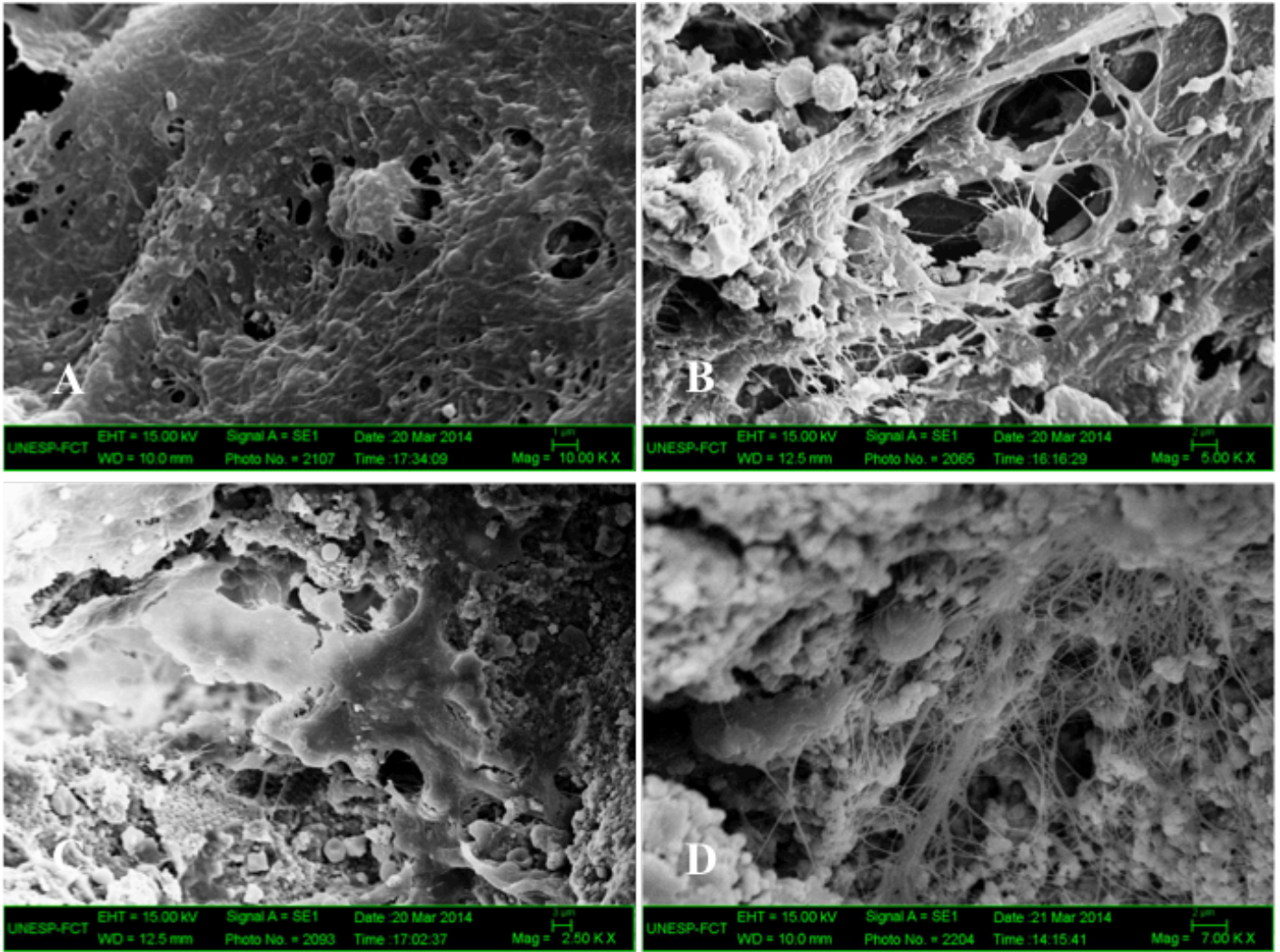


Figura 13. Eletromicrografia de varredura obtida de um arcabouço baseado em  $\beta$ HAp-Nb na forma de pastilha após 45 dias de implante em defeito de tamanho crítico na calvária de ratos. Em (a), uma amostra da pastilha onde se nota a presença de um osteoblasto diretamente sobre o biomaterial. Em (b) um poro que se apresenta totalmente preenchido com tecido em seu interior. (c) Célula multinucleada aderida diretamente sobre a superfície interior do poro. Em (d) observar a deposição de matriz diretamente sobre o biomaterial.



Parecer emitido após reunião realizada em: 24/7 /2014

Parecer nº 070/2014

Pesquisador: Luzmarina Hernandes

Setor: DCM

Título:

Protocolo nº 002/2014

**Compósito de hidroxiapatita-pentóxido de nióbio (Hap-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>): um biomaterial promissor para o reparo ósseo? Estudo ex vivo em escafolde.**

Entrada: 13/2/2014

Início: 1/3/2014

Término: 28/2/2015

Situação do Projeto: **Aprovado**

Relatório Final:

**ATENÇÃO: este parecer, quando a situação do projeto constar "aprovado", autoriza os proponentes a executarem o protocolo em questão. O certificado será emitido após apreciação e a p r o v a ç ã o d o r e l a t ó r i o f i n a l .**

**Considerações e Parecer:**

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UEM), na sua reunião de 24/07/2014, APROVOU os procedimentos éticos apresentados neste Protocolo, na forma do artigo 10, inciso I, da Resolução UEM no 032/2006-CEP, vez que não se constata óbices legais para o desenvolvimento dos procedimentos experimentais nos moldes propostos pelo(a) pesquisador(a).

Prof. Dr. Alexandre Ribas de Paulo,  
Presidente em exercício do CEAE

Artigo 10 da Resolução nº 032/2006-CEP: Os projetos analisados serão enquadrados em uma das seguintes categorias:  
I - aprovado;  
II - pendente, quando o CEAE considerar o protocolo e o projeto como aceitáveis, porém com problemas no protocolo, no projeto ou em ambos, e houver recomendação de uma revisão específica, ou solicitação de modificação ou informação relevante, que deverá ser atendida em até 60 dias, após o recebimento da comunicação, pelo coordenador do projeto;  
III - arquivado, quando o protocolo permanecer pendente, transcorridos 30 dias, após o prazo previsto no Inciso II do recebimento da comunicação;  
IV - não aprovado